

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. K. Roosen

**Die Expression von Matrix-Metalloproteasen in
humanen Medulloblastomen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Stefanie Barbara Franz

aus

Günzburg

Würzburg, Juli 2004

Referent: Prof. Dr. K. Roosen
Koreferent: Prof. Dr. W. Roggendorf
Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2005

Die Promovendin ist Ärztin

Für Inge, Hartmut und Andreas

Expression von Matrix-Metalloproteasen in **humanen Medulloblastomen**

I.	Einleitung	1
<u>1.1.</u>	<u>Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS)</u>	1
1.1.1.	PNET-Tumore	1
1.1.2.	Medulloblastome	2
1.1.2.1.	Häufigkeit und Vorkommen	2
1.1.2.2.	Makroskopie und Lokalisation	3
1.1.2.3.	Symptomatik, Diagnose und Therapie	3
1.1.2.4.	Histopathologische Kriterien des Medulloblastoms	5
1.1.2.5.	Differenzierungstypen	7
<u>1.2.</u>	<u>Extrazellulärmatrix und Invasion</u>	9
<u>1.3.</u>	<u>Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)</u>	10
1.3.1.	Allgemeine Beschreibung und Funktionen	10
1.3.2.	Aufbau und Einteilung	11
1.3.3.	Regulation der Aktivität	13
1.3.4.	MMPs in Tumoren	17
1.3.4.1.	Glioblastome	17
1.3.4.2.	MMPs in Glioblastomen	19
<u>1.4.</u>	<u>Fragestellung</u>	21

II.	Material und Methoden	23
<u>2.1.</u>	<u>Material</u>	<u>23</u>
2.1.1.	Geräte	23
2.1.2.	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3.	Chemikalien	24
2.1.4.	Reagenzien für die Zellkultur	26
2.1.5.	Enzyme, Puffer und Antikörper	26
2.1.6.	Nukleinsäuren	27
2.1.7.	Zelllinien und Zellmaterialien	27
<u>2.2.</u>	<u>Methoden</u>	<u>29</u>
2.2.1.	Zellbiologische Methoden	29
2.2.1.1.	Allgemeine Zellkulturbedingungen	29
2.2.1.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
2.2.1.2.	Spheroidkulturen von Medulloblastomzellen	31
2.2.1.3.	Ernten der Zellkulturen	31
2.2.2.	Histopathologische Aufarbeitung	32
2.2.2.1.	Paraffinschnitte	32
2.2.2.2.	Kryostatschnitte	34
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden	34
2.2.3.1.	RNA-Isolierung mit RNeasy Mini Kit	34
2.2.3.2.	Photometrische Quantifizierung der aufgereinigten RNA	35
2.2.3.3.	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	36
2.2.3.4.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	37
2.2.3.5.	Gelelektrophorese von DNA	41
2.2.4.	Proteinbiologische Methoden	42
2.2.4.1.	Immunhistochemie (IHC)	43
2.2.4.2.	Zymografie	45

III.	Ergebnisse	49
3.1.	<u>MMP mRNA Expression in Zelllinien von Medulloblastomen</u>	49
3.2.	<u>MMP Protein-Expression in Medulloblastomen</u>	51
3.2.1.	Ergebnisse der Immunhistochemie-Färbungen	51
3.2.1.1.	Auswertung der Paraffinschnitte	51
3.2.1.2.	Auswertung der Kryoschnitte	53
3.2.1.2.1.	IHC der Gelatinase A (MMP-2)	54
3.2.1.2.2.	IHC der Gelatinase B (MMP-9)	55
3.2.1.2.3.	IHC des Stromelysin-1 (MMP-3)	56
3.2.1.2.4.	IHC des Matrilysin (MMP-7)	58
3.2.1.2.5.	IHC der Humanen Makrophagen Elastase (MMP-12)	58
3.2.2.	Ergebnisse der Gelatinase-Zymografie	59
IV.	Diskussion	61
V.	Zusammenfassung	71
VI.	Literaturverzeichnis	72
VII.	Verzeichnis der Abbildungen	85
VIII.	Verzeichnis der Tabellen	86
IX.	Abkürzungsverzeichnis	87

1. Einleitung

1.1. Tumore des Zentralen Nervensystems

Medulloblastome werden zu den primären Hirntumoren gezählt. *Primäre Tumore* des Zentralen Nervensystems (ZNS) sind solche Tumore, die vom Neuroepithel, Ganglienzellen, den Hirnhäuten, den Nervenscheiden, der Hirnanhangsdrüse oder ektopen intrakraniellen Geweben (Keimzell- und Fehlbildungstumoren) ausgehen. Davon abzugrenzen sind *sekundäre Hirntumore*, Metastasen anderer, meist extrakranieller Tumore und Tumore, die von dem das Gehirn umgebenden Knochen ausgehen und verdrängend oder infiltrativ in das ZNS vorwachsen (POECK *et al.*, 1998).

Insgesamt machen Hirntumore etwa 8-10% aller malignen Geschwulste aus, 5% bilden die primären ZNS-Tumore. Bei Kindern stehen die bösartigen Geschwülste mit einer Inzidenz von 24,5 pro 1 Million Kinder pro Jahr (SCHLEGEL U. & WESTPHAL M., 1998) nach der Akuten Lymphoblastischen Leukämie schon an zweiter Stelle der onkologischen Erkrankungen. Mit einem Anteil von 20-25% ist das Medulloblastom nach dem pilozytischen Astrozytom der häufigste aller ZNS-Tumoren im Kindesalter.

1.1.1. PNET-Tumore

Primitiv neuroektodermale Tumore (PNET) sind hochmaligne embryonale Tumoren, die in der WHO-Klassifikation dem Grad IV zugeteilt werden und – das Medulloblastom ausgenommen – 5% der kindlichen Hirntumoren ausmachen. Sie werden als undifferenzierte Rundzelltumore des Kindesalters beschrieben, zu denen u.a. auch das Neuroblastom und das Ewing-Sarkom gezählt werden. Im ZNS zeigt neben dem Ependymoblastom, dem Pineoblastom und dem zerebralen Neuroblastom auch das Medulloblastom das spezifische Zellmuster der PNET.

Bezüglich der Ätiologie wird diskutiert, ob sich jedes dieser malignen Geschwulste von einer bestimmten pluripotenten, neuroektodermalen Stammzelle der subependymalen Matrix herleitet, die - beeinflusst durch das umgebende Gewebe - bestimmte Differenzierungsmerkmale besitzt (RUBINSTEIN L.J., 1998). Andere Pathologen vertreten die

Meinung, dass alle PNETs zu einer Gruppe mit global erhaltenem Differenzierungspotential zu rechnen sind (RORKE L.B. 1983). Neben dem vorherrschenden undifferenzierten Zelltyp lassen sich zu einem geringen Teil lokal oder generalisiert auch Zellen mit astrozytärer, mesenchymaler, neuronaler oder oligodendraler Differenzierung nachweisen.

Speziell beim Medulloblastom wird postuliert, dass dieses Geschwulst aus einer primitiven Stammzelle des Stratum granulosum externum des Kleinhirns entsteht, eine genaue Ursprungszelle konnte bisher jedoch noch nicht identifiziert werden (KLEIHUES P., 1993).

Die Symptomatik der extrazerebellären PNETs (auf die Symptomatik des zerebellären Medulloblastoms wird später eingegangen) ergibt sich aus der Lokalisation. Das Charakteristikum der Undifferenziertheit und die biologische Aggressivität bedingen insgesamt eine schlechte Prognose, die durch kraniospinale Aussaat von Metastasen noch verschlechtert wird.

1.1.2. Medulloblastome

1.1.2.1 Häufigkeit und Vorkommen

Das Medulloblastom (MDB) zählt mit einem Vorkommen von 20-25% zu den häufigsten ZNS-Tumoren im Kindes- und Jugendalter. Es ist typischerweise im Kleinhirn lokalisiert, findet sich zu einem geringeren Teil auch im IV. Ventrikel. Die jährliche Inzidenz beträgt etwa 5 auf 1 Millionen Kinder, wobei der typische Manifestationsgipfel eine bimodale Verteilung zwischen dem 3. bis 4. sowie 8 bis 9. Lebensjahr zeigt (PACKER R.J., 1998). In dieser Alterskategorie ist eine deutliche Knabenwendigkeit zu verzeichnen. Mit einem Anteil von 20% treten MDB jedoch auch zu einem späteren Zeitpunkt auf, wobei hier die Geschlechterverteilung nahezu ausgeglichen ist (MOLENAAR W.M. & TROJANOWSKI J.Q., 1994). Vereinzelt wird über familiäre Häufungen berichtet, die den Einfluß von genetischen Faktoren vermuten lassen, eine signifikant erhöhte Inzidenz findet sich beim nävoiden Basalzellkarzinom, dem sogenannten Gorlin-Goltz-Syndrom.

1.1.2.2. Makroskopie und Lokalisation

Das MDB findet sich bevorzugt an der Mittellinie im Kleinhirn und in den paramedianen Kleinhirnanteilen, seltener auch am Boden des IV. Ventrikel. Tritt der Tumor jenseits des Kindesalters auf, so ist er häufiger in einer der beiden Kleinhirnhemisphären zu finden.

Aufgrund ihrer typischen Lokalisation führen die Tumore frühzeitig zur Verlegung des IV. Ventrikel und bedingen somit die Symptomatik eines Verschlusshydrozephalus. Sie tendieren durch ihre ausgeprägte Proliferationsfähigkeit dazu, weitere benachbarte Strukturen wie die Kleinhirnhemisphären, den Hirnstamm und den Subarachnoidalraum zu infiltrieren und zeigen außerdem eine ausgeprägte Neigung zur Metastasierung. Die Absiedelung erfolgt bevorzugt über die Liquorwege. Durch die Disseminierung der Tumorzellen kommt es zu sogenannten Abtropfmetastasen, die vor allem im Spinalkanal und in den basalen Zisternen zu finden sind. Postoperativ sind häufig die mediobasalen Temporallappen und die Frontobasis betroffen, hier wird ein Einfluß der intraoperativen Lagerung des Patienten diskutiert. In 15-30% der Fälle zeigen sich auch extraneurale Metastasen, die am häufigsten im Knochen, Lymphknoten, Leber und Milz zu finden sind (TOMLINSON F.H., 1992)

Hinsichtlich ihrer Struktur und der Abgrenzbarkeit gegenüber dem umgebenden Gewebe können Medulloblastome sehr variieren, meist sind sie jedoch relativ gut vom Kleinhirnparenchym zu differenzieren und erscheinen in ihrer Konsistenz weich und fleischig. Die bunte, vielfältige Schnittfläche zeigt neben dem Tumorgewebe Nekrosen und Gefäßinfiltrationen mit Hämorrhagien. Verkalkungen und Zysten, wie sie bei Ependymomen und Astrozytomen vorkommen, sind bei Medulloblastomen selten zu finden.

1.1.2.3. Symptomatik, Diagnose und Therapie

Wie vorangehend schon erwähnt, ergibt sich die Symptomatik der Medulloblastome vor allem aus der typischen Lokalisation mit ihren daraus folgenden Konsequenzen. Meist ausgehend von der Kleinhirnvermis wächst das Geschwulst Richtung IV. Ventrikel vor und führt zu einer Verlegung der Liquorwege. Durch diese Passagebehinderung wird der Liquorfluß gestört, es kommt zu einem Verschlusshydrozephalus mit Steigerung des intrakraniellen Drucks und typischer Hirndrucksymptomatik. Erste klinische Zeichen sind meist Kopfschmerzen und Erbrechen, die Patienten klagen über Schwindelgefühle und Abgeschlagenheit. Bei zunehmender Progredienz äußert sich die ausgeprägte Hirndrucksymptomatik über Stauungspapille, Gangataxie, Hirnnervenausfälle und

Pyramidenbahnzeichen. Bei Infiltration der Meningen auf Höhe des Foramen magnum oder wenn es durch den erhöhten Hirndruck zur Herniation der zerebellären Tonsillen kommt, können Nackensteifigkeit und Kopfschiefhaltung auftreten. Bei Säuglingen mit noch offenen Fontanellen können die Zeichen weniger spezifisch sein und die Kinder werden eher durch Entwicklungsverzögerung oder vergrößerten Kopfumfang auffällig (SCHLEGEL U. & WESTPHAL M., 1998).

Bei Auftreten der klinischen Symptomatik werden in der Regel zur Diagnostik bildgebende Verfahren wie das CT oder das MRT gewählt (s. Abb. 1.1.), bei denen das Medulloblastom als solide, homogene und Kontrastmittel aufnehmende Raumforderung dargestellt werden kann. Prätherapeutisch und postoperativ sollte eine Liquordiagnostik durchgeführt und nach meningealer Disseminierung von Tumorzellen geforscht werden.

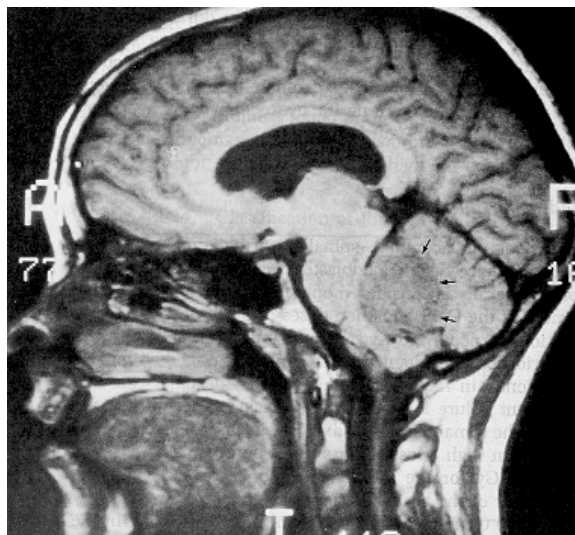


Abb. 1.1.: *Kranielle Magnet-Resonanz-Tomographie eines Patienten mit einem Medulloblastom in der hinteren Schädelgrube; MRT in T1-Wichtung (aus „Cancer“, DE VITA & ROSENBERG, 1989);*

In dem Chang-Staging-System, das 1969 entwickelt wurde, werden Medulloblastome intraoperativ nach dem Tumolvolumen, der Extension in andere Hirnstrukturen und ihrem Metastasierungsgrad einteilt (HARISIADIS L. & CHANG C.H., 1977). Neben diesen Kriterien spielen noch zusätzliche Faktoren eine Rolle bei der Prognose der malignen Geschwulste. Der Grad der Zell-Differenzierung korreliert reziprok mit der Prognose. Weiterhin wird die

Lebenserwartung vor allem wesentlich durch das Ausmaß der Resektion beeinflusst, eine subtotale Tumorentfernung weist im Vergleich zur Totalresektion klinisch eine signifikant schlechtere Prognose und erhöhte Rezidivrate auf.

Das multimodale Konzept der Therapie von Medulloblastomen besteht in weitestgehender Tumorresektion, Chemo- und Strahlentherapie. Auch wenn ein MDB chirurgisch nicht geheilt werden kann, so stellt der Grad der Resektion, wie oben schon erwähnt, einen sehr wichtigen prognostischen Parameter dar. Es wird heute versucht, größtmöglich ohne neurologische Ausfallerscheinungen zu resektieren, bei Infiltration des Hirnstammes wird eine radikale Tumorentfernung jedoch unterlassen. Bestrahlung bleibt vorerst die wichtigste kurative Komponente im traditionellen Behandlungskonzept dieses Tumors. Es wurde gezeigt, dass es nicht reicht, ein Medulloblastom lokal zu bestrahlen, sondern dass die gesamte kraniospinale Achse bestrahlt werden muss, um bessere Überlebenschancen zu gewährleisten. Man geht heute davon aus, dass die hintere Schädelgrube mehr als 50 Gy und die Neuroachse mindestens 35 Gy Bestrahlung erhalten müssen. So konnte die 5-Jahres-Überlebensrate auf 50-70% erhöht werden. Bei Erwachsenen ist die Prognose hinsichtlich der aggressiven Strahlentherapie etwas günstiger, da es bei ihnen schon zum Abschluss der Ausreifung neuronaler Strukturen gekommen ist und somit die Anfälligkeit für Strahlenschäden geringer als beim Kind ist. In einigen Zentren wird mittlerweile auch die Chemotherapie favorisiert. Hier werden z.B. Cisplatin-derivate und VP 16, ein Etoposidpräparat eingesetzt. Diese Methoden sind aber bisher noch nicht etabliert und bedürfen weiterer Auswertung.

1.1.2.4. Histopathologische Kriterien des Medulloblastoms

Histopathologische Schnitte zeigen einen zellreichen, wenig differenzierten Tumor. Insgesamt ist das Zellbild jedoch - im Vergleich zu anderen ZNS-Tumoren, wie z.B. dem Glioblastom - relativ homogen mit runden bis ovalen, blauzelligen, hyperchromatischen Kernen in einer Matrix aus gering definiertem Zytoplasma. Meist zeigt sich eine hohe mitotische Aktivität. Der Chromatingehalt ist variabel, bisweilen sind auch Zellen mit weniger dichtem Chromatin eingestreut oder können sogar den Großteil der Zellpopulation ausmachen. Als weiteres Merkmal finden sich in 30-40% der Tumoren sogenannte Homer-Wright-Rosetten als Zeichen einer neuroblastischen Differenzierung. Hierbei handelt es sich um zirkuläre bis sternförmige Anordnungen aus feinen Zellprozessen rund um ein eosinophiles lumenloses Zentrum, die von karottenförmigen Kernen umgeben sind (SCHWABE D. 1999). Als Zeichen

fortschreitender Differenzierung können auch Ganglienzellen oder astrozytäre und oligodendriale Strukturen auftreten.

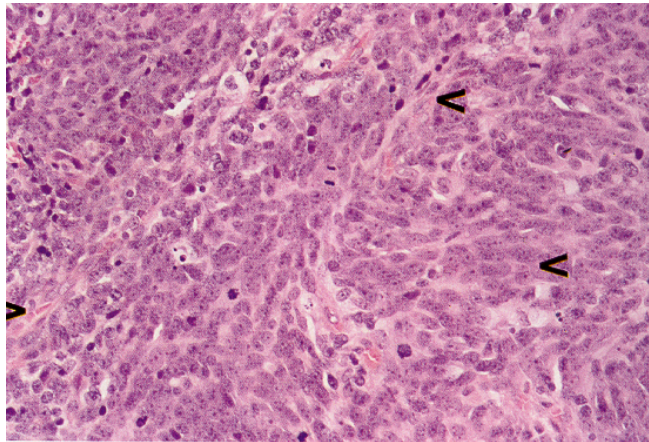


Abb. 1.2. : *Histologische Färbung eines Kryoschnitts eines Medulloblastoms (MDB). Dieser Ausschnitt zeigt die charakteristische Zellpolymorphie (aus KLEIHUES P. & WEBSTER K.C. 1997);*

Das Ausmaß der Reifung und des Differenzierungsgrades wird heute u.a. durch immunhistochemischen Nachweis entwicklungsregulierter Proteine bestimmt. Deren Expression kann bereits vor einer morphologisch fassbaren Änderung nachgewiesen werden. Dies trifft auch bei den Medulloblastomen zu: auch wenn diese zu den undifferenzierten Tumoren zu zählen sind, so zeigen sich doch immunhistochemisch häufig bereits Hinweise auf eine neuronale Differenzierung. Diese drückt sich z.B. in einer Immunreaktivität für die Neuron-spezifische Enolase (NSE) in über 50% und in einer fokalen Expression von Synaptophysin in 30-50% der Fälle aus (s. Abb. 1.3.). Beim Nachweis von Synaptophysin zeigen die Tumorzellen auch auf zytologischer Ebene bereits Hinweise für eine beginnende Neurogenese. Vereinzelt findet sich auch eine Ausprägung ganglioider Merkmale und Expression von Neurofilament-Proteinen. Bei der Mehrzahl der Medulloblastome findet sich immunhistochemisch die embryonale Form des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM und einige Tumore zeigen auch Immunreaktivität für β III-Tubulin. Dieses weist ebenfalls auf eine Tendenz zur neuronalen Differenzierung hin. Nur selten finden sich jedoch Tumorzellen mit einer positiven Reaktion auf astrozytäres GFAP-Protein.

Dieser Befund wird bei 5% der Medulloblastome erhoben und belegt, dass sich die Ursprungszelle im Prinzip noch in verschiedene neurale Linien ausdifferenzieren kann (SCHLEGEL U. & WESTPHAL M., 1997)

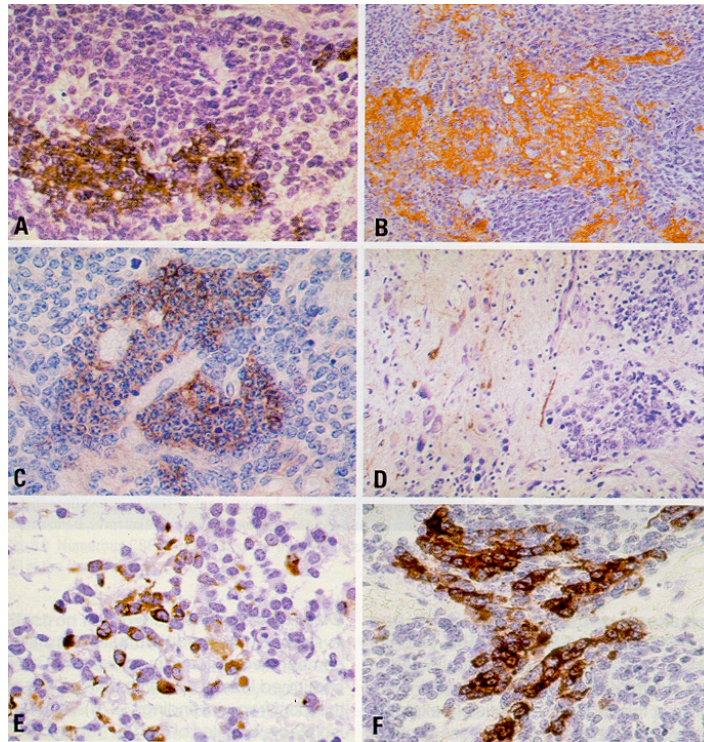


Abb. 1.3.: *Immunhistochemische Merkmale der Medulloblastome; Fokale Expression von (A) Neuron-spezifischer Enolase (NSE), (B) Synaptophysin, (C) Neurofilament-Protein (NF); (D) Tumorausschnitt mit NF-Anfärbung von reifen Ganglion-Zellen und Neuriten als Zeichen fortgeschrittener neuronaler Differenzierung. (E) Lokale GFAP-Anfärbung von Tumorzellen; (F) Medulloblastom-Tumorzell-Ansammlungen die retinales S-antigen exprimieren; (aus KLEIHUES P. & WEBSTER K.C. 1997);*

1.1.2.5. Differenzierungstypen

Man kann beim Medulloblastom histopathologisch verschiedene Typen unterscheiden, die sich in ihrem klinischen Verlauf zwar kaum unterscheiden, jedoch bei der Differentialdiagnose eine wesentliche Rolle spielen. Der *klassische Typ* zeichnet sich durch einen homogenen Zellrasen aus, bei dem sich abwechselnd palisadenartige Zellanordnungen und Mosaikbilder neben Pseudorosetten und Wirbelbildungen finden. Vorherrschend ist jedoch das homogene Zellmuster, es fehlen regelmäßig wiederkehrende Grundmuster.

Das *desmoblastische Medulloblastom* ist eine Variante, die sich durch das Vorkommen von zellärmeren Inseln auszeichnet (s. Abb. 1.4.). Diese nodulären, retikulinfreien Zonen zeigen eine verringerte Zellzahl, eine herabgesetzte fibrilläre Matrix und Kern-Uniformität als Zeichen einer fortschreitenden neuronalen Differenzierung. Neben diesen Inseln finden sich Felder mit zellreichen Tumorabschnitten aus einem Netzwerk von interzellulärem Retikulin und Kollagenfasern. Als weitere typische Struktur des desmoblastischen MDBs lassen sich breite, bindegewebige Septen, die den Tumor in lobuläre Strukturen unterteilen, hervorheben. Diese verschiedenen Strukturen können zusammen oder getrennt voneinander auftreten. Bisweilen wird die Hypothese vertreten, dass das desmoblastische Medulloblastom eine günstigere Prognose als andere Subtypen aufweist, dies konnte sich bisher aber wissenschaftlich noch nicht bestätigen lassen. Als gesichert gilt nur das gehäufte Auftreten von desmoblastischen Medulloblastomen bei jüngeren Erwachsenen (HERNAÍZ D., 1999).

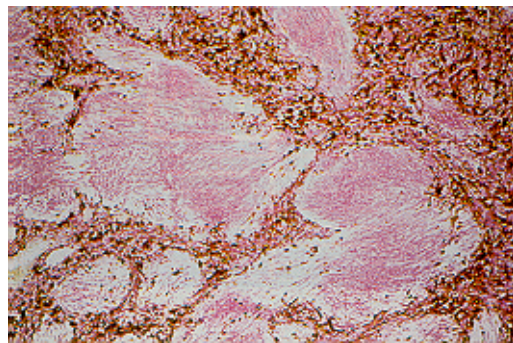


Abb. 1.4.: *Histologischer Schnitt eines desmoblastischen Medulloblastoms mit den typischen zellärmeren Inseln (aus SCHLEGEL U. & WESTPHAL M., 1998)*

Seltenere Varianten des Medulloblastoms sind das *Medullomyoblastom*, bei dem Tumorzellen eine myogene Differenzierung durchlaufen haben, sowie das *melanotische MDB* mit melaninhaltigen Tumorzellen und zuletzt das *lipomatöse MDB* mit fokalen Ansammlungen von Adipozyten.

1.2. Extrazellulärmatrix und Invasion

Über die Funktionen, Struktur und Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix (ECM) des Gehirns ist – im Gegensatz zu vielen anderen Geweben - bisher noch relativ wenig bekannt (DE CLERCK, 1994). Diese spielt eine wichtige Rolle bei vielen biologischen Prozessen und setzt sich aus mindestens drei spezifischen Strukturen zusammen: Die Glia limitans externa, die vaskuläre Basalmembran und die amorphe Grundsubstanz. Diese Strukturen bestehen aus Kollagen, Proteoglykanen und Glykoproteinen (COULDWELL W.T., 1992).

<u>Glia limitans externa</u>	<u>Vaskuläre Basalmembran</u>	<u>Amorphe Grundsubstanz</u>
Fibrilläres Kollagen (Typ I und III)	Typ IV Kollagen	Hyaluronsäure
nicht fibrilläres Kollagen (Typ IV)	Laminin	Chondroitinsulfatproteoglykane
Fibronektin	Vitronektin	Glykoproteine
Laminin	Entaktin	
Heparansulfatproteoglykane	Heparansulfatproteoglykane	

Tab. 1.1.: *ECM-Strukturen und ihre Komponenten (aus GREENBERG, CHANDLER & SANDLER, 1999);*

Die Fähigkeit von Zellen, die Extrazellulär-Matrix zu infiltrieren, sich dort zu verteilen und neue Strukturen zu bilden, ist ein Merkmal, das nicht nur bei pathologischen sondern auch bei physiologischen Prozessen zu finden ist. Beim Vorgang der Neoangiogenese kommt es z.B. zu Proliferation und Migration von Endothelzellen aufgrund angiogenetischer Stimuli. Ein Unterschied zwischen der Invasion gesunder und maligner Zellen liegt darin, dass bei physiologischen Prozessen eine Kontrolle über die ECM erfolgt. Die Tumordinvasion ist definiert als eine aktive Translokation von Tumorzellen durch zelluläre und extrazelluläre Matrixbarrieren (KOHN E.C., 1995). Über die Interaktion mit spezifischen Komponenten der ECM – vor allem Bestandteile der Basalmembran (GOLDBRUNNER R.H., 1999) - kommt es zu einer Migration und Invasion der Tumorzellen. Bei diesem Vorgang folgen die Tumore der Drei-Schritt-Theorie von Liotta (LIOTTA L.A., 1991) drei Mechanismen: Der für die Tumordinvasion erste wichtige Schritt ist die *Adhäsion*, die über Adhäsionsrezeptoren erfolgt. Ausgehend von diesem Kontakt kann sich die Zelle dann im umgebenden Normalparenchym bewegen. Dazu werden nach der Adhäsion an die Extrazellulärmatrix im folgenden Schritt die Matrix-Barrieren mittels *Proteolyse* aufgelöst. Dies geschieht u.a. durch von Tumor- und Endothelzellen sezernierten Matrix-Metalloproteasen (PEPPER M.S., 1994). Danach kommt es

zur Aussprossung von Zellfortsätzen in den neugebildeten Raum und zur *Migration* der ganzen Zelle, wobei sie ihr Zytoskelett neustrukturiert und neue Adhäsionsstellen exprimiert.

1.3. Matrix-Metalloproteasen (MMPs)

1.3.1. Allgemeine Beschreibung und Funktion

Die Morbidität und Mortalität bei malignen Tumoren wird u.a. durch deren Eigenschaft, umgebendes Normalgewebe zu invadieren und infiltrieren, bestimmt. Diese Invasionsprozesse setzen voraus, dass sich der Tumor an die Extrazellulärmatrix (ECM) anheften und bestimmte Matrix-Strukturen auflösen kann und die Tumorzellen die Fähigkeit zur Migration besitzen. Bei diesen Vorgängen spielen neben proteolytischen Enzymen wie z.B. den Serin- und Cysteinproteasen die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) eine wichtige Rolle.

Bei der MMP-Familie handelt es sich um eine Gruppe von Enzymen, die in Veränderungen der Gewebestruktur eingreifen, indem sie eine große Anzahl an verschiedenen Molekülen der ECM degradieren. Diese Eigenschaft wird nicht nur in pathologischen Prozessen genutzt. Auch bei den physiologischen Vorgängen der Angiogenese, Ovulation, Blastozystenimplantation, Embryogenese, Knochenwachstum, Makrophagen- und Neutrophilenfunktion spielen sie eine wesentliche Rolle. Es handelt sich um Prozesse, bei denen Abbau und Resorption bestimmter ECM-Komponenten, wie z.B. Proteoglycane, Glycoproteine oder verschiedene Kollagen-Typen, notwendig sind. Ähnlich wird diese Fähigkeit bei pathologischen Prozessen, wie Tumorinvasion, Metastasierung, Rheumatoiden Arthritis und Atherosklerose genutzt. Hierbei zeigen die MMPs verschiedenste Angriffspunkte. So wirken MMPs über den Abbau verschiedener Strukturen nicht nur direkt destruierend, sondern sie können bei verschiedenen Prozessen auch eine regulatorische Funktion erfüllen.

1.3.2. Aufbau und Einteilung

Die MMPs sind eine Gruppe von Zink-abhängigen Proteasen. Das Zink-Ion wird in deren aktives Zentrum eingebunden und kann durch Chelatbildner inhibiert werden. Sie fungieren als Regulatoren, sowohl in Enzym-Kaskaden als auch bei der Bearbeitung von Matrix-Proteinen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen zur Generierung von Fragmenten mit verstärkter oder abgeschwächter Wirkung. Hierbei wirkt jede MMP nicht nur für sich, es kommt auch zu komplexen Interaktionen zwischen den verschiedenen Proteinasen. Dies hat zur Folge, dass über die verschiedenen Wirkungswege die MMPs nicht nur lokal sondern an den verschiedensten Angriffspunkten ansetzen können.

Die Matrix-Metalloproteinasen werden, ähnlich wie z.B. Serinproteasen, als inaktive Proformen sezerniert, wobei hier noch ein Zystin-Rest an das Zink-Ion gebunden ist. So wird das Proenzym in seiner latent zymogenen Form gehalten. Zur Aktivierung der Enzyme wird die N-terminale Propeptid-Sequenz abgespalten. Dies erfolgt durch andere Mitglieder der MMP-Familie oder durch andere Proteasen wie Plasmin, Trypsin oder Kallikrein, die die Zystin-Zink-Verbindung lösen und das Zink-Molekül für andere Bindungspartner zugänglich machen. Dieser Schritt ist auch *in vitro* mit Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Aminophenylmerkuracetat (APMA) durchführbar (SPRINGMAN E.B., 1990).

Bisher sind mindestens 20 verschiedene Subtypen der Matrix-Metalloproteinasen bekannt. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung der Typen MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 und MMP-12.

Am Anfang der Charakterisierung der MMPs gingen die Forscher davon aus, dass jeder Protease nur ein spezifisches Substrat zugeordnet werden kann. Dementsprechend erfolgte anfangs die Nomenklatur der Matrix-Metalloproteasen in Abhängigkeit ihrer zuerst entdeckten Substrate, wie Kollagenasen, Gelatinasen und Metalloelastasen. Im Zuge weiterer Experimente stellte sich jedoch heraus, dass jede Protease mehr als nur ein Substrat hat. Z.B. kann die 72kd-Gelatinase (MMP-2) neben Gelatine auch Fibronectin und verschiedene Kollagen-Subtypen degradieren. Die bisher bekannten MMPs überlappen sich in ihrer Substratspezifität sehr stark (NAGASE H., 1992). Die Tabelle 1.2. zeigt eine Teilübersicht der verschiedenen MMPs und ihrer bevorzugten Substrate:

<u>Enzym-Name</u>	<u>MMP-Nummer</u>	<u>Protein</u>	<u>Substrate</u>
Interstitielle Kollagenase	MMP-1	57 S 52 A	Kollagen I, II, III, VII, X
72 kDa Typ IV Kollagenase bzw. Gelatinase A	MMP-2	72 S 66 A	Kollagen IV, V, VII, X Fibronectin, Gelatine
Stromelysin-1	MMP-3	60 S 52 A	Kollagen III, IV, V Laminin, Fibronectin, Proteoglykane
Matrilysin	MMP-7	28 S 19 A	Gelatine, Fibronectin
Neutrophile Kollagenase	MMP-8	-	Kollagen I, II, III, VII, X
92 kDa Typ IV Gelatinase bzw. Gelatinase B	MMP-9	92 S 86 A	Kollagen I, III, IV, V Gelatine
Stromelysin-2	MMP-10	53 S 47 A	Kollagen III, IV, V Gelatine Fibronectin
Stromelysin-3	MMP-11	51 S 44 A	Alpha-1-Antitrypsin
Makrophagen Elastase	MMP-12	54 S 45/22 A	Elastin, Kollagen IV, Laminin, Fibronectin
Kollagenase-3	MMP-13	54 S	Kollagen I, II, III, Gelatine
Membran-gebundene-1 MMP	MMP-14	63	Pro-MMP-2, Kollagene
Membran-gebundene-2 MMP	MMP-15	?	Pro-MMP-2, Kollagene
Membran-gebundene-3 MMP	MMP-16	?	Pro-MMP-2, Kollagene
Membran-gebundene-4 MMP	MMP-17	?	Pro-MMP-2, Kollagene

Tab. 1.2.: *Matrix-Metalloproteinasen und ihre bevorzugten Substrate. Es ist nur ein Teil der bisher bekannten MMPs und der bisher untersuchten Substrate dargestellt. Die Größe der Proteine ist in kDa angegeben, S = sezerniert, A = aktiviert; (Nach YONG C.H, 1998)*

Zusätzlich zu der Klassifikation nach ihre Substraten ist eine Einteilung der Proteinase nach ihrer Struktur möglich. Sie zeigen zwar stellenweise große Ähnlichkeiten in bestimmten Sequenzen wie Propeptid-Strukturen und katalytische Domänen, es lassen sich jedoch

Unterschiede durch transmembranäre Strukturen, fibronectin-ähnliche Sequenzen und C-terminale homopexin-ähnliche Domänen herausstellen. Abbildung 1.5. zeigt einen schematischen Überblick der verschiedenen MMP-Strukturen;

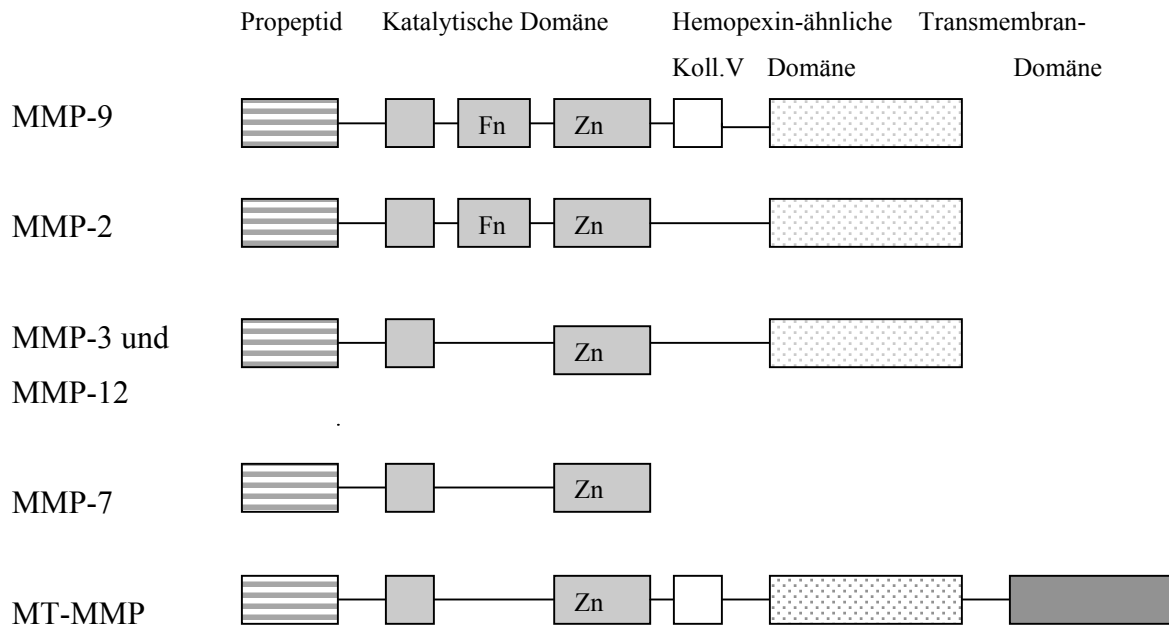


Abb. 1.5. Schematischer Aufbau von verschiedenen Matrix-Metalloproteasen. Die Propetid-Domäne ist bei allen MMPs zu finden, ihr Zystin-Rest bindet an das Zink-Ion (Zn) der katalytischen Domäne, die z.T. noch eine Fibronectin-ähnliche (Fn) Domäne besitzt. Die homopexinähnliche Domäne am C-Terminus findet sich bei allen MMPs außer MMP-7.

1.3.3. Regulation der Aktivität

Die Fähigkeit der MMPs, als Enzyme bei der Degradierung verschiedener ECM-Komponenten zu wirken, hat starken Einfluss auf den Organismus und seine Strukturen. Deswegen müssen die Aktivierung und die Wirkungen der Proteinase einer strengen Regularisierung unterliegen, um eine progrediente Gewebedestruktion zu verhindern. Nicht die Menge an sezernierten MMPs ist ausschlaggebend, sondern das Gleichgewicht zwischen Proteinase und ihren Inhibitoren spielt die maßgebende Rolle. Zur Inhibition stehen verschiedene Mechanismen auf verschiedenen Ebenen zur Verfügung:

- Auf der Ebene der *genetischen Transkription* können verschiedene Stimuli die MMP-Synthese beeinflussen. Zu diesen Faktoren zählen z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine,

Onkogene und Phorbolster Tumor Promotor (PMA), aber auch Komponenten der ECM und Zell-Zell-Interaktionen. Auf diese externen Stimuli reagiert die Zelle mit der Expression der entsprechenden Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-fos und c-jun. Deren Genprodukte bilden wiederum das Heterodimer AP-1 (activator protein), das dann an seine spezifische Propeptid-Sequenz bindet und so die Genexpression von Matrix-Metalloproteinasen bewirkt. Mittlerweile sind weitere solcher ähnlich wirkenden Transkriptionsfaktoren bekannt, wie z.B. SP-1 und NF-kB, die jedoch noch nicht so gut wie AP-1 untersucht sind (BORDEN P., 1997).

- Wie schon beschrieben, werden MMPs als inaktive Proformen sezerniert. Bei diesen ist das Zink-Ion in der katalytischen Domäne noch an einen Zystein-Rest der Promotor-Sequenz gebunden und somit für andere Bindungsstrukturen nicht zugänglich. Die Zink-Zystein-Verbindung kann durch Aktivatoren gelöst und, durch Freilegen der katalytischen Domäne, die *inaktive Proform in eine aktive Proteinase* überführt werden. So entsteht eine - vorerst nur partiell - aktive Intermediärform. Diese kann durch vollständige, autokatalytische Entfernung der Propeptidregion in die vollaktive Form übergehen (VAN WART H.E., 1990). Als wichtiger physiologischer Aktivator ist das Plasmin zu nennen - eine Serinprotease, die u.a. durch den Urokinase-Plasminogen Activator (uPA) in seine aktive Form überführt wird. Bei den Membran-ständigen MMPs (MT-MMPs) wird zur Überführung in die aktive Form ebenfalls das Propeptid abgespalten. Dieser Schritt wird über die Serinprotease Furin katalysiert. Die Aktivierungskaskaden können nebeneinander verlaufen oder sich auch gegenseitig verstärken, so dass es zu einer Aktivierung weiterer Matrix-Metalloproteinasen kommt. Die Aktivierung erfolgt an der Oberfläche der Zellen, so dass die Wirkung der sezernierten MMPs in der unmittelbaren Zellumgebung stattfindet. So kann die Zelle am besten von der MMP-Wirkung profitieren, und Interaktionen zwischen der Zelle und der ECM werden verstärkt.

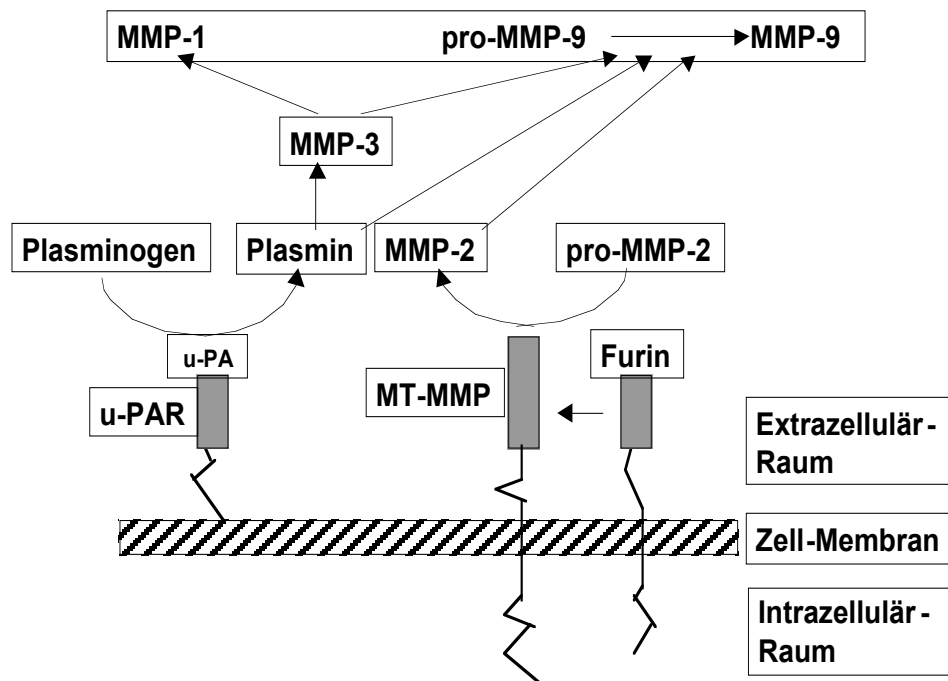


Abb. 1.6.: Schema der Aktivierungskaskade der MMPs an der Zelloberfläche (nach YONG C.H., 1998);

- Neben den genannten Kontroll-Möglichkeiten auf Transkriptionsebene und der Ebene der translatierten Proformen sind als weitere Regulatoren die *tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)* zu nennen. TIMPs sind natürliche körpereigene Inhibitoren, von denen bisher 4 beschrieben sind. Neben ihrem Einfluß auf verschiedene biologische Vorgänge wie z.B. Gonadenstimulation zur Steroidsynthese, Inhibition der Angiogenese, Gewebestrukturierung und Embryonalentwicklung, liegen weitere wichtige *in vivo* -Funktionen im Bereich der Regulation der Matrix-Metalloproteinasen. Sie erfüllen insgesamt für alle MMPs eine Inhibitor-funktion, es hat sich jedoch gezeigt, dass jeder TIMP im allgemeinen eine bestimmte Matrix-Metalloproteinase bevorzugt (s. Tab. 1.3.). Die Gesamtaktivität der MMPs ergibt sich

aus dem Gleichgewicht zwischen der Menge an aktiviertem MMP und der zur Verfügung stehenden TIMPs.

Das Zusammenspiel zwischen beiden ist komplex: Neben der Möglichkeit, die Aktivität der MMPs zu inhibieren, ist mittlerweile bekannt, dass z.B. TIMP-2 auch zur Aktivierung von MMP-2 benötigt wird. Dazu bildet es mit der inaktiven Proform der Gelatinase einen Komplex. Dieser Zusammenschluß pro-MMP-2/TIMP-2 kann dann kontrollieren, in welchem Maße andere physiologische Faktoren MMPs aktivieren können. Ähnlich wie die MMPs, wird auch die Transkription der TIMP-Gene (und somit indirekt auch wieder die MMP-Expression) durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Z.B. können Fibroblasten, Endothelzellen und TGF- β eine verstärkte, Stromelysin und Kollagenasen eine verminderte TIMP-1-Expression bewirken.

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Chromosomen Lokalisation	Xp11.23-11.4	17q2.3-2.5	22q12.1-13.2	?
Protein (kDa)	28	21	24	22
RNA (kb)	0.9	3.5 (1.0)	4.5 (2.8, 2.4)	1.2
Expression	induzierbar	konstitutiv	induzierbar	?
Form des exprim. Moleküls	sezerniert	sezerniert	ECM-assoz.	sezerniert
Pro-MMP Komplex	MMP-9	MMP-2	MMP-2	?
Inhibierung von MT-MMP	Nein	Ja	Ja	Ja
Inhibierung von Gelatinasen	Ja	Ja	Ja	Ja

Tab. 1.3.: *Merkmale der verschiedenen tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs); Zahlen in Klammern sind mögliche Splice-varianten; kb = Kilobasen, ? = unbekannt (nach YONG C.H., 1998)*

Es zeigt sich, dass die MMP-Aktivität unter physiologischen Bedingungen auf verschiedenen Ebenen gut kontrolliert und ausgewogen ist. Bei malignen Prozessen werden diese Mechanismen reduziert oder sind nicht wirksam und es kommt zu einer übersteigerten Synthese und Aktivierung der MMPs und folgender Gewebedestruktion.

1.3.4. MMPs in Tumoren

Wie vorangegangen schon erwähnt trägt das außer Kraft gesetzte physiologische Zusammenspiel zwischen Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren wesentlich zur Progression von pathologischen Prozessen im ZNS bei. MMPs sind nachgewiesenermaßen, wie z.B. im Rahmen der Multiplen Sklerose oder bei Virus-Enzephalitiden an inflammatorischen Prozessen und leukozytärer Infiltration beteiligt. Ebenso wurde bei Störungen der Blut-Hirn-Schranke und bei demyelinisierenden Vorgänge wie bei der Alzheimer'schen Erkrankung eine verstärkte Expression von MMPs nachgewiesen (YONG C.H., 1998).

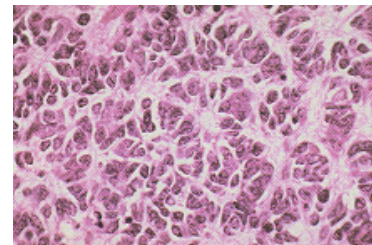
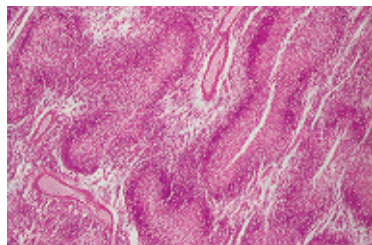
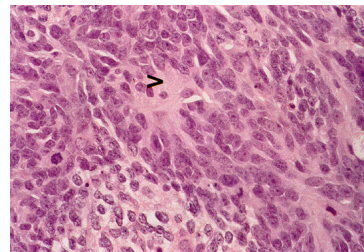
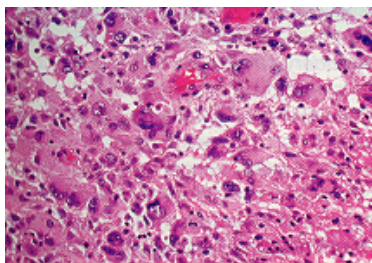
Auch zeigte sich in der Tumorforschung, dass Matrix-Metalloproteasen an Prozessen wie Tumorinvasion, -angiogenese und Metastasierung beteiligt sind. Diese pathologische Involvierung ist Ziel weiterer intensiver Forschung. Die verschiedenen MMPs sind in vielen humanen Tumortypen, wie Mamma-, Colon-, Prostata- und Ovarial-Carcinomen zu finden. Die Rolle der MMPs in ZNS-Tumoren ist bisher in der Entität der Glioblastome (GBM) am besten untersucht. Dieser hochmaligne, stark vaskularisierte und invasive Tumor lässt eine ausgeprägte Beteiligung von MMPs erkennen. Die Therapiekonzepte sind bisher jedoch stark limitiert was das intensive Interesse an weiteren Forschungen über Proteasen und ihren Funktionen erklärt. Auch das Medulloblastom ist ein hochmaligner Tumor. Über das Vorkommen von MMPs bei Medulloblastomen ist im Gegensatz zu den GBM jedoch bisher wenig bekannt und beschrieben.

Um die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse besser einschätzen und daraus Rückschlüsse ziehen zu können, werden Ergebnisse und Kenntnisse zum Vorkommen und Funktionen von MMPs in Glioblastomen zum Vergleich herangezogen. So können durch die Gegenüberstellung der biologischen und histologischen Unterschiede dieser zwei Tumortypen eventuelle Korrelationen in den verschiedenen MMP-Verteilungsmustern erkannt werden.

1.3.4.1. Glioblastome

Das Glioblastoma multiforme ist mit über 50% das häufigste astrozytäre Gliom im Erwachsenenalter. Es kann in jeder Altersgruppe auftreten, gehäuft sind aber Patienten

jenseits der 6. Lebensdekade betroffen. Dieser Tumor, der bei Erwachsenen bevorzugt in den Großhirnhemisphären zu finden ist, ist hochmaligne (WHO-Grad IV) und extrem invasiv. Die Fähigkeit der Glioblastomzellen, in das umgebende Hirnparenchym zu disseminieren und so eventuell chirurgischer Resektion zu entgehen, erklärt auch das gehäufte Auftreten von Rezidiven und die kurze Überlebenszeit von ca. 12 Monaten. Der Zusatz „multiforme“ lässt sich aus dem makroskopischen Erscheinungsbild mit häufig sehr bunt erscheinender Schnittfläche herleiten. Neben vitalen Tumorparenchymfeldern finden sich Nekrosen, Kapillaren und Einblutungen, zystische Veränderungen und narbige Reaktionen. Auch bei der Mikroskopie zeigt sich das GBM sehr variabel und vielgestaltig. Im Vergleich zum Medulloblastom (MDB) bietet sich ein wesentlich heterogeneres und polymorphes Zellbild mit einer hohen Zelldichte und verschiedenen Zellformen.



(a) Glioblastoma multiforme

(b) Medulloblastom

Abb.1.7.: *Histologische Cryo-Schnittpräparate eines Glioblastoms (a), das durch Zellpolymorphie, Einblutungen, Nekrosen und Endothelproliferate ein wesentlich polymorpheres Bild bietet als das Präparat eines humanen Medulloblastoms (b); (aus SCHLEGEL U. & WESTPHAL M, 1998);*

Ähnlich wie das MDB zeichnet sich das GBM durch hohe mitotische und Proliferationsaktivität aus. Neben den Tumorzellen können beim Glioblastom auch weitere Zelltypen mit fibrillären, kleinzelligen, spindelzelligen oder riesenzelligen Strukturen

vorherrschen, häufig finden sich auch bis zu 30% Makrophagen. Typisch sind sogenannte Strichnekrosen - Nekrosen, die von einem palisadenartigen Tumorzellsaum begrenzt sind – und pathologische, glomeruloide Endothelproliferationen. Diese glomeruloiden Strukturen sind häufig besonders stark an der Grenze zum normalen Hirnparenchym ausgeprägt.

Glioblastome manifestieren sich ähnlich wie die Medulloblastome über einen erhöhten intrakraniellen Druck mit Kopfschmerzen, Sehstörungen, Übelkeit und Erbrechen, sowie mit fokalen Symptomen wie Hemiparese und Hemianopsie. Nicht selten tritt als Erstsymptom ein cerebraler Krampfanfall auf (MAHALEY M.S., 1989). In der bildgebenden Diagnostik zeigt sich das GBM in den Konvexitäten der Großhirnhemisphären oft als eine ringförmige kontrastmittelanreichernde Läsion. Meist findet sich zudem ein hypodenses Zentrum, das einer Nekrose entspricht und ein ausgeprägtes perifokales Ödem. Zur Therapie werden Strahlentherapie und operative Resektion eingesetzt, diese Behandlungen sind aufgrund der hohen Malignität und der extrem schlechten Prognose eher nur von palliativer Bedeutung.

1.3.4.2. MMPs in Glioblastomen

Ein wesentliches Kennzeichen der Glioblastome ist ihre Fähigkeit, das umgebende Normalparenchym zu invadieren und so zu einer Störung der Gewebsarchitektur und letztendlich einer Dysfunktion des ZNS zu führen. Dieser Invasionsprozess besteht aus einer Serie von komplexen Vorgängen: Veränderung der Interaktion der Tumorzellen mit der ECM, Proteolyse der Matrix mittels proteolytischer Enzyme und folgende Migration der Tumorzellen entlang vaskulärer Strukturen. Um den Abbau der umgebenden zellulären und proteinhaltigen Strukturen durchzuführen, nutzen die malignen Zellen verschiedene Typen von proteolytischen Enzymen. Neben den Serin- und Cystein-Proteasen zählen hierzu auch die Matrix-Metalloproteasen, die nicht nur von den Glioblastomzellen, sondern auch von Zellen des Normalparenchyms, wie Endothelzellen und Makrophagen sezerniert werden.

Bei den GBM sind bisher die Gelatinasen A und B (MMP-2 und MMP-9) am besten untersucht und es konnte eine starke Korrelation zwischen der Tumorinvasivität und dem Grad der MMP-2/MMP-9-Expression festgestellt werden (RAO J.S., 1996/1994). Der Prozeß der Invasion ist stark mit dem Vorgang der Migration von Endothelzellen verknüpft (GOLDBRUNNER R.H., 1999). Eine Voraussetzung der Vaskularisation ist hierbei, dass auch die Endothelzellen proteolytisch aktiv und so in Richtung des Tumors vorwachsen können.

Hier scheint vor allem die *Gelatinase B* eine Schlüsselfunktion zu besitzen: *MMP-9* war bei histologischen Schnitten vor allem am Endothel der Tumorblutgefäße lokalisiert und wurde

nur vereinzelt bei Tumorzellen oder Makrophagen beobachtet (VINCE G.H., 1999). Weiterführende Experimente konnten nachweisen, dass die Gelatinase B von den Endothelzellen produziert wird und ihre Funktion u.a. darin liegt, Leitschienen für die Tumorzellmigration zu bilden (NAKAGAWA T., 1994). Bemerkenswert ist auch, dass MMP-9 in Normalhirngewebe – Gewebe mit intakten Gefäßen – bisher nicht nachzuweisen war und somit gerade bei malignen Prozessen von Bedeutung ist. Ihre proteolytische Fähigkeit spielt nur eine untergeordnete Rolle.

Diese Funktion ist bei der *Gelatinase A (MMP-2)* wesentlich ausgeprägter. Neben der direkten proteolytischen Destruktion der ECM hat jedoch auch MMP-2 Einfluss auf die Neoangiogenese. Es wird ebenfalls im perivaskulären Raum von Endothelzellen und Tumorzellen produziert, sein Einfluss erfolgt jedoch auf die Neovaskularisation über regulatorische und weniger über direkt angreifende Mechanismen. Vor allem bei dieser Protease zeigte sich eine ausgeprägte Korrelation zwischen der ihrer Expression und der Tumorinvasivität.

Stromelysin-1 (MMP-3) ist eine der kleineren Proteasen und unterscheidet sich von den anderen Proteasen vor allem in der Hinsicht, dass es direkt in seiner aktiven Form sezerniert wird und keiner Aktivierung durch Abspaltung eines Propeptids bedarf. Es fand sich bisher in starker Assoziation mit Metastasierung und Invasion von Plattenzell-Karzinomen, über seine genauere Funktion beim Tumorwachstum ist jedoch noch nichts bekannt. Sowohl in Glioblastomen als auch in Normalhirngewebe konnte es bisher nicht nachgewiesen werden (VINCE G.H., 1999). Auch *Matrilysin (MMP-7)* zählt zu den kleineren Proteasen, deren genaue Rolle beim Tumorwachstum noch diskutiert wird. Man vermutet, dass MMP-7 eher bei der frühen Tumorentwicklung und weniger bei späteren Prozessen der Metastasierung von Bedeutung ist (BRAMHALL S.R., 1997). *In vitro* ist eine Abhängigkeit der Matrilysinexpression von der Zelldichte in proliferativen Arealen von Tumor beschrieben worden (BORCHERS A.H., 1997; WAGNER S., 1999):

Auch die *humane Makrophagenelastase (MMP-12)* nimmt unter den Matrix-Metalloproteasen insofern eine Sonderstellung ein, als sie scheinbar nur von den Makrophagen des Wirtsorganismus und nicht von den Tumorzellen sezerniert wird. Bisher wird ihr vor allem eine regulatorische Funktion bei der Neoangiogenese zugesprochen (BELAAOUAJ A., 1995). Über die Freisetzung von Angiostatin – einem Vaskularisationsinhibitor – aus Plasminogen kann diese Protease auf den Tumor antiproliferativ wirken und so als Reaktion und Abwehrmechanismus des Wirtsorganismus auf maligne Prozesse verstanden werden.

1.4. Fragestellung

Für das Glioblastom als hochmalignen ZNS-Tumor vom WHO-Grad IV ist bekannt, dass seine Malignität unter anderem durch die Merkmale der Invasion von Tumorzellen und der Neoangiogenese bedingt sind. Im Rahmen dieser Vorgänge werden Proteasen aktiviert, die Bestandteile der Extrazellulärmatrix des umgebenden gesunden Hirnparenchyms degradieren und somit die Tumorzell-Migration und –Invasion ermöglichen. Eine wichtige Gruppe von Enzymen, die für diese Vorgänge verantwortlich gemacht werden, ist die Familie der Matrix-Metalloproteasen. In neueren Untersuchungen wurde belegt, dass MMPs neben der Matrixproteolyse einen wichtigen regulatorischen Einfluß in der Neoangiogenese besitzen. Für die Entwicklung zukünftiger Therapieschemata ist ein besseres Verständnis und Wissen über diese Enzyme, die Tumorwachstum, Neovaskularisation und Invasion beeinflussen, hilfreich.

Eine weitere Entität der ZNS-Tumoren ist das Medulloblastom. Dieser kindliche Hirntumor ist wie das Glioblastom hochmaligne, jedoch weniger invasiv. Das histologische Bild zeigt einen zellreichen Tumor mit hoher mitotischer Aktivität und starker Proliferationstendenz, im Vergleich zum Glioblastom sind beim Medulloblastom Prozesse der Neovaskularisation und Invasion schwächer ausgeprägt. In früheren Arbeiten wurde bereits das Vorkommen und die Verteilung von Matrix-Metalloproteasen in Glioblastomen untersucht (RAO J.S., 1993/1994; VINCE G.H. & WAGNER S., 1999) und eine Charakterisierung der Proteasen durchgeführt. Über das Vorkommen und die regionale Verteilung von MMPs in Medulloblastomen ist bisher noch wenig bekannt.

Die vorliegende Arbeit soll das Expressions- und Verteilungsmuster von MMP-2 (Gelatinase-A), MMP-9 (Gelatinase-B), MMP-3 (Stromelysin-1), MMP-7 (Matrilysin) und MMP-12 (Humane Makrophagen Elastase) in humanen Medulloblastomen charakterisieren. Dazu werden erstens mittels einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion untersucht, inwiefern die mRNA als Voraussetzung zur MMP-Expression in Zelllinien und Primärkulturen nachweisbar ist. Anschließend soll im Rahmen von immunhistochemischen Untersuchungen versucht werden, die translatierten MMPs in Zelllinien und Primärkulturen nachzuweisen. Unter Verwendung von Tumornativmaterial wird auch besonders das regionale histopathologische Verteilungsmuster in Assoziation zu den verschiedenen Strukturen im Tumorgewebe berücksichtigt, um so auch mögliche Rückschlüsse auf die unterschiedlichen

Funktionen und Angriffspunkte der verschiedenen Proteasen ziehen zu können. Als weiteres Verfahren dient die Zymografie als Kontrolle der immunhistochemischen Färbungen und zur Unterscheidung der aktiven und inaktiven Formen der Gelatinasen-A und -B in den verschiedenen Zelllinien.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

- Brutschrank
(IR Autoflow CO₂ Water-Jacketed Incubator) Nuaire, Plymouth, USA
- Centrifuge 5417 Eppendorf, Hamburg
- Elektrophorese Power Supply ST 305 Gibco-BRL-LifeTechnologies,
Eggenstein
- Gelelektrophoreseskammern,
Horizon 1114 und Horizon 58 Gibco-BRL-LifeTechnologies,
Eggenstein
- Gene Amplifier PCR System 2400 Perkin Elmer, Weiterstadt
- Humidity Chamber Hybaid, Heidelberg
- Kryostat 1720 Leitz, Wetzlar
- Medax-Wärmebecken Nagel GmbH, Kiel
- Mikropipetten Eppendorf, Hamburg
- Mikroskop, Wilovert Hund, Wetzlar
- Mikrowellenherd R-2V26 Sharp, Hamburg
- Gelelektrophorese-Apparatur
Mini-V8•10 Vertikal Gibco-BRL-LifeTechnologies,
Eggenstein
- Multipipette plus Eppendorf, Hamburg
- ph-Meter 525 WTW, Weilheim
- Paraffineinbettungsmaschine Citadel 1000 Shandon
- Photometer Ultrospec III Pharmacia-Biotech, Freiburg
- Pipettor (Stripettor) Costar, Bodenheim
- Rotamax 120 Heidolph, Kelheim
- Schlittenmikrotom 1208 Leitz, Wetzlar
- Speed vac (DNAplus) Heto, Allerod, DK
- Sterilbank (Biol.Safety Cabinet) Nuaire, Plymouth, USA

- Thermomixer 5436 Eppendorf, Hamburg
- Tischzentrifuge 5417C Eppendorf Hamburg
- UV-Illuminator Konrad Benda, Wiesloch
- Vortex-Genie 2 Scientific Industries, Bohemia, U.S.A.
- Waage Sartorius BP 300 S Sartorius Göttingen

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

- Centrifuge Tubes (10ml, 15 ml, 50 ml) Corning, N.Y., USA
- Deckgläser IDL, Nidderau
- Eppendorf-Reaktionsgefäße (Safelock, 0.5, 1.5 ml) Eppendorf, Hamburg
- Kryoröhrchen Nalgene, Brüssel, Belgien
- Objektträger Menzelglaser, 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
- Sephadex G-25-Säulen Boehringer, Mannheim
- Tissue Tek Sakura Finetek, Torrence, U.S.A.
- Zellkulturflaschen (25 cm₂) mit 2µm-Filterkappe Costar, Bodenheim
- Zellkulturflaschen (75 cm₂) mit 2µm-Filterkappe Costar, Bodenheim

2.1.3. Chemikalien

- Aceton Roth, Karlsruhe
- Acrylamid Gi-BRL-Lifetechnologies
Eggenstein
- Agarose Qualex Gold AGS, Heidelberg
- Ammoniumpersulfat (APS) Gibco-BRL-LifeTechnologies,
Eggenstein
- Aquatex Merck, Darmstadt
- Bromphenolblau (BPB) Roth, Karlsruhe

- Casein	Sigma, Deisenhofen
- Chloroform	Roth, Karlsruhe
- Coomassie-Brilliant-Blue-R250	Serva, Heidelberg
- Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Kem-En-Tec, Kopenhagen, DK
- Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
- Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
- Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	Merck, Darmstadt
- Dithiotreitol (DTT)	Gibco-BRL-LifeTechnologies, Eggenstein
- Eisessig (100% Essigsäure)	Merck, Darmstadt
- Ethanol, absolut (EtOH)	J.T. Baker, Deventer, NL
- Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma, Deisenhofen
- Ethylendinitroltetraacetat-dinatriumsalz (EDTA)	Boehringer, Mannheim
- Gelatine	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Glycerin	Boehringer, Mannheim
- Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
- Poly-L-Lysin, Mol. Wt. 1500000-300000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
- Methanol (MetOH)	J.T.Baker, Deventer, NL
- Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
- Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ H ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
- Natriumdodecylsulfat (SDS)	Boehringer, Mannheim
- Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
- Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, St.Louis, U.S.A.
- Rinderserumalbumin	Serva, Heidelberg
- RNase Erase	ICN, Eschwege
- Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
- Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Eurobio Laboratories, Raunheim
- Tetramethylenethylendiamin (TEMED)	Stratagene, Heidelberg
- Trisbase (2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-Propandiol)	Boehringer Mannheim
- Wasserstoffperoxid, 30% (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
- Xylencyanol FF (XC)	Merck, Darmstadt
- Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.4. Reagentien für die Zellkultur

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
mit 1g/l Glucose Cytogen, Berlin
- L-Glutamin (200 mM in 0.85% NaCl) Cytogen, Berlin
- Humanserum Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Ultra-reines Wasser (Seromed) Biochrom, Berlin

2.1.5. Enzyme, Puffer, Antikörper

- anti-MMP-Antikörper British Biotech, Oxford, UK
- Avidin, Peroxidase-konjugiert Jackson ImmunoResearch, U.S.A.
- 5xErststrangpuffer Gibco-BRL-LifeTechnologies,
Eggenstein
- MgCl₂-Lösung (25 mM) USB-AmershamLifeScience,
Braunschweig
- M-MLV-Reverse Transkriptase Gibco-BRL-LifeTechnologies,
Eggenstein
- 10x PCR-Puffer USB-AmershamLifeScience,
Braunschweig
- PCR Optimizer Kit Invitrogen, De Schelp, NL
- RNeasy Mini Kit Quiagen, Hilden
- rRNasin, RNase-Inhibitor Promega, Heidelberg
- Taq-DNA-Polymerase USB-AmershamLifeScience,
Braunschweig
- Vector ABC Elite Kit Vector Laboratories, U.S.A.

2.1.6. Nukleinsäuren

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

2.1.7. Zelllinien und Primärkulturen

Das Material, das uns für immunhistochemische Färbungen zur Verfügung stand, waren zum einen *Kryoschnitte* von zwölf Patienten, die im OP der Neurochirurgischen Universitätsklinik Würzburg operiert wurden. Nach der Entnahme wurde das Tumormaterial routinemässig im Pathologischen Institut der Universität Würzburg histologisch begutachtet. Zur Verwendung der Zellen im Labor wurde eine Einverständniserklärung der Patienten und die generelle Zustimmung der Ethikkommission eingeholt.

Weiterhin wurden *Paraffinschnitte* von drei Primärkulturen auf die verschiedenen MMPs angefärbt, ebenso wie von fünf Zelllinien, die uns freundlicherweise von PD. Dr. T. Pietsch vom Neuropathologischen Institut der Universität Bonn zur Verfügung gestellt wurden.

Sowohl bei den Färbungen der Krystatschnitte als auch bei den Paraffinschnitten wurde als Positiv-Kontrolle für die Matrix-Metalloproteasen Gewebe von chronisch entzündeter Tonsille (OP-Resektat der HNO-Universitätsklinik Würzburg) verwendet. Als Negativ-Kontrolle diente Normalhirnparenchym, welches auf dem operativen Zugangsweg zu einem benignen intrakraniellen Prozeß reseziert werden mußte (Neurochirurgische Universitätsklinik Würzburg).

Zelllinien – Paraffinschnitte

- | | |
|-------------|-------------------------|
| - MHH-Med 1 | AG PD Dr. Pietsch, Bonn |
| - MHH-Med 2 | AG PD Dr. Pietsch, Bonn |
| - MHH-Med 3 | AG PD Dr. Pietsch, Bonn |
| - MHH-Med 4 | AG PD Dr. Pietsch, Bonn |
| - MHH-S8 | AG PD Dr. Pietsch, Bonn |

Dieses Zellmaterial war vorher in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Pietsch aus Bonn wie folgt beschrieben und charakterisiert worden (PIETSCH T., 1994): Die Zelllinien wachsen im mit Humanserum angereicherten Medium als dreidimensionale Sphäroide oder als leicht adhärierende Zellen. Sie sind als undifferenzierte Zellen charakterisiert und exprimieren keine Marker später neuronaler oder glialer Linien, wie z.B. Neurofilamente oder das „glial fibrillary acidic protein“. Auch findet sich keine Expression von MHC-I- und –II-Antigenen auf der Zelloberfläche. MHH-Med 2 und MHH-Med 4 können als permanente Zelllinien beschrieben werden, da sie für länger als 2 Jahre kontinuierlich kultiviert und öfter als 50 mal passagiert wurden. MHH-Med 2 gibt als einzige der Medulloblastom-Zelllinien im Northern-Blot ein positives Signal für Transthyretin-mRNA. Weiterhin exprimiert sie Vimentin und Marke, die als Zeichen für eine frühe neuronale Differenzierung zu werten sind. Dies sind z.B. die Neuronspezifische Enolase, Synaptophysin, GD2 und A₂B₅-Ganglioside. Marker wie Neurofilamente für eine späte neuronale Differenzierung lassen sich hingegen nicht finden. Auch GFAP und Keratin werden nicht exprimiert. MHH-Med 4 zeichnet sich durch eine fehlende Expression von c-myc-Proteins als nukleäres Antigen aus und A₂B₅-Ganglioside werden im Vergleich zu MHH-Med 2 in wesentlich geringerem Masse produziert. Auch Adhäsionsmoleküle und andere Oberflächenmarker fehlen weitgehend. Über die weiteren Zelllinien liessen sich bis dato keine genaueren Beschreibungen finden. MHH-Med 1 und MHH-S8 zeichnen sich jedoch doch eine starke Proliferationsaktivität und ausgeprägte Invasivität aus.

Primärkulturen – Paraffinschnitte

<u>Tumor-Nr.</u>	<u>Geschlecht</u>	<u>Geburtsdatum</u>	<u>OP-Datum</u>	<u>Alter</u>
1913	W	02.08.1987	12.02.1998	12
1885	M	21.12.1988	15.12.1997	8
1680	M	03.08.1989	14.11.1996	7

Tab. 2.1.: *Patientendaten der Primärkulturen für Paraffinschnitte;*

Nativgewebe-Kryoschnitte

<u>Tumor-Nr.</u>	<u>Geschlecht</u>	<u>Geburtsdatum</u>	<u>OP-Datum</u>	<u>Alter</u>
1976	M	12.06.1998	15.06.1998	0
1962	M	04.07.1991	20.05.1998	6
1961	M	26.01.1994	17.05.1998	4
1903	W	04.08.1996	19.01.1998	1
1885	M	21.12. 1988	15.12.1997	8
1729	M	17.11.1991	04.02.1997	5
1725	W	25.07.1983	30.01.1997	13
1680	M	03.08.1989	14.11.1996	7
1652	M	06.01.1996	20.09.1996	0
1580	W	25.03.1991	07.05.1996	5
1557	M	25.12.1990	26.02.1996	5
1532	W	23.10.1993	18.12.1995	2
1913	W	02.08.1987	12.02.1998	12
1974	M	29.01.1996	09.06.1998	2

Tab. 2.2.: Patientendaten des Nativgewebe für Kryoschnitte;

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Für das *Primärmaterial* wurde das im OP der Neurochirurgie Würzburg entnommene Tumormaterial nach der Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Tumore entweder als Nativproben in der Tumorbank der Neurochirurgischen Klinik bis zur weiteren Verwendung zwischengelagert oder zur sofortigen Weiterverarbeitung in Zellkulturmedium (s.u.) in das tumorbiologische Labor gebracht. Dort wurde das Tumormaterial mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert und in einer Zellkulturflasche weiter inkubiert.

Die Kultivierung sowohl der Medulloblastom-Zelllinien als auch der -Primärkulturen wurde unter folgenden Standardkulturbedingungen durchgeführt:

- 37 °C
- 5% CO₂
- 100% relative Luftfeuchtigkeit

Das Zellkulturmedium für Medulloblastome setzte sich zusammen aus:

- 500 ml DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) mit 4.5 g/l Glucose
- + 50 ml Humanserum (bei 4°C und 4000 rpm für 10 min zentrifugiert)
- + 10 ml Glutamin (=3,5 mM)

Grundvoraussetzung für zellbiologische Methoden ist, daß alle Arbeiten mit Zellkulturen unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden.

2.2.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Überschüssiges Zellmaterial, das erst zu einem späteren Zeitpunkt benötigt wird, kann in flüssigem Stickstoff zwischengelagert und eingefroren werden. Hierzu lässt man die Zellen absetzen und kann währenddessen schon die 1ml-Kryoröhrchen, in die die Zellen zur Zwischenlagerung aufgenommen werden, beschriften. Ausserdem wird das Einfriermedium unter Kühlung angesetzt.

Das Einfriermedium setzt sich zusammen aus:

- 4.5 ml Medulloblastom-Medium (s.o.)
- 0.5 ml DMSO 10%

(bei einer benötigten Mediummenge von z.B. 5 ml)

Nach Abpipettieren des Überstandes werden die Zellen im kalten Einfrier-Medium im Becherglas auf Eis aufgenommen. Diese Suspension wird dann zu je 1 ml pro Kryoröhrchen verteilt und sofort auf Eis gestellt. Die Röhrchen werden dann bei -80°C mindestens über

Nacht zwischengelagert und später zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Vor dem Auftauen der asservierten Zellen wird zuerst das Zellkulturmedium im 37°C warmen Wasser vorgewärmt und die Zellkulturmedienflaschen vorbereitet. Die Kryoröhrchen werden dann vorsichtig kurz in 37°C warmes Wasser gehalten ohne dass der Deckel mit dem Wasser in Berührung kommt um einer Kontamination vorzubeugen. Wenn nur noch ein kleiner Eisklumpen zu erkennen ist kann das Zellpellet in der Zellkulturflasche aufgenommen werden. Da das toxische DMSO so schnell als möglich aus dem Medium entfernt werden sollte, lässt man die Zellen in der aufrechtgestellten Flasche absetzen, entfernt den Überstand und gibt frisches Zellmedium dazu. Man setzt die Zellen für 10 min in den Brutschrank um dann nochmals einen Mediumwechsel vorzunehmen. Danach erfolgt die regelrechte Kultivierung der Zellpellets.

2.2.1.3. Sphäroidkulturen von Medulloblastomzellen

Sphäroide sind dreidimensionale, multizelluläre Tumorzellaggregate, die sich – unter Verhinderung von Zelladhärenz an der Zellkulturflasche - in Zellkulturen bilden. Die Sphäroidkulturen wurden je nach Zellmenge in 25 oder 75cm² Zellkulturflaschen kultiviert, der Mediumwechsel wird in einer sterilen Werkbank vorgenommen.

Zum Anlegen der Sphäroidkulturen wurden die - wie oben beschrieben aufgetauten - Zellen in eine 25 cm² Zellkulturflasche mit 4 ml Zellmedium, das auf 37°C vorgewärmt wurde, aufgenommen und für 10 min in den Brutschrank gestellt. Nach Absetzen der Zellen wird ein Mediumwechsel vorgenommen. Dieser wird nach mikroskopischer Beurteilung des Sphäroidwachstums dann alle 2-3 Tage wiederholt. Nach ausreichendem Wachstum wurden die Sphäroide bei Bedarf in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 19 ml Medium umgesetzt. So konnte eine Minderversorgung und folgende Nekrotisierung der Zellen im Zentrum der Sphäroide weitestgehend verhindert werden.

2.2.1.4. Ernten der Zellkulturen

Wenn eine ausreichende Menge an Zellmaterial kultiviert worden ist, so können die Zellen abhängig vom nachfolgenden Verfahren geerntet und vor der Weiterverarbeitung zwischengelagert werden.

Für die Gewinnung von RNA für die *Polymerase-Kettenreaktion* überführt man die Zellen in 15 ml-Tubes und sie lässt gut absetzen. Das überstehende Medium wird vorsichtig entfernt, ca. 5ml 1x PBS zugegeben und die Lösung bei 4°C und 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Abkippen des 1x PBS-Überstandes werden die Zellen - abhängig von der Menge an Zellmaterial – in 350 (bei wenig) bzw. 600 (bei viel Zellmaterial) µl Lysis-Puffer aufgenommen und durch Vortexen völlig gelöst. Nach Zugabe von 3.5 bzw. 6 µl β-Mercaptoethanol (=1%) wird nochmals gevortext. Die Substrate können bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung zwischengelagert werden.

Um Material für die *Zymografie* zu gewinnen, lässt man die Zellen in der Zellkulturmedienflaschen gut absetzen und wäscht sie nach Entfernung des Medienüberstandes zweimal in 1x PBS. Nach Zugabe von serumfreien DMEM-Medium, in das die Zellen die zu untersuchenden Proteine sezernieren, werden sie erneut für 24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Absetzen wird das serumfreie Medium abpipettiert und jeweils 1 ml in beschriftete Caps abgefüllt. Diese können sofort weiterverarbeitet oder ebenfalls bei -20°C zwischengelagert werden.

2.2.2. Histopathologische Aufarbeitung

Zur histologischen Beurteilung der Expression von Matrix-Metalloproteasen in Medulloblastomzellen wurden Spherioide der Zelllinien und der Primärkulturen in Paraffin eingebettet und 10µm dicke Schnitte angefertigt. Das Nativmaterial von 12 Patienten wurde am Kryostaten zu 7µm dicken Kryoschnitten verarbeitet, mit eiskaltem Methanol fixiert und bis zur Färbung tiefgefroren.

2.2.2.1. Paraffinschnitte

Die Herstellung von Paraffinschnitten ist teilweise aufwendiger in seiner Vorbereitung als andere Verfahren, der Vorteil liegt jedoch darin, dass durch dieses Verfahren die Präparate bis zu einer Dicke von 2 µm geschnitten werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 10µm dicke Schnitte verwendet.

Die Spheroidkulturen wurden zur Einbettung nach kurzem Waschen in 1x PBS in 1-2 ml 4%PFA mindestens 24h fixiert. Die *4%ige PFA-Lösung* wird wie folgt hergestellt:

- 2g PFA werden in 50 ml 0.1 M Phosphatpuffer bei 60°C unter ständigem Rühren gelöst und bei Bedarf mit 5 N NaCl auf pH 7.4 eingestellt.
- Zur Gewinnung des 0.1 M Phosphatpuffers wird 0.2 M Phosphatpuffer in einer Verdünnung von 1:2 mit Aqua dest. versetzt.
- Der 0.2 M Phosphatpuffer wird aus 800 ml Lösung A (28,64g Na₂HPO₄ x 12H₂O ad 800ml Aqua dest.) und 200ml Lösung B (3,12g Na₂HPO₄ x 2 H₂O ad 200ml Aqua dest.) hergestellt.

Vor der Paraffinierung wurden die fixierten Spheroide mit Hilfe einer Pasteurpipette auf Parafilm gesetzt und – um später die Lokalisierung zu erleichtern - in einem Tropfen Agar-Gel (0,5g auf 25ml A.d.) eingebettet. Nach Erkalten des Gels wurde der Tropfen auf ein Filterpapierblättchen gesetzt, das dann vorsichtig von allen Seiten eingeschlagen und in eine Einbettkassette gegeben wurde. Bis zum Beginn des Einbettvorganges wurden die Kassetten in 1x PBS aufbewahrt. Die Einbettung erfolgte dann an einem Einbettautomaten, der nach einer automatischen Entwässerung die Paraffineinbettung nach folgendem Programm durchführt:

Schritt	Zeit	Reagenz
1.	20'	50% Ethanol
2.	20'	70% Ethanol
3.	20'	80% Ethanol
4.	20'	90% Ethanol
5.	20'	100% Ethanol
6.	30'	100% Ethanol
7.	30'	Chloroform: 100% Ethanol 1:1
8.	30'	Chloroform: 100% Ethanol 1:1
9.	30'	Chloroform
10.	30'	Chloroform
11.	150'	Paraffin
12.	30'	Paraffin

Nach Durchlauf der einzelnen Schritte mit Abschluß im Paraffin wurden die eingegossenen Spheroide auf der Wärmeplatte vorsichtig aus dem Filterpapier ausgepackt und mit einem Skalpell in die mit Glycerin eingefetteten und auf 63°C erwärmten Metalleinbettchalen

übertragen. Die Schalen mit den Präparaten wurden dann schrittweise mit Paraffin ausgegossen und zur Abkühlung auf eine Kühlplatte gestellt. Nach Aushärtung konnten die Blöcke aus der Form herausgelöst werden.

Von den auf Eis gekühlten Blöcken wurden an einem Schlittenmikrotom 10µm dicke Schnitte angefertigt. Hierzu wurden die Blöcke parallel mit der Oberfläche zur Messerkante des Mikrotoms gespannt und die Schnitte danach zur Streckung in ein warmes Wasserbad überführt. Danach wurden sie auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgebracht und über Nacht in einem Trockenschrank bei 37°C getrocknet. Vor der Färbung wurden die Präparate zur Entparaffinierung 2 mal 15 Minuten in Xylol getaucht.

2.2.2.2. Kryostatschnitte

Die Vorteile eines Kryostaten liegen darin, dass zum einen das Material schonender aufgefroren werden kann und auch unfixiertes Material leichter geschnitten werden kann. Dies kommt vor allem bei immunhistologischen Untersuchungen von Antigenen zur Anwendung, deren Struktur somit weniger denaturiert wird, wie es bei Fixierung u.ä. der Fall sein kann. Das während der OP entnommene Material wurde sofort schockgefroren und danach bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. So kann das Material über längere Zeit gelagert werden ohne dass eine Denaturierung zu befürchten ist.

Die Gefrierschnitte wurden unter vorsichtigem Auftauen auf Trockeneis am Kryostaten mit einer Temperatur von -24°C in 7µm dicke Schnitte geschnitten und auf die Objektträger übertragen. Danach wurden sie über Nacht getrocknet, 10 min in Aceton fixiert, anschließend nochmals für 2 Stunden getrocknet und schließlich bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. RNA-Isolierung mit RNeasy Mini Kit

Um mit Nucleinsäuren in Form von DNA oder RNA arbeiten zu können, muss man diese erst aus den jeweiligen Zellen isolieren. Die Zellen müssen vorsichtig geöffnet werden ohne dass dabei die DNA-Moleküle zerstört werden. Hierfür gibt es verschiedene Verfahren. Innerhalb

dieser Arbeit wurde hierfür der RNeasy Mini Kit verwendet. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Die Zellen werden wie oben beschrieben zur RNA-Isolierung geerntet und können bei -20°C zwischengelagerten Zellen werden. Zur weiteren Verarbeitung werden sie vorsichtig aufgetaut und bei Raumtemperatur folgendermaßen aufgearbeitet:

- Zu dem Überstand werden, abhängig von der Menge des Lysis-Puffers, 350 bzw. 600 μl Ethanol (70%) gegeben. Die Lösung wird mit der Pipette aufgemischt bis sie homogen ist.
- Das Homogenisat wird auf eine Säule gegeben und für 15 sec. bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Auslauf wird verworfen und der Vorgang, falls nicht alles auf eine Säule geht, nochmals wiederholt.
- Auf die Säule werden dann 700 μl Waschpuffer RW1 gegeben, erneut 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen
Die Säule wird in ein neues 2 ml-Tube gestellt (deckellose Tubes sind im Kit enthalten)
- Danach werden 500 μl Waschpuffer RPE auf die Säule gegeben, 15 sec bei 10000rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen
- Nach erneuter Zugabe von 500 μl Waschpuffer RPE auf die Säule wird 2 min lang bei 14000 rpm zentrifugiert und das Substrat in ein neues 1,5 ml Tube gegeben
- Anschließend werden 50 μl RNase-freies H_2O direkt auf die Mitte der Säule pipettiert, 5 min stehengelassen und dann 1 min bei 10000 rpm abzentrifugiert
- Nochmals werden 50 μl RNase-freies H_2O auf die Säule gegeben und 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert

Im unteren Tube befinden sich nun 100 μl DEPC-water mit darin gelöster RNA.

2.2.3.2. Photometrische Quantifizierung der aufgereinigten RNA

Das Lambert-Beersche Gesetz beschreibt die Extinktion elektromagnetischer Strahlung mit einer vorgegebenen Wellenlänge, über die dann Aussagen über die absorbierenden Moleküle ermöglicht werden. Voraussetzung ist hierbei, dass diese in der Lösung homogen verteilt sind. Die mit dem Photometer gemessene Extinktion (E) einer Lösung ist proportional der Konzentration (c) der darin gelösten lichtabsorbierenden Substanz, ihrem Extinktionskoeffizienten (ϵ) und der Schichtdicke (d) der Lösung:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion

ϵ = spezifischer Extinktionskoeffizient (ml/g • cm)

c = Konzentration der Lösung (g/100 ml)

d = Schichtdicke (cm)

Zur photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration wird ein Zweistrahlphotometer mit einer Quecksilberniederdrucklampe als Lichtquelle verwendet. Bei einer bestimmten Konzentration von Proteinen kann man über das Photometer bei einer festgelegten Wellenlänge ein konstantes Abhängigkeitsverhältnis zwischen der Extinktion und Proteinkonzentration zeigen. Dies wird zur Reinheitskontrolle der gewonnenen RNA genutzt, da RNA und Proteine sich in ihren spektralen Eigenschaften unterscheiden. Das Extinktionsminimum von RNA liegt bei 260 nm, Proteine hingegen haben ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Bei einer reinen Probe sollte der Quotient der OD_{260}/OD_{280} in der Regel zwischen 1.8 und 2.0 liegen. Abweichungen nach unten ($< 1,8$) sind auf eine Verunreinigung mit Proteinen zurückzuführen.

Zur photometrischen Quantifizierung der RNA wird wie folgt vorgegangen:

Um die Referenz am Photometer auf 0 einzustellen, wird der Leerwert einer Küvette mit H_2O gemessen. Dann kann die Absorption (OD) der verschiedenen Proben bei 260 nm gemessen werden, wozu $10\mu\text{l}$ der frisch isolierten RNA-Lösung mit $990\mu\text{l}$ H_2O verdünnt werden. Die Absorption, bei der $OD_{260} = 1$, beträgt bei einer Schichtdicke von 1cm für RNA $40\mu\text{l/ml}$. Somit lässt sich mit der Formel:

$$\frac{OD_{260} \times 40\mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnung} (=100) \times \text{Menge der RNA-Lösung} (=0.1\text{ml})}{100}$$

100

berechnen, wieviel RNA in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sich in der verwendeten Ausgangslösung befindet.

2.2.3.3. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die Herstellung einer cDNA wird die entsprechende mRNA, die vorher aus definiertem Gewebe oder Zellen isoliert worden ist, als Ausgangsmaterial verwendet. Die mRNA wird anschliessend mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in einen komplementären cDNA-Strang umgeschrieben, die sogenannte Erststrangsynthese. Um diese Funktion erfüllen zu können, benötigt die Transkriptase einen Startpunkt, von dem aus die Umschreibung der mRNA in cDNA beginnen kann. Hierzu stehen diverse Primer zu Verfügung. Oft werden

sogenannte Oligo-dT-Primer bevorzugt verwendet, da diese am 3'-Ende der RNA binden und die komplette RNA in DNA umgeschrieben wird. Andere Primer greifen an verschiedenen Stellen der RNA an, das Endprodukt besteht deswegen aus mehreren kurzen Sequenzen. Das Enzym, das bei der Transkription verwendet wurde, ist vorher aus einem murinen Maloney-Leukämie-Virus (M-MLV) isoliert worden.

Ingesamt wird für die cDNA-Synthese 1µg gesamtzelluläre RNA in 5µl DEPC-H₂O gelöst eingesetzt. Sollte die RNA-Konzentration zu gering sein, so muß ein größeres Volumen an gelöster RNA in der Speedvac eingetrocknet werden um insgesamt das Ausgangsvolumen von 5µl zu erhalten. Zu diesem werden dann 3µl PrimerMix, der zuvor aus 2µl Oligo-dT-Primer (1µg /µl) und 1µl Random-Hexamer-Primer angesetzt wurde, gegeben, 10 min bei 65°C inkubiert und dann auf Eis abgeschreckt. Durch diesen Vorgang lagern sich auf der gesamten RNA zufallsmässig Startsequenzen (Primer) für die folgende Strangverlängerung an. Nach einem kurzen Quickspin werden auf Eis 17µl Mastermixes pro Ansatz hinzugegeben und für 70 min bei 37°C inkubiert.

1x Mastermix: 5.0µl 5x Erststrangpuffer
 2.5µl DTT (0.1M)
 2.5µl dNTP-Mix (je 2.5mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
 0.8µl rRNasin (40U/µl)
 1.0µl M-MLV-Reverse Transkriptase (200U/µl)
 ad 17µl DEPC-H₂O

Um das Enzym zu denaturieren, wird der Ansatz 5 min auf 95°C erhitzt und danach 1-2 min auf Eis abgeschreckt.

Man erhält so ein Gesamtvolumen von 25µl fertiger cDNA, die bei -20°C gelagert und zur PCR genutzt werden kann.

2.2.3.4. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren der Molekularbiologie, die es in Verbindung mit der Reversen Transkription ermöglicht, selektiv bestimmte DNA-Abschnitte zu amplifizieren. So können ausgehend von auch nur schwach exprimierten RNA-Sequenzen geringe DNA-Mengen durch mehrmalige Wiederholung des Vorganges nachgewiesen und untersucht werden. Hierzu werden zwei einzelsträngige Oligonukleotide aus 20-30 Basenpaaren benötigt, die zu den zu

untersuchenden Abschnitten komplementär sind, und verwendet sie als Primer für die DNA-Synthese. Ausser den Primern und der DNA-Matrize gehören zu der Reaktion auch eine wärmebeständige DNA-Polymerase wie die thermostabile DNA-Polymerase Taq aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, die 1988 entdeckt und isoliert (SAIKI R.K., 1988) wurde. Hitzestabile Taqs haben den Vorteil, dass die Reaktionen bei hohen Temperaturen gefahren werden können und so Artefakte aufgrund von Sekundärstrukturen minimiert werden. So werden mit diesem Enzym bestimmte cDNA-Sequenzen bei einer festgelegten Temperatur von 72°C mit hoher Spezifität und großer Ausbeute durch die PCR-Methode amplifiziert. Weiterhin ist eine ausreichende Menge an frei vorliegenden Desoxyribonukleotideinheiten (dNTPs) sowie verschiedene Puffer und Salze (wie z.B. Magnesium-Ionen) erforderlich um die Fähigkeit der DNA-Polymerasen zu nutzen.

Zunächst wird der Doppelstrang durch Erhitzen in 2 komplementäre Einzelstränge zerlegt. An diese binden dann auf jeweils einer Seite die Primer im Abstand von ca. 180 bis 580 bp auf Höhe der zu amplifizierenden Sequenzen. Von diesen ausgehend erfolgt die Verlängerung des Stranges in 5'→3'-Richtung (entgegengesetzt der 3'→5'-Polarität des ursprünglichen DNA) durch Bindung der freien 3'-OH-Gruppe der Oligonukleotide mit dem innersten Phosphoratom des zugesetzten dNTPs. Die DNA-Polymerase katalysiert die Bildung einer solchen Phosphordieesterbrücke jedoch nur, wenn die Base des neuen Nukleotids zu der Base auf dem Matrizenstrang komplementär ist. Durch die Verwendung der Taq-Polymerase lässt sich der Vorgang automatisieren, da man nach den einzelnen Denaturierungsschritten nicht erneut die Polymerase zusetzen muss, wie es bei hitzeinstabilen Enzymen der Fall wäre. Trotzdem nimmt im Laufe der Durchgänge auch Aktivität der hitzestabilen Taq-Polymerase ab, dem kann man aber vorbeugen, indem man neues Enzym zugibt und die Effektivität der DNA-Sequenzierung beibehält. So wird durch mehrmalige Wiederholung des Vorgangs mit derselben Reaktionsmischung bei jedem Zyklus die Substratmenge verdoppelt und insgesamt somit die spezifischen DNA-Fragmente exponentiell angereichert:

$$(n \text{ Zyklen} \Rightarrow 2^n \text{ Kopien})$$

Zusammenfassend lässt sich ein Zyklus der PCR-Methode in 3 Schrittabfolgen einteilen:

1. Start der Reaktion mit einer Temperaturerhöhung auf 92-98°C. Dieser Schritt dient der *Denaturierung* der DNA, die bis dahin noch in ihrer komplexen Form vorliegt, in ihre Einzelstränge.
2. Folgender Schritt der Reaktion ist das sogenannte *Annealing* der Primer. Man muss hierbei beachten, dass die Temperatur wieder soweit gesenkt wird, dass sie für die Oligonukleotide optimal ist. Sie lässt sich folgendermassen errechnen:

$$T = [(\text{GC-Gehalt}) \times 4 + (\text{AT-Gehalt}) \times 2] - 5$$

Die Anlagerung der Primer an den entsprechenden Abschnitt der Einzelstränge bestimmt die Spezifität der PCR.

3. Nach dem Annealing wird die Temperatur wieder auf ein Aktivitätsoptimum von 72°C für die Taq-Polymerase erhöht wodurch dann auch die schnelle *Polymerisation* mit Verlängerung der Primer erfolgt.

Wichtig ist hierbei auch, dass man für die zwei letzten Schritte genügend Zeit einräumt. Bei grossen PCR-Produkten muss die Zeit entsprechend verlängert werden, damit die DNA-Fragmente komplett synthetisiert werden, denn nur vollständig verlängerte DNA-Stränge können in den weiteren Durchgängen als Matrizen dienen.

Semiquantitative PCR: Vor Durchführung einer PCR einer bestimmten zu untersuchenden cDNA sollte erst der Wirkungsgrad der vorangegangenen cDNA-Synthese nachgewiesen und überprüft werden. Dazu wird zuerst eine PCR mit GAPDH-spezifischen Primern durchgeführt. Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Enzym des Glycolyestoffwechsels und katalysiert die Oxidierung mit Übertragung des Wasserstoffs auf $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$ und gleichzeitig Phosphorylierung des Glycerinaldehydphosphats zu 1,3-Diphosphoglycerat. Da die Glycolyse für alle Zellen ein essentieller Stoffwechselvorgang ist, ist somit eine regelmäßige GAPDH-Expression zu erwarten und die einzelnen Proben können so gut miteinander verglichen und bei Bedarf aneinander angeglichen werden.

Für die GAPDH-PCR werden 3µl der zu testenden cDNA, als Positivkontrolle bereits getestete cDNA und als Negativkontrolle H₂O mit 47µl Mastermix vermischt. Ein PCR-

Ansatz hat ein Gesamtvolumen von 50 μ l; Der Mastermix setzt sich *pro Ansatz* wie folgt zusammen:

1x Mastermix:	5.0 μ l	10x PCR-Puffer
	10 μ l	5xTaq-Master
	4.0 μ l	dNTP-Mix (je 2.5mM)
	0.5 μ l	GAPDH-sense Primer (20 μ M)
	0.5 μ l	GAPDH-antisense Primer (20 μ M)
	0.2 μ l	Taq-DNA-Polymerase (5U/ μ l)
	ad	47 μ l H ₂ O

Zunächst wird ein Mastermix nach oben aufgeführtem Schema angesetzt. Dieser Mastermix wird zu der cDNA gegeben und im Thermocycler amplifiziert (Bedingungen siehe Tab. 2.3.). Es erfolgt danach eine erste elektrophoretische Auftrennung und Auswertung der Banden. Dies ist dafür wichtig, dass die cDNA-Menge der einzelnen Proben abgeschätzt, verglichen und eventuell aneinander angeglichen werden können. So kann man in folgenden PCR-Durchgängen davon ausgehen, dass der cDNA-Gehalt in den verschiedenen Proben gleich ist. Man überprüft dies durch erneute GAPDH-PCRs bis die Bandenintensitäten der verschiedenen Ansätze übereinstimmen. Dies hat den Vorteil, daß man in allen folgenden PCRs aufgrund der resultierenden Unterschiede in den Bandenintensitäten der untersuchten Gene Aussagen über das jeweilige – schwache oder stärkere - Ausmaß der Expression machen kann.

Teilweise unterscheiden sich, je nach Primer- und Genstruktur, die optimalen PCR-Bedingungen z.B. in der Temperatur oder in der Magnesiumkonzentration. Deswegen war in vorangehenden Experimenten schon für die zu untersuchenden Gene der Mastermix leicht verändert und ein sogenannter PCR-Optimierungs-Kit verwendet worden. So wurde versucht, für alle untersuchten Gene die Bedingungen zu optimieren und genaueste Ergebnisse zu erzielen (WAGNER S., 1999).

Ein weiterer Unterschied in den PCR-Bedingungen findet sich, wie schon oben erwähnt, bei den verschiedenen Anlagerungs-Temperaturen der einzelnen Primer-Paare, aber auch in der Anzahl der Amplifikationscyclen. Die Amplifikation verläuft nur bis zu einem bestimmten Punkt exponentiell, dann wird ein Plateau erreicht. Wird bei der PCR diese Plateauphase erreicht, so können die Bandenstärken der untersuchten Genprodukte gleiche Intensität aufweisen obwohl ursprünglich eine unterschiedliche cDNA-Menge vorliegt. Der Zeitpunkt

des Übergangs in die Plateauphase ist wiederum von der Ausgangszahl der amplifizierten Moleküle abhängig (KELLOG D.E., 1990). Da bei der GAPDH die Plateauphase aufgrund der starken Expression von mRNA schneller erreicht ist als bei geringer exprimierten mRNAs, muß – um potentiell quantitative Unterschiede in der Expression von mRNA erfassen und analysieren zu können– die Anzahl von durchlaufenen Zyklen so gewählt werden, daß einerseits das Produkt nachweisbar ist, andererseits die Plateauphase sicher noch nicht erreicht ist. Die jeweiligen besten Bedingungen mit den spezifischen Zykluszahlen und Temperaturen für die verschiedenen PCR-Produkte werden deshalb in vorgeschalteten Experimenten ermittelt und analysiert. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 2.3. zu sehen:

	Primersequenz	Anlagerungstemperatur	Puffer-System	Endkonzentration MgCl ₂	Zykluszahl	Amplifikat
GAPDH	s GCAGGGGGGAGCCAAAAGGG a TGCCAGCCCCAGCGTCAAAG	68.0 °C	USB	2.5 mM	20	567 bp
MMP-2	s TTTCCATTCCGTTCCAGGGCACAT a TCGCACACCACATCTTTCCGTCCT	68.0 °C	USB	2.5 mM	30	253 bp
MMP-3	s ATTTATTTCTCGTTGCTGCTCATGA a TATGTTTTGTTCTTTTCCTTATCAG	60.0 °C	D	3.5 mM	40	573 bp
MMP-7	s CGATGAGGATGAACGCTGGACGGAT a TTGCTAAATCGAGTCGAGGAACAGTG	68.0 °C	J	2.5 mM	35	315 bp
MMP-9	s GCGCTGGGCTTAGATCATTCCTCA a GCAGCGCGGGCCACTTGTC	63.3 °C	F	2.0 mM	35	475 bp
MMP-12	s CCGGGCAACTGGACACATCTACC a CCACGGGCAAAAACCACCAA	60.0 °C	USB	2.5 mM	37	271 bp

Tab. 2.3: Optimierte PCR-Bedingungen für die verschiedenen Gen-Produkte;

2.2.3.5. Gelelektrophorese von DNA

Die Gelelektrophorese ist ein äusserst wichtiges Verfahren der Gentechnik, da man mit ihr Nukleinsäurefragmente direkt sichtbar machen und somit Genstrukturen einer quantitativen und qualitativen Analyse unterziehen kann. Hierbei werden die geladenen Teilchen eines Substanzgemischs gemäss ihren Ladungen und Grössen – und somit elektrophoretischen Beweglichkeit - in einzelne Zonen aufgeteilt. Nucleinsäuren tragen an ihren Phosphatgruppen im Phosphodiesterückgrat viele negative Ladungen. Sie sind deshalb bei einem neutralen pH anionisch und wandern im elektrischen Feld auf die positive Elektrode zu.

Wenn man die DNA-Proben auf ein Gel aufgetragen hat, legt man die Spannung an und lässt die Proben durch das Gel laufen. Ein Farbmaler, hier Bromphenolblau, wird zugesetzt um

die Lauffront beobachten zu können und ein Überschreiten der Gelgrenze und somit Verlust der Fragmente zu verhindern. Um die Molekülgrösse auch unbekannter Fragmente abschätzen zu können, lässt man weiterhin Standardmarker mit bekannter Grösse mitlaufen. Hierbei ist die zurückgelegte Wegstrecke umgekehrt proportional zum \log_{10} der Anzahl der Basenpaare, d.h. je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller wandert es im Gel. Nach der Auftrennung werden die DNA-Fragmente im Gel über den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr) angefärbt. Sie sind dann unter UV-Licht als Banden gut erkennbar.

Die Auftrennung der DNA-Sequenzen erfolgt in einem 1.5%-igen Agarosegel. Hierzu wird 1.5g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer gegeben und die Mischung in der Mikrowelle solange vorsichtig aufgekocht, bis keine Schlieren mehr zu erkennen und das Produkt ganz klar ist. Man lässt die Mischung kurz abkühlen und nach Zugabe von EtBr-Lösung (10 μ l pro 100 ml) gießt man das Gel luftblasenfrei in die Gelkammer. Wenn das Gel fest und erkaltet ist, wird die Laufkammer mit Laufpuffer (1x TAE-Puffer) gefüllt, bis das Gel gerade bedeckt ist. 17 μ l des PCR-Amplifikationsprodukt werden mit 3 μ l des sechsfach konzentrierten DNA-Ladepuffer versetzt, vorsichtig aufgemischt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wird der DNA-Längenstandard X aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt dann durch Anlegen einer Spannung von 80-100mV. Die Elektrophorese wird, wie oben erwähnt, beendet, wenn die Bromphenolbande des Laufpuffers beinahe am Gelende angelangt ist.

50x TAE-Puffer:	242g Tris
	51 ml Eisessig
	100 ml EDTA (0.5 M; pH 8.0)
	EtBr-Stammlösung (10 mg/ml H ₂ O)
	6x DNA-Ladepuffer (30% Glycerin, je 0.25% BPB und XC)
	DNA-Längenstandard X

2.2.4. Proteinbiologische Methoden

Nachdem mittels der oben angeführten Methoden untersucht wurde, ob Medulloblastomzellen auf genetischer Ebene für die jeweiligen MMPs die Voraussetzungen erfüllen, folgte als nächster Schritt eine Analyse auf proteinbiologischer Ebene. Hierzu wurden Immunhistochemie und Zymografie verwendet. Mit diesen Methoden lässt sich belegen, ob die vorhandene genetische Information mittels Transkription und Translation in die

entsprechenden Proteine umgesetzt wird. Weiterhin können durch die IHC-Färbungen die Lokalisation im Gewebe dargestellt und somit eventuell auch Rückschlüsse auf Funktion der MMPs gezogen werden. Über die Zymografie kann weiterhin zwischen aktiven und inaktiven Enzymen unterschieden werden.

2.2.4.1 Immunhistochemie (IHC)

Immunhistochemische Verfahren ermöglichen es, über immunologische Vorgänge spezifische Komponenten von Zellen wie z.B. auch Proteine, darzustellen und untersuchen. Man nutzt bei diesem Verfahren die Eigenschaften immunologischer Reaktionen zum Nachweis von zellulären Antigenen. Hierbei kann man das Substrat sowohl direkt als auch indirekt nachweisen. Bei der indirekten Methode, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, bindet ein antigenspezifischer unkonjugierter Antikörper (AK) an das gesuchte Antigen (hier MMP). Diese Bindung wird dann visualisiert, indem ein markierter sekundärer Antikörper verwendet wird, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Dieser Sekundär-Antikörper führt dazu, daß nach Zugabe eines Substrates eine Farbreaktion eintritt, die dann an der Stelle des nachzuweisenden Antigens ein Signal abgibt. Von Vorteil ist hierbei, dass durch die Verwendung von zwei Antikörpern das Signal verstärkt wird und somit die Sensitivität gegenüber der direkten Methode höher ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Nachweis von Matrix-Metalloproteinasen an Paraffin-Schnitten von Zelllinien- und Primärzell-Kulturen, sowie an Kryoschnitten von Nativmaterial durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle dienten hierbei Schnitte von entzündeter Tonsille, die Negativ-Kontrolle erfolgte anhand Schnitten von Normalhirn. Untersucht wurde die Expression von MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 und MMP-12. Dabei wurde die Avidin-Biotin Peroxidase-Methode angewendet, mit primären AK gegen MMP und biotinyliertem Sekundär-AK (Vector ABC Elite Kit). Die primären AK richten sich sowohl gegen die Pro- als auch die Aktiv-Form. Avidin ist ein basisches Glycoprotein von 68 kD mit einer sehr hohen Affinität für das Vitamin Biotin (244 Dalton). Bei der Markierung der MMPs wird diese Eigenschaft genutzt. Die feste Bindung erfolgt bei der Zugabe des Sekundärantikörpers, dessen Biotin an vier Bindungsstellen des Avidin-Moleküls bindet. Um die Position der MMPs noch verstärkt zu markieren wurde weiterhin die Peroxidase-Reaktion mit 0.5% Diaminobenzidin entwickelt. Hierbei entstehen Antikörper-Enzym-Konjugate, wobei im letzten Schritt das Enzym Peroxidase mit chromogenem DAB sichtbar gemacht wird.

Die Primärantikörper für die MMPs wurden uns freundlicherweise von der Firma British Biotech zur Verfügung gestellt und waren folgende:

MMP-2	(Gelatinase A)	Klon 1A10	2 µg/ml
MMP-3	(Stromelysin-1)	Klon 10D6	2 µg/ml
MMP-7	(Matrilysin)	Klon 7E4	1 µg/ml
MMP-9	(Gelatinase B)	Klon 4H3	0.5 µg/ml
MMP-12	(Makrophagen Elastase)	Klon 4D2	8 µg/ml

Die idealen Konzentrationen waren für jeden Primärantikörper bereits in vorangegangenen Experimenten speziell für Hirntumorgewebe herausgefunden worden. Die Antikörper erkennen sowohl die Pro- als auch die aktive Form der MMPs, eine Unterscheidung der Formen nach der Färbung der Schnitte ist jedoch nicht möglich.

1A10 (IgG2) ist ein Maus monoklonaler Antikörper gegen gereinigte humane rekombinante Gelatinase A und wird von transfizierten CHO-Zellen produziert.

10D6 (IgG1) ist ein Maus monoklonaler Antikörper gegen gereinigtes rekombinantes Stromelysin-1 von transfizierten CHO-Zellen.

7E4 (IgG1) ist ein muriner monoklonaler Antikörper gegen rekombinantes Matrilysin, in CHO-Zellen produziert.

4H3 (IgG1) ist ein Maus monoklonaler Antikörper gegen humane rekombinante Gelatinase B, die ebenfalls von transfizierten CHO-Zellen produziert wurde.

Vor Beginn der immunhistochemischen Färbung werden die Schnitte zur Entfernung des Paraffins für 2 mal 15 min in Xylol getaucht und dann in einer absteigenden Alkoholreihe fixiert. Dieser Schritt ist bei Kryoschnitten von Nativgewebe nicht nötig, sie werden – nachdem sie aufgetaut und für 1.5 h luftgetrocknet wurden – lediglich für 10 min in Aceton fixiert. Nach kurzem Waschen in 1x PBS (pH 7.5) und Lufttrocknen wurden die Schnitte mit einem PAP-Pen eingegrenzt. Der weitere Ablauf der IHC-Färbung ist folgendermaßen:

- Blockieren mit 10% normalen Pferdeserum für 30 min bei RT. Mit diesem Schritt will man unspezifische Bindungsstellen zu reduzieren. Durch Vernetzung von Strukturen liegen häufig gesuchtes Antigen und andere, ähnliche Antigene nah beieinander und es besteht die Gefahr, daß man auch diese anfärbt und das Ergebnis verfälscht.
- Entfernen des überschüssigen Normalserums durch vorsichtiges Abtupfen.

- *Kryoschnitte*: Inkubation mit dem Primärantikörper für 12 h bei 4°C in der feuchten Kammer;
- *Paraffinschnitte*: Inkubation mit Primärantikörper für 7 min bei 300 W in der Mikrowelle. Zum einen können so Antigenvernetzungen, die durch die Fixierung entstanden sind, gelöst werden als auch das gesuchte Antigen herausgelöst und für den Primär-Antikörper zugänglicher gemacht werden.
- Nach Abkühlen der Schnitte bzw. nach 12-stündiger Inkubation werden sie für 2 x 5min in 1xPBS gewaschen und mit einem biotinylierten Pferde-anti-Maus IgG Sekundär-Antikörper für 1.5h bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert.
- Nach erneutem Waschen für 2 x 5min in 1xPBS folgt die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex für 30 min und erneutes Waschen in 1xPBS (2 x 5min)
- Die Peroxidase Reaktion wird mit 0.5% Diaminobenzidin (DAB, 80µl/Schnitt) für 5-10min entwickelt und nach 10minütigem Spülen in Wasser die Objektträger mittels Aquatex durch Deckgläschen abgedeckt.

Die semiquantitative Auswertung der Färbungen erfolgte durch Herrn Dr. G.H. Vince und die Autorin an einem histologischen Mikroskop.

2.2.4.2. Zymografie

Die Zymografie ist eine weitere Möglichkeit um die Expression eines Proteins zu untersuchen. Nach genetischer Transkription und Translation werden Proteine nicht unbedingt sofort von den Zellen sezerniert, teilweise werden sie intrazellulär in Vesikeln gespeichert. Bei den immunhistochemischen Färbungen werden sowohl die gespeicherten als auch die sezernierten Proteine angefärbt, eine Unterscheidung ist nicht möglich. Die Zymografie weist jedoch nur die in das serumfreie Medium sezernierten Proteine nach. Ein weiterer Vorteil gegenüber der IHC liegt darin, daß sie eine Unterscheidung zwischen den aktiven und inaktiven Formen und somit dem Aktivitätsstatus der Proteasen erlaubt.

Zur Durchführung der Zymografie wird der Zellkulturüberstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel (LAEMMLI U.K, 1970) aufgetragen, in dem das Produkt des zu untersuchenden Enzym gelöst ist. Bei MMP 2 und MMP 9 ist dies Gelatine, zur Untersuchung von MMP 3 und MMP 7 wird Kasein verwendet. Ähnlich wie bei der DNA-Gelelektrophorese werden dann durch Anlegen von elektrischer Spannung die Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das denaturierte SDS wird anschließend

herausgewaschen, das Gel in einem enzymespezifischen Puffer inkubiert und anschließend mit COOMASSIE-Brilliant Blue-R250 angefärbt. Dort, wo das entsprechende Proteinsubstrat durch die Proteasenaktivität abgebaut wurde, ist eine klare Bande zu sehen, wohingegen das nicht abgebaute Proteinsubstrat im Gel durch den Farbstoff angefärbt wird.

Eine wichtige Voraussetzung vor der Durchführung einer Zymografie ist die *Proteinbestimmung*. Proteinproben beinhalten oft eine komplexe Mischung aus verschiedenen Proteinen und sie können sich auch in ihrem Proteingehalt stark unterscheiden. Bei diesem Schritt werden die eingesetzten Proteinmengen der einzelnen Proben des Medienüberstandes bestimmt und aneinander angeglichen. So kann man davon ausgehen, dass die erhaltenen Ergebnisse miteinander vergleichbar sind. Bei der Proteinbestimmung nach Bradford (BRADFORD M.M., 1976) wird der Proteingehalt quantitativ über eine Farbreaktion funktioneller Gruppen der Proteine mit farbstoffbildenden Reagenzien ermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierbei COOMASSIE-Brilliant-Blue-G250 verwendet. Bei diesem Farbstoff verschiebt sich sein Absorptionsmaximum beim Vorhandensein von Proteinen von 465 zu 595nm. Man vermutet, dass dies auf eine Stabilisierung des Farbstoffes durch eine Komplexbildung mit basischen Aminosäuren der Proteine zurückzuführen ist. Hier wurde ein Zehntel des gewonnenen konzentrierten Medienüberstandes eingesetzt. Die Intensität des Farbstoffes korreliert dann somit direkt mit der Konzentration der Proteine. Unter Verwendung von BSA-Standardlösungen ergibt sich eine Eichgerade, mit deren Hilfe man die absoluten Proteinmengen ermitteln kann. Diese Lösungen werden mit der entsprechenden Menge 5x Färbelösung nach Bradford (Roti®-Quant) vermischt und bei RT für 30 min inkubiert. Anschließend wird die Absorption der Proben mittels einer Lichtquelle von 595 nm Wellenlänge gemessen. Mittels der BSA-Eichgerade können dann die Proteinmengen der einzelnen Proben verglichen und einander angeglichen werden.

Die eigentliche Zymografie erfolgt dann in der *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)*, bei der die angeglichenen Proteinmengen der Medienüberstände mittels Elektrophorese in einem Gel aufgetrennt werden.

- Zur Vorbereitung die zwei Glasplatten, zwischen die später das Gel gegossen wird, mit EtOH (evtl. vorher mit Scheuermittel) reinigen;
- Beide Platten mit Klemmen befestigen und Spacer am Rand einsetzen;
- 1%-Agarose im 1x SDS-Laufpuffer aufkochen
- Glasplatten mit der Agarose am Boden und an den Seiten abdichten;

Gelatine-Zymographie: Diese Zymografie erfolgt zum Nachweis der Gelatinasen A und B (MMP-2 und MMP-9). Deswegen wird das Substrat Gelatine (1 mg/ml) in das SDS-Polyacrylamidgel eingesetzt.

Lösung für 2 Untergele:

- 4.66 ml 30% Bis-Acrylamid
- 3.5 ml 1,5M Tris pH 8.8/4% SDS
- 4.66 ml angewärmte Typ I Gelatine
- 1 ml dH₂O
- 140 µl 10% Ammoniumpersulfat APS
- 7 µl TEMED

Dieses Gel wird unverzüglich bis ca. 1 cm unter der Kammkante zwischen die Glasplatten gegossen und, um eine gerade, luftblasenfreie Oberfläche zu erhalten, mit ca. 1ml H₂O überschichtet. Man lässt das Gel ca. 30 bis 45 min polymerisieren, dann wird das H₂O vorsichtig ausgegossen bevor das Sammelgel auf die Untergele gegossen wird.

Lösung für 2 Sammelgele:

- 1 ml Bis-Acrylamid (30%)
- 2.75 ml H₂O
- 1.25 ml 4x Puffer 0.5 M TrisHCl/4% SDS; pH 6.8
- 50 µl APS
- 2.5 µl TEMED

Direkt nachdem das Untergel mit dem Sammelgel überschichtet wurde, wird der Kamm luftblasenfrei eingesteckt. Nach 30-45 min Polymerisation wird das Gel zwischen den zwei Glasplatten in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und mit Elektroporesepuffer (25mM Tris, 250 mM Glycin, 0.1% BPB) übergossen. Erst dann wird der Kamm vorsichtig gezogen und pro slot 15µl Proteinlösung, die vorher mit 5µl erwärmten Probenpuffer (0.25 M Tris, 50% Glycin, 3% SDS, 0.1% BPB) versetzt wurden, aufgetragen. Unter Kühlung des Puffers wird die Elektrophorese für 3 bis 5 h bei 30 bis 80 mA durchgeführt.

Anschließend werden die Klemmen entfernt, die Glasplatten vorsichtig auseinandergedrückt, das Gel von den Platten gelöst und für 30 min in 2.5% TritonX-100 geschwenkt, um das denaturierende SDS rauszuwaschen. Danach wird das Gel für 24 h bei 37°C in Enzympuffer

(50 mM TrisHCl, pH 8.0 und 5 mM CaCl₂) inkubiert. Nach Inkubation wird das Gel 45 min lang in Färbe-/Fixierlösung (50% MetOH, 10% HOAc, 0.1% COOMASSIE-Blue-R250) geschwenkt und danach für 60 min mit Entfärbelösung (10% EtOH, 7% HOAc in dH₂O) behandelt. Auf einer hellen Unterlage mit starker Lichtquelle sind nun die durch die Enzymaktivität hervorgerufenen hellen Banden im ansonsten blauen Gel gut zu erkennen und einer Analyse zugänglich. Mittels eines vorgefärbten Molekulargewichts-Standard kann man die Banden der entsprechenden Gelatinase zuordnen. Durch das SDS werden ebenfalls die normalerweise inaktiven Proformen der Gelatinasen aktiviert (STETLER-STEVENSON W.G., 1989), sie bilden jedoch eigene Banden und sind somit von den aktivierten Proteasen gut zu unterscheiden.

3. Ergebnisse

In früheren Studien des Labors war die Expression und Verteilung von Matrix-Metalloproteasen in Glioblastomen untersucht und charakterisiert worden (VINCE G.H. & WAGNER S., 1999). Über die regionale Verteilung und das Vorkommen von MMPs in Medulloblastomen ist bisher jedoch noch wenig bekannt. Bezugnehmend auf die Studien an Glioblastomen werden die Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt, um so Ähnlichkeiten und Abweichungen hervorzuheben und die medulloblastomtypischen Charakteristika zu verdeutlichen.

3.1. MMP-mRNA-Expression in Zelllinien von Medulloblastomen

Zur Untersuchung der Matrix-Metalloproteasen wurden die Zellen der Zelllinien MHH-Med 1, MHH-Med 2, MHH-Med 3, MHH-Med 4 und MHH-S8 in Zellkulturflaschen kultiviert, geerntet und anschliessend die RNA isoliert. Zur Einschätzung der Qualität der vorher hergestellten cDNA wurde als erster Schritt eine PCR-Reaktion mit GAPDH-spezifischen primern eingesetzt. Somit konnten die Bandenintensitäten für alle 5 Zelllinien aneinander angeglichen und einen Vergleich der PCR-Reaktionen ermöglicht werden. Die Zelllinien wurden nach der Elektrophorese in einem Agarosegel und anschliessender EtBr-Färbung analysiert. In der Abbildung 3.1. ist die jeweilige Expression der untersuchten MMPs zu sehen.

Die PCR-Reaktion zum Nachweis von **MMP-2** (Gelatinase-A) ergibt Banden bei einem Molekulargewicht von 253bp. Diese sind bei allen 5 Zelllinien zu sehen, bei MHH-Med 2 und MHH-Med 4 nur von mittlere Stärke, alle anderen Zelllinien zeigen eine ausgeprägte MMP-2-Expression. Die Expression für **MMP-3** (Stromelysin-1) kann durch PCR-Banden mit einer Grösse von 573bp nachgewiesen werden. Sie finden sich in diesem Ansatz nur bei drei der gestesteten Zelllinien, MHH-Med 1, MHH-Med 4 und MHH-S8 Banden, diese sind nur von geringer Intensität. Das Resultat der PCR-Reaktion auf **MMP-7** (Matrilysin) weist eine Bandengrösse von 315bp auf. Es zeigt sich nur bei einer der fünf Zelllinien (MHH-Med 1) ein Expression dieser Protease.

Bei der Analyse von **MMP-9** (Gelatinase-B, mit einem cDNA-Produkt der Grösse von 475bp) und **MMP-12** (Humane Makrophagenelastase, Bandengrösse von 271bp) ergaben sich trotz mehrerer Ansätze wiederholt Doppelbanden, was die Auswertung wesentlich erschwerte.

Es wird vermutet, dass sich diese aus sogenannten „splice-Varianten“ der jeweiligen Matrix-Metalloprotease ergeben.

	Neg. Kontrolle	Pos. Kontrolle	MHH-Med 1	MHH-Med 2	MHH-Med 3	MHH-Med 4	MHH-S8
MMP-2	-	-	+++	+	++	+	+++
MMP-3	-	+	+	-	-	+	+
MMP-7	-	++	++	-	-	-	-
MMP-9	-	- (++)	- (++)	+	++	+	+
				(+)	(-)	(+)	(-)
MMP-12	-	- (+)	- (+)	+	+	+	-
				(-)	(-)	(-)	(-)

Tab. 3.1.: *Semiquantitative Auswertung der PCR-Reaktion bei Zelllinien;*
 (+++)=stark, (++)=mittelstark, (+)=schwach, (-)=negativ;

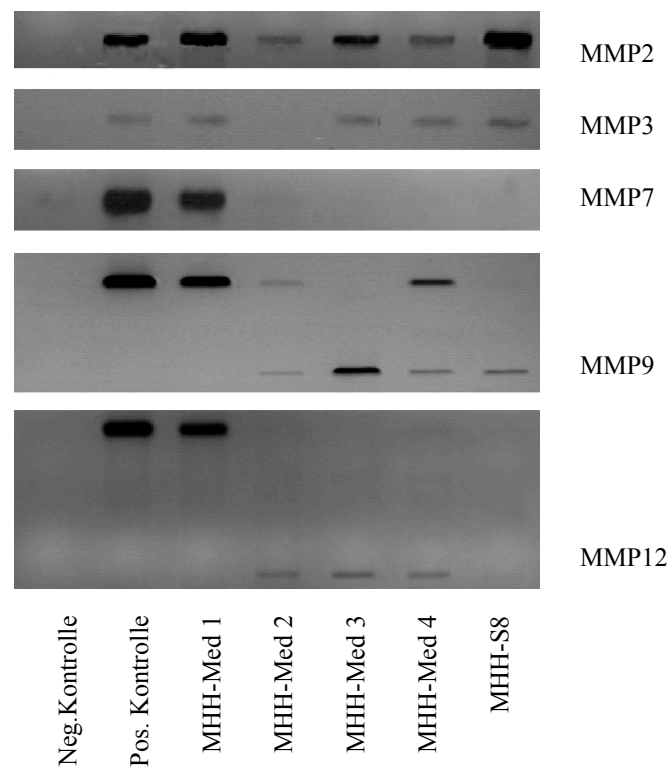


Abb. 3.1.: *Semiquantitative PCR-Analyse der Expression von MMP-mRNA in Zelllinien;*

MHH-Med 1 zeigt insgesamt ein grosses Spektrum der untersuchten Matrix-Metalloproteasen, im Vergleich dazu wird bei MHH-Med 2 nur eine schwache Proteasenexpression nachgewiesen. Auch bei MHH-Med 3 finden sich nur schwache Intensitäten der MMP-Banden. MHH-Med 4 und MHH-S8 besitzen im Vergleich zu den vorher aufgeführten Zelllinien starke Intensitäten der MMP-Banden, nur die PCR-Reaktion für MMP-7 ist bei beiden negativ, bei MHH-S8 finden sich auch keine Banden für MMP-12.

3.2. MMP-Proteinexpression in Medulloblastomen

3.2.1. Ergebnisse der Immunhistochemie-Färbungen

Die Ergebnisse der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion zeigen, dass das Vorliegen einer mRNA als Voraussetzung für die Expression der Matrix-Metalloproteasen auf genetischer Ebene bereits erfüllt ist. Jedoch beweist das Vorhandensein der RNA nicht, dass die genetisch codierten Proteine von den Tumorzellen auch produziert und sekretiert werden. Um diese Untersuchung weiterzuführen und das Vorkommen der MMPs im Gewebe zu analysieren, wurden die auf RNA-Ebene untersuchten Zelllinien und weiterhin auch natives Tumormaterial am Kryostaten in 10µm dicke Schnitte geschnitten und dann immunhistochemischen Färbungen für MMP2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 und MMP-12 unterzogen. Für jede Protease wurde hierzu ein spezifischer Antikörper verwendet, der an das Protein im Tumorgewebe bindet und in einem weiteren Schritt über einen Sekundärantikörper angefärbt wird.

3.2.1.1. Auswertung der Paraffinschnitte

Im Rahmen der Untersuchung an Paraffinschnitten wurden 5 Zelllinien und 3 Primärkulturen von Patienten verwendet. Das verwendete Zell-Material waren vorher von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Pietsch aus Bonn beschrieben und charakterisiert worden.

Wie aus der Tabelle 3.1. hervorgeht, waren alle MMPs nachweisbar, jedoch ausgehend vom verwendeten Zell-Material - in unterschiedlichem Ausmass. Die Gelatinase-A war hierbei die in allen Präparaten am stärksten ausgeprägte Protease. MHH-Med 1 exprimiert alle 5 untersuchten Matrix-Metalloproteasen in starkem Masse. In den Schnitten der Zelllinie MHH-Med 2 sind nur für MMP 2 und MMP 12 starke Signale zu finden. Mit MHH-Med 4 sind sie

die einzigen Zelllinien, die kein Stromelysin produzieren. Die Immunreaktivität auf die weiteren Proteasen, auch auf die Gelatinase B, die bei MHH-Med 4 noch gering exprimiert wird, ist negativ. MHH-Med 1 und MHH-S8 zeigen starke Signale für MMP-9 und MMP-3, wie oben schon erwähnt, zeichnen sich diese 2 Zelllinien durch eine ausgesprochen hohe Invasivität und ausgeprägter Proliferationsaktivität aus. In den immunhistochemischen Färbungen der Primärkulturen ist ein Signal für MMP-2 nur in 2 der 3 untersuchten Präparate (1680, 1913) zu sehen, MMP-9 sogar nur in einer (1680). Zu erwähnen ist hier das MDB 1885, bei diesem Tumor lassen sich nur schwache Signale für MMP-7 und MMP-12 finden, alle anderen Proteasen werden nicht produziert und sekretiert.

	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-12
<u>Zelllinien:</u>					
MHH-Med 1	+++	+++	++	+++	+++
MHH-Med 2	+++	-	-	-	++
MHH-Med 3	+++	+	-	+	+++
MHH-Med 4	+++	-	-	+	++
MHH-S8	+++	++	+++	++	++
<u>Primärkulturen:</u>					
1680	++	+	-	++	+++
1885	-	-	++	-	++
1913	++	+++	+	-	-
<u>Kontrollmaterial:</u>					
Normalhirn	-	-	-	-	-
Tonsille	+++	++	+	++	+++

Tab. 3.2.: *Semiquantitative Auswertung der DAB-Signale in den IHC-Färbungen der Zelllinien und Primärkulturen (Paraffinschnitte);*

(+++)=stark, (++)=mittelstark, (+)=schwach, (-)=negativ

3.2.1.2. Auswertung der Kryoschnitte (Tumorresektate)

Neben der Untersuchung von Paraffinschnitten der Zelllinien diente zur weiteren Charakterisierung der MMP-Expression in Medulloblastomen die Untersuchung von Nativgewebe. Für diese Arbeit standen hierfür insgesamt 12 Proben zur Verfügung, als Kontrollpräparate dienten Tonsille und Normalhirn. Nach der immunhistochemischen Färbung erfolgte eine erste semiquantitative Auswertung der Stärke des DAB-Signals, die für die einzelnen MMPs folgende Werte ergab:

	MMP-2	MMP-9	MMP-3	MMP-7	MMP-12
1976	++	++	++	++	++
1962	++	++	+	-	++
1961	+++	+++	+	-	+++
1903	+	++	-	-	++
1885	+++	+	++	++	++
1729	++	-	++	-	+
1678	++	++	+	-	+
1680	++	∅	++	-	∅
1652	++	-	++	∅	++
1580	++	+++	++	+	++
1557	++	-	+	-	-
1532	+	+	++	++	-

Tab. 3.3.: *Semiquantitative Auswertung der IHC-Färbung an nativem Tumormaterial (Kryostatschnitte);*

(+++)=stark, (++)=mittelstark, (+)=schwach, (-)=negativ, (∅)=nicht auswertbar;

Neben der allgemeinen Beurteilung der Schnitte nach der Intensität des Signals folgt nun die genauere Beschreibung der exprimierenden Zellen und der MMP-Lokalisation im Gewebe:

3.2.1.2.1. IHC der Gelatinase A (MMP-2)

Wie schon im vorangehenden Abschnitt deutlich wurde, so ist auch im Rahmen dieser Versuchsreihe die Gelatinase-A die am stärksten exprimierte Protease, sie wird in allen Nativpräparaten gefunden (s. Tab. 3.2.). In den früheren Untersuchungen von Glioblastomen fand sich MMP-2 vor allem in der Nähe von Tumorzellnestern, sogenannten Clustern. In den zellärmeren Bereichen des heterogenen Glioblastom-Gewebe war das Signal schwächer bis gar nicht zu finden. Diese Befunde spiegeln sich teilweise auch in den untersuchten Medulloblastom-Geweben wieder. Medulloblastome zeigen nicht dieselbe Heterogenität und Polymorphie wie Glioblastome. Jedoch finden sich auch hier dichtere und zellärmere Bereiche nebeneinander. Insbesondere in Gebieten höherer Zelldichte zeigen sich starke DAB-Signale um die Tumorzellen herum. Die lockerer strukturierten Bezirke, in denen die Tumorzellen verstreut oder einzeln liegen, zeigen wenig bis kein Signal (s. Abb. 3.2.).

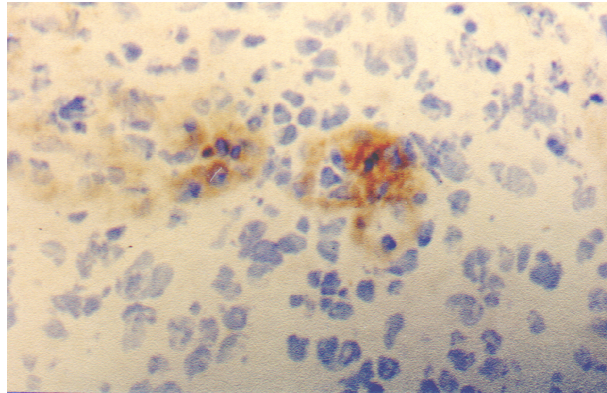


Abb.3.2.: *IHC-Färbung an nativem Tumorgewebe auf Gelatinase-A; Ausgeprägte DAB-Signale im Bereich von Tumorzell-Clustern;*

Überraschend ist, dass sich MMP-2 in den MDB-Schnitten jedoch weniger, als es bei den Glioblastomen der Fall gewesen war, entlang der Endothelzellen der Tumorgefäße finden lässt. Ein sehr schwaches Signal von perivaskulären Ansammlungen lässt sich nur im Kontrollschnitt mit Normalhirn finden.

3.2.1.2.2. IHC der Gelatinase B (MMP-9)

Signale für MMP-9 waren in fast allen Tumorproben zu erkennen. Der Vergleich mit dem Vorkommen in Glioblastomen zeigte auch hier einige Parallelen: Die immunhistochemischen Signale fanden sich insbesondere entlang der Blutgefäße des Tumors. Die Expression der Gelatinase-B beim Glioblastom ist dadurch charakterisiert, dass sie sich auf das engere perivaskuläre Gebiet beschränkt, eine Ausdehnung der Signale in das umgebende Gewebe, wie es bei MMP-2 gefunden worden war, liess sich nicht feststellen. Nur vereinzelt zeigte sich eine schwächere Immunreaktivität von Tumorzellen und Makrophagen im gefässnahen Gewebe. Weiterhin liess sich MMP-9 im Bereich von Nekrosen darstellen. Diese Charakteristika unterscheiden sich teilweise vom Vorkommen der Gelatinase im Medulloblastom. Auch hier beobachtet man die typischen Signale entlang der Gefäss-Endothelien (s. Abb. 3.3.).

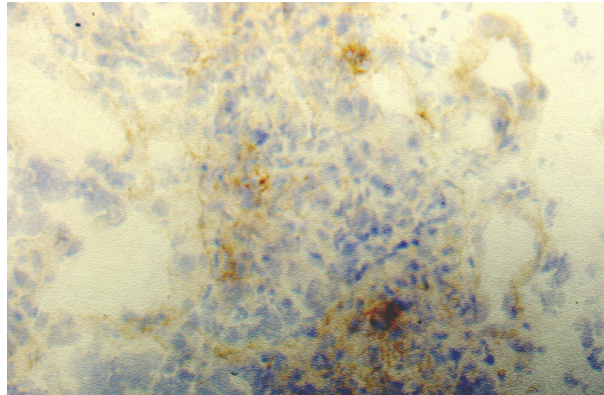


Abb.3.3.: *IHC-Färbung an nativem Tumorgewebe auf Gelatinase-B; DAB-Signale entlang der Gefässstrukturen und einzelne Tumorzellen im Gewebe;*

Die semiquantitative Auswertung (Tab. 3.3.) lässt jedoch erkennen, dass sich auch in der Nähe einzelner Tumorzellen und Makrophagen MMP-9 in der gleichen Stärke wie bei den Endothelzellen des Tumors exprimiert findet:

	Endothel	Tumorzelle	Matrix
1976	+		
1962	+		
1961	+	+	
1903	+	+	
1887	+		
1729			
1678	+	+	
1680			
1652		+	+
1580	+	+	+
1557			
1532		+	+

Tab. 3.3.: *Vorwiegende MMP-9-Lokalisation im nativen Tumorgewebe nach Stärke des DAB-Signals;*

Im Kontrollgewebe (Normalhirn) lässt sich die Gelatinase-B nicht nachweisen.

3.2.1.2.3. IHC des Stromelysin-1 (MMP-3)

In Glioblastomen und anderen astrozytären Tumoren sowie in Normalhirn liess sich Stromelysin-1 bisher nicht nachweisen. Um so erstaunlicher ist im Gegensatz dazu der Nachweis von MMP-3 in den Nativpräparaten von Medulloblastomen. Es zeigt sich bei den meisten Schnitten eine ausgeprägte Immunreaktion (s. Abb. 3.4.)

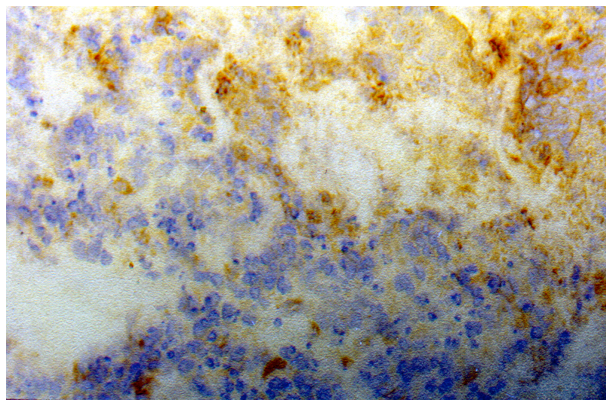


Abb.3.4.: *IHC-Färbung an nativem Tumorgewebe auf Stromelysin-1;
Immunhistochemische Reaktion im Bereich von Tumorzellen und nekrotischen
Bezirken;*

Ähnlich wie MMP-2 sieht man vor allem in den zelldichteren Arealen bei Tumorzellen und auch Makrophagen deutliche DAB-Signale, weiterhin wird Stromelysin-1 auch im Bereich von Nekrosezonen produziert. Eine Assoziation zu Gefäßen kann nicht ausgemacht werden. Zur weiteren Beurteilung wird das Vorkommen von MMP-3 im Hinblick auf den vorherrschenden Ausreifungstyp des Medulloblastoms analysiert (s. Tab.3.4.).

Patient	Vorherrschender Ausreifungstyp	MMP-3
1	Desmoplastisch	+++
2	Desmoplastisch	++
3	Desmoplastisch	++
4	Desmoplastisch	++
5	Neuroblastisch	-
6	Neuroblastisch	-
7	Desmoplastisch	+++
8	Desmoplastisch	+
9	Desmoplastisch	-
10	Neuroblastisch	-
11	Desmoplastisch	++
12	Desmoplastisch	+++

Tab. 3.4.: *Semiquantitative Auswertung der MMP-3-Expression unter Berücksichtigung des vorherrschenden Ausreifungstyps;*

Die Expression von Stromelysin erweist sich in desmoplastischen Medulloblastomen deutlich ausgeprägter als in den neuroblastischen Ausreifungstypen.

3.2.1.2.4. IHC des Matrilysin (MMP-7)

Im Nativgewebe von Glioblastomen wurde Matrilysin nur selten gefunden. Insgesamt erschienen in der Umgebung von Tumorzellen, Makrophagen und Endothelzellen von kleineren Gefässen im Vergleich zu anderen Proteasen nur schwächere Signale. Die Bereiche um grössere Gefässe herum blieben sogar signalfrei, im gesunden Hirngewebe wurde MMP-7 nur von einzelnen perivaskulären Perizyten exprimiert.

Bei der Untersuchung von Medulloblastomen ist das Matrilysin nur in 4 der gesamten 12 untersuchten Proben nachweisbar, insgesamt ist das Signal schwächer ausgeprägt. Die Lokalisation ist ähnlich wie bei den Glioblastomen vorwiegend im Bereich des Stromas von Tumorzellen, Makrophagen und Endothelien kleinerer Gefässe festzulegen.

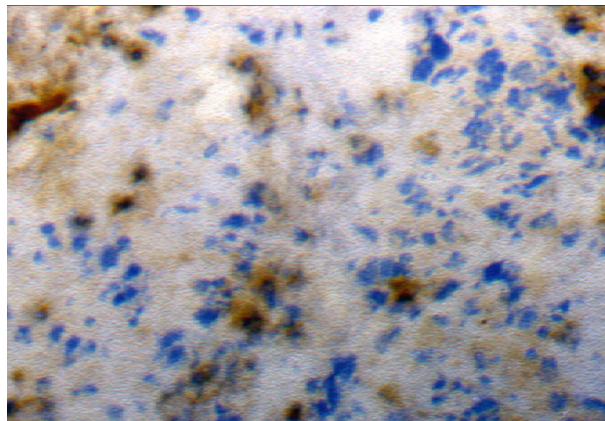


Abb.3.5.: *IHC-Färbung an nativem Tumorgewebe auf Matrilysin; DAB-Signale vorwiegend im Bereich Tumorzellen und kleinerer Gefässe;*

3.2.1.2.5. IHC der Humanen Makrophagen Elastase (MMP-12)

In astrozytären ZNS-Tumoren finden sich häufig neben den Tumorzellen bis zu 30% Makrophagen. Diese sind Zellen des Wirtsorganismus. Die Untersuchung von Glioblastomen wies bei ihnen eine Immunreaktivität und Expression von MMP-12 nach, was als Abwehrreaktion des Organismus auf die malignen Prozesse zu verstehen ist. Man konnte dies

jedoch dies nur an vereinzelt Proben feststellen. Bei den Glioblastom-Tumorzellen wurde eine Expression der Humanen Makrophagen Elastase nicht gefunden.

Die Auswertung der Medulloblastom-Präparate ist in 10 der 12 Proben positiv. Die genauere Analyse der Verteilung im Gewebe zeigt, dass das DAB-Signal für MMP-12 aber nicht nur in der Umgebung von Makrophagen positiv ist: Im Gewebe finden sich auch vereinzelt Tumorzellen, bei denen das Protein für die Humane Makrophagen Elastase nachgewiesen werden kann.

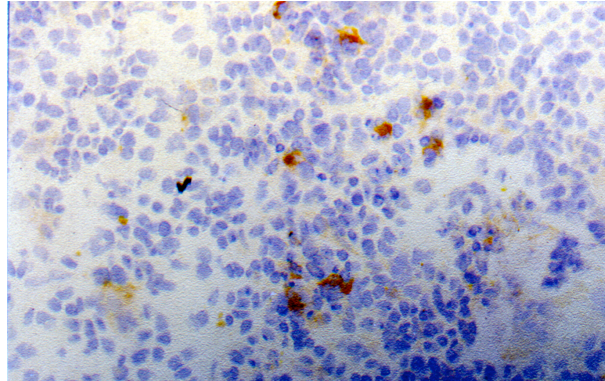


Abb.3.6.: *IHC-Färbung an nativen Tumorgewebe auf Humane Makrophagen Elastase; Immunreaktivität an Makrophagen und vereinzelt Tumorzellen;*

3.2.2. Ergebnisse der Zymografie

Zur genaueren Analyse der Gelatinasen A und B wurde eine Zymografie der 5 MHH-Zelllinien durchgeführt. Hierbei werden nur die von den Tumorzellen sezernierten, also nicht die noch zellulär gespeicherten, Proteine untersucht. Die Zymografie erlaubt es auch, zwischen inaktiven, sogenannten latenten, Proformen und aktiven Formen zu unterscheiden. Als Gelzusatz wurde –gemäß der Substratspezifität von MMP-2 und MMP-9 – Gelatine eingesetzt.

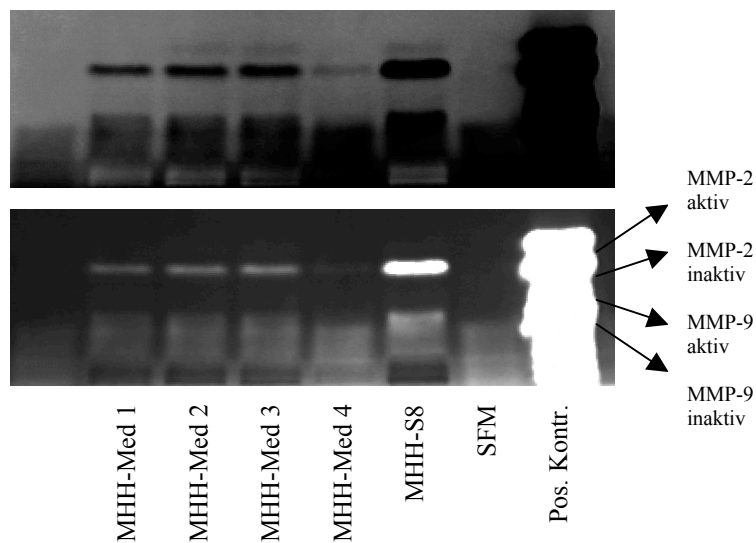


Abb. 3.7.: Zymografie zum Nachweis der aktiven und latenten Form der Gelatinasen A und B in Zelllinien;

Die Auswertung der Zymografie ergibt folgendes (s. Tab. 3.5.): Das serumfreie Medium dient als Negativkontrolle, sowohl in Hinsicht auf MMP-2 als auch auf MMP-9 lassen sich keine Banden erkennen. Die latente Form der Gelatinase A ist in allen 5 Zelllinien zu finden. Besonders stark ausgeprägt findet sie sich bei MHH-S8. Die Zelllinien MHH-Med 1, MHH-Med 2 und MHH-Med 3 sezernieren das latente Protein nur mässig stark, bei MHH-Med 4 ist nur eine sehr schwache Bande zu sehen. Die aktive Form von MMP-2 wird nur bei 2 Zelllinien, MHH-Med 3 und MHH-S8 dargestellt, es lässt sich jedoch auch nur eine schwache Sekretion erkennen. Die Gelatinase B wird im Vergleich zur Gelatinase A noch weniger sezerniert. Insgesamt zeigen nur die Zelllinien MHH-Med 3 und MHH-S8 schwache Banden, sowohl von der aktiven als auch latenten Form.

	MMP-2 (aktiv)	MMP-2 (inaktiv)	MMP-9 (aktiv)	MMP-9 (inaktiv)
MHH-Med 1	-	(+ +)	-	-
MHH-Med 2	-	(+ +)	-	-
MHH-Med 3	(+)	(+ +)	(+)	(+)
MHH-Med 4	-	(+)	-	-
MHH-S8	(+)	(+ + +)	(+ +)	(+)

Tab. 3.6.: Semiquantitative Auswertung der Zymografie für MMP-2 und MMP-9 an den MHH-Zelllinien;

(+)= schwach, (+ +)= mässig stark, (+ + +)= stark, (-)= negativ;

4. Diskussion

Das humane Medulloblastom ist ein embryonaler Tumor, der zu den häufigsten ZNS-Tumoren im Kindesalter zählt. Vorzugslokalisationen sind der Kleinhirnwurm und die paramedianen Kleinhirnanteile (SCHLEGEL U. & WESTPHAL M., 1998). Er wird in der WHO-Klassifikation dem Grad IV zugeordnet und ist somit als hochmaligner, invasiver Tumor zu verstehen (KLEIHUES P., 1997). Der Vorgang der Tumordinvasion in das umgebende gesunde Hirngewebe setzt eine Abfolge von Schritten voraus, beginnend mit der Interaktion der Tumorzellen mit extrazellulären Strukturen, Adhäsion von malignen Zellen an Strukturen der ECM und folgender Migration der Tumorzellen entlang der abgebauten zellulären und proteinhaltigen Strukturen. Dabei nutzen die malignen Zellen des Tumor verschiedene Enzyme, die die Fähigkeit zur Proteolyse und Regulierung der Angiogenese besitzen.

Zu diesen Enzymen zählt - neben den Serin- und Cysteinproteasen, Kathepsinen und Heparinasen (CUVELIER A., 1994) - eine Gruppe von Zink-abhängigen Endopeptidasen, die sogenannten Matrix-Metalloproteasen. Ihnen wird bei diesen invasiven Prozessen eine wesentliche Rolle zugeschrieben. Ihr Vorkommen und ihre Verteilung in Tumoren des ZNS sind bisher am besten untersucht bei den ebenfalls hochmalignen und invasiven Glioblastomen. Es sind momentan 17 verschiedene Subtypen der Proteasen beschrieben, die - abhängig von ihren bevorzugten Substraten - in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Bisher sind die Gruppen der Gelatinasen, der Kollagenasen und Metalloelastasen bekannt, jedoch nimmt ihre Anzahl ständig zu. Die MMPs werden als Proenzyme sezerniert und über die proteolytische Abspaltung eines Propetid-Abschnittes aktiviert. Diese post-translationale Aktivierung wird für die meisten MMPs über die Urokinase und einen Plasminogen/Plasmin-Komplex katalysiert (BORDEN P. & HELLER R.A., 1997). Über die Komplexbildung mit den sogenannten tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) können die aktivierten MMPs wieder inaktiviert werden. Dieser Mechanismus läßt vermuten, dass proteolytische Vorgänge über das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs gesteuert werden (NAKANO A., 1995).

Bei physiologischen Umbauvorgängen von Gewebe wie bei z.B. bei der Wundheilung und dem Knochenwachstum werden die MMPs von Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten sezerniert (BIRKEDAL-HANSEN H. 1995; RAO J.S., 1996; SAWAYA R.E., 1996). Es hat sich jedoch gezeigt, daß die Matrix-Metalloproteasen auch von Tumorzellen exprimiert werden und es konnte *in vitro* eine deutliche Korrelation zwischen dem Ausmaß der Expression und der Tumordinvasivität herausgestellt werden (RAO J.S., 1993). Ein wichtiger Bestandteil der Tumorprogression und -invasion ist die Fähigkeit der malignen Zellen, das umgebende

Gewebe zu degradieren, um sich so den Weg in das umgebende Parenchym zu bahnen. Hier ist die Proteolyse von Gewebestrukturen der Extrazellulärmatrix, Steigern der Tumorangiogenese und Degradation der Basalmembranbarrieren zur Metastasierung mittels der Matrix-Metalloproteasen ein ausschlaggebender Mechanismus (COUSSENS L.M., 1996; POWELL W.C., 1996).

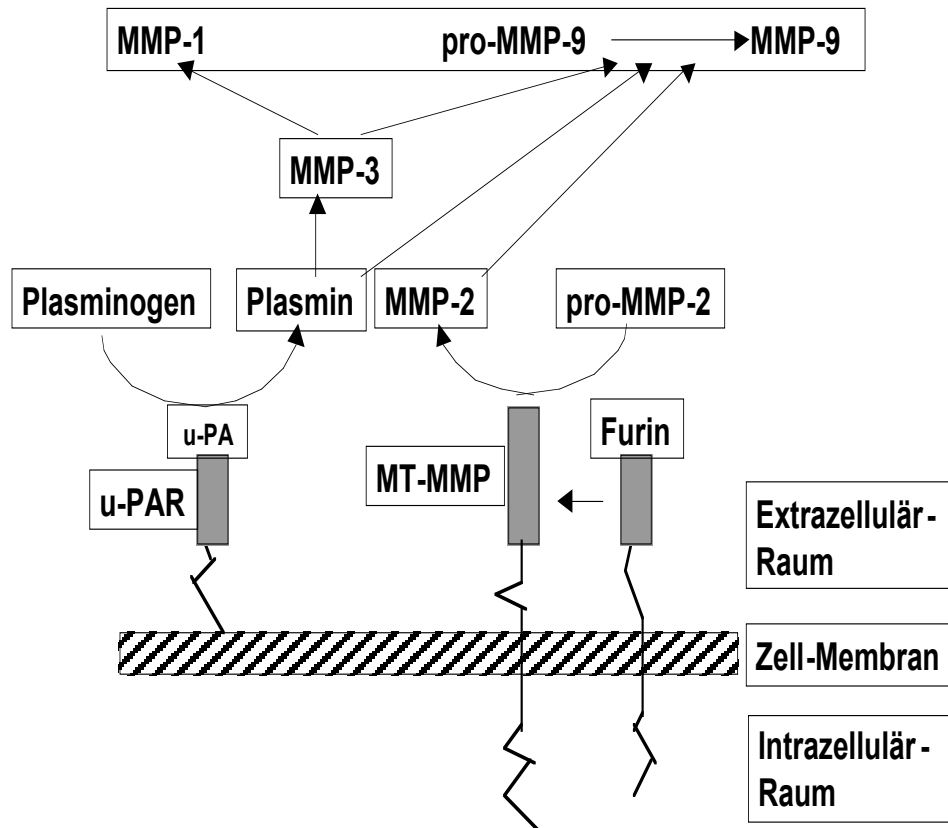


Abb. 4.1.: Schema der Aktivierungskaskade der MMPs an der Zelloberfläche (nach YONG C.H., 1998);

Diese Eigenschaft ist jedoch nicht die einzige, die von den Tumoren zur Progression und Invasion genutzt wird. Mittlerweile hat sich herausgestellt, daß die MMPs neben ihren direkt proteolytischen Eigenschaften auch regulatorischen Einfluß auf verschiedene Vorgänge haben. Die meisten MMPs werden nicht nur von den Tumorzellen exprimiert, sondern auch von umgebenden Stroma- und infiltrierten Entzündungszellen sezerniert, als Reaktion auf bestimmte Faktoren, die von den malignen Zellen produziert werden (GUO H., 1997). Diese MMPs können die Tumorprogression steigern, indem sie folgend an die Tumorzellen und an angiogenetische Endothelzellen binden und so das Tumorstadium fördern (BROOKS P.C., 1996).

Neben der stark fördernden Wirkung von MMPs auf die Neoangiogenese konnte mittlerweile aber auch nachgewiesen werden, dass die humane Makrophagenelastase (MMP-12) eine inhibierende Funktion bei der Tumorneoangiogenese besitzt (O'REILLY M.S., 1994; DONG Z., 1997). Diese Protease produziert Angiostatin, ein Abbauprodukt von Plasminogen. Angiostatin inhibiert die Endothelzellproliferation und führt somit zu einem vermindertem Wachstum des Tumors. Diese Eigenschaft wurde mittlerweile auch bei anderen Proteasen beschrieben, deren proteolytische Abbauprodukte die Progression des Tumors limitieren. Aus diesem Grund können die Proteasen sowohl dem Tumor als auch dem betroffenen Organismus von Nutzen sein, wahrscheinlich abhängig von der lokalen Expression, der proteolytischen Kapazität und der Bindungsaffinität zu den Tumorzellen und der Matrix (SHAPIRO S.D., 1993). Bisher ist eine genaue Unterteilung der Proteasen nach ihrer fördernden als auch inhibierenden Wirkung auf das Tumorwachstum nicht möglich. Dies ist ein erschwerender Punkt bei therapeutischen Angriffspunkten mit MMP-Inhibitoren, die somit auch einer Therapie entgegenwirken können. Ein erstes Ziel ist es jedoch, herauszufinden, welche Matrix-Metalloproteasen in einem Tumor zu finden sind und wie sich ihr Vorkommen und ihre Verteilung im Gewebe darstellt.

Über die Rolle der MMPs, ihr Vorkommen und Verteilung bei Medulloblastomen ist bisher – im Vergleich zu astrozytären Tumoren, insbesondere dem Glioblastom - wenig bekannt. Bei den hochgradigen Gliomen sind bisher insbesondere für MMP-2 und MMP-9 die meisten Daten erhoben worden (RAO J.S., 1994/1996). Ihnen wird eine sehr ausgeprägte Wirkung bezüglich der Tumorprogression zugeteilt, die sich in einer hohen Korrelation zwischen MMP-Expression und Tumorinvasivität zeigt. Eine hohe Expression von MMP-2 wurde bereits in einem breiten Spektrum von malignen Tumoren nachgewiesen. Bei den Prozessen der Invasion und der Metastasierung durchdringen die Tumorzellen endotheliale und epitheliale Basalmembranen. Ein Hauptbestandteil dieser Strukturen ist das Typ IV-Kollagen, das von der 72 kDa Typ IV Kollagenase (MMP-2) proteolytisch gespalten wird. Im Rahmen der Untersuchungen an Medulloblastomen konnte eine moderate bis meist starke mRNA-Expression von MMP-2 in Zelllinien nachgewiesen werden. In der quantitativen PCR der 5 Zelllinien MHH-1, MHH-2, MHH-3, MHH-4 und MHH-S8 konnte bei allen Proben und der Positivkontrolle Banden für MMP-2 gefunden werden, wobei die Ausprägungen hier unterschiedlich stark waren.

In den immunhistochemischen Färbungen war die Gelatinase-A die mit am stärksten exprimierte Protease: Bei den Färbungen der 5 Zelllinien war MMP-2 in allen Präparaten sehr stark exprimiert, bei den 3 Primärkulturen war nur eine (1887) der Proben negativ. Auch bei

den Färbungen am Nativgewebe war bei allen Proben - bis auf 1532 und 1903 – eine starke Reaktion auf MMP-2 zu erkennen. Bei den immunhistochemischen Färbungen zeichnet sich die Diamino-Benzidin-Methode (DAB) durch eine wesentlich höhere Spezifität als z.B. Färbungen mit alkalischer Phosphatase (APAAP) aus. Es lassen sich jedoch keine Aussagen darüber machen, ob die Proteasen dort, wo sie in den Färbungen aufzufinden sind, auch produziert werden. Aussagen dieser Art wären nur mittels einer *in-situ*-Hybridisierung möglich. Dies ist eine Methode, bei der die mRNA direkt am Schnitt nachgewiesen wird. In Verbindung mit der IHC wäre es somit möglich, zu überprüfen, ob die mRNA Expression eines Gens mit der exprimierenden Zelle korreliert. Leider ist es bisher noch nicht gelungen, diese Technik bei Matrix Metalloproteasen anzuwenden. Jedoch ließ sich anhand der Färbungen am Nativgewebe zumindest die Lokalisation der Proteasen im Gewebe beschreiben. MMP-2 fand sich hier vorwiegend um die Tumorzellen herum, insbesondere in Arealen, die sich durch eine hohe Zelldichte auszeichneten, d.h. je zellreicher das Tumoreareal war, desto ausgeprägter war das MMP-2 DAB-Signal.

Es ist bekannt, daß maligne Prozesse meist mit einer Störung der Bluthirnschranke verbunden sind (SHINONAGA M., 1988), die es intravaskulären Molekülen erlauben, von der Blutbahn in das umgebende Gewebe überzutreten und sich dort gleichmäßig zu verteilen. In einigen Arbeiten wird postuliert, daß eine Verteilung der Proteasen im Gewebe unter anderem auf diese erhöhte Durchlässigkeit der Gefäße zurückzuführen ist (ROSENBERG G.A., 1992). Der Aufrechterhaltung und Integrität der Basalmembran und ihrer Funktionen dienen Proteine wie Kollagen Typ IV und Glycoproteine wie Laminin und Fibronectin. Es hat sich gezeigt, daß MMP-2 neben regulatorischen vor allem auch eine direkt proteolytische Funktion bezüglich dieser Komponenten besitzt (DERYUGINA E.I., 1998; SAWAYA R.E., 1996). Diese Eigenschaft kommt auch bei der Zerstörung der Bluthirnschranke zur Geltung (ROSENBERG G.A., 1992; ROBERT A.M., 1974), wodurch es zu sogenannten „leaky vessels“ kommt. Durch die Defekte in der Basalmembran ist es auch MMPs möglich, ins Gewebe zu diffundieren. Diese Überlegung scheint durch die Tatsache unterstützt zu werden, daß in Untersuchungen immer wieder eine hohe Korrelation zwischen der Invasivität des Tumors und der MMP-2 Expression gezeigt wurde. Es wäre somit durch Diffusion im Gewebe ein weitflächiges, homogenes Signal durch gleichmäßige Diffusion zu erwarten. Im Rahmen dieser Arbeit zeigt sich jedoch an den Nativschnitten, daß das Signal um so stärker war, je dichter die Tumorzellen waren, an lockereren Zellgefügen wurde weitaus weniger MMP-2 nachgewiesen.

Eine weitere Typ IV-Kollagenase ist die Gelatinase B (MMP-9), welche erstmalig im Sekretionsprodukt von alveolaren Makrophagen und Granulozyten nachgewiesen wurde (HIBBS M.S., 1985/1987). In zahlreichen weiteren Studien wurde MMP-9 bei diversen malignen Tumoren nachgewiesen, sowohl auf mRNA-Ebene (DAVIES B., 1993, PYKE C., 1992), als auch auf der Protein-Ebene. Ähnlich wie bei MMP-2 zeigte sich eine Korrelation zwischen zunehmender MMP-9-Expression und Tumorinvasivität (ARA T., 1998, TOMITA T., 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit war MMP-9 in der RT-PCR bei drei der fünf Zelllinien nachweisbar, erschwert wurde die Auswertung aber –wie auch bei MMP-12 - durch das Vorkommen von Doppelbanden. Es wird diskutiert, ob es sich bei den zusätzlichen Banden um sogenannte Splice-Varianten handelt, die durch Splice-site-Mutationen entstehen: Die kodierenden Exonsequenzen eines Gens müssen auf RNA-Ebene zusammengesetzt werden, d.h., die Intronsequenzen müssen entfernt werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Splicen“. Der Splice-Apparat erkennt den Anfang und das Ende eines Exons, die sog. Exon-Intron-Grenze an der Basenabfolge in diesem Bereich. Wird eine essentielle Base dieser Erkennungssequenz ausgetauscht, wird das entsprechende Exon beim Splice-Vorgang nicht berücksichtigt, wodurch es zur Synthese eines veränderten Proteins kommt (STRACHNAN T. & ANDREW P., 1999). Dieses Protein ist dann aufgrund seines veränderten Molekulargewichtes in der PCR als zusätzliche Bande zu erkennen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei diesen Doppelbanden um Splice-Varianten handelt. In zukünftigen Arbeiten könnte man weiterhin untersuchen, ob diese Splice-Varianten mit dem eigentlichen MMP-9 (bzw. MMP-12) funktionell untereinander verschaltet sind. Die Tatsache, dass die eigentliche Metalloprotease mit weiteren Genen in einem Operon vorliegt, könnte somit Anlass zu weiteren Untersuchungen sein, die eventuell zu neuen Erkenntnissen in bezug auf Funktion und Struktur der splice-Varianten führen.

In vielen *in vitro*-Untersuchungen war bereits eine Korrelation zwischen der Tumorinvasivität und dem MMP-9-Expressionslevel aufgezeigt worden (RUTKA J.T., 1995; NOEL A., 1994), Davidson et al. zeigten die Bedeutung der Gelatinase B bei Prozessen der Tumordinvasion sowie bereits in potentiellen Vorstadien von Malignomen auf (DAVIDSON B., 1999). In weiteren Untersuchungen wurde auch die Lokalisation der MMP 9-Expression im Gewebe untersucht. Die Arbeitsgruppe Heppner et al. lokalisierte ausgeprägte mRNA- und auch Proteinsignale in Stromaendothelzellen am Übergang Stroma - invasiver Tumor. Ausserdem konnten sie nachweisen, dass auch die Endothelzellen der Tumor-Blutgefäße ein

ausgeprägtes MMP-9-Expressionsmuster zeigten (HEPPNER K.J., 1996). Deswegen kann vermutet werden, dass die Gelatinase B eine eher geringere Rolle bei der direkten Proteolyse während der Tumordinvasion spielt, sondern dass ihr vielmehr im Rahmen der Neoangiogenese eine wichtige Funktion zukommt. Hierfür ergaben sich auch in dieser Studie weitere Hinweise.

Vergleichbar mit der Intensität der MMP-2 Ergebnisse zeigten sich die immunhistochemischen MMP-9 Färbungen im Rahmen dieser Arbeit: Es waren überwiegend fokale, starke Signale zu erkennen. In einer der drei Primärkulturen und in vier der fünf Medulloblastom-Zellkulturen waren ausgeprägte MMP-9 Expressionsmuster zu erkennen. MHH-Med-2, eine Zelllinie, die durch geringe Invasivität und langsames Wachstum charakterisiert ist, zeigte keinerlei MMP-9 Signale. In den anderen Zelllinien fanden sich bei Tumor- und Endothelzellen starke Signale, entlang der Tumorgefäße war die Immunreaktivität besonders hoch. Es war im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht klar zu beurteilen, ob das MMP-9, das in der direkten Umgebung von Endothelzellen zu finden war, von diesen auch exprimiert worden war. Mittels einer in-situ-Hybridisierung könnte dies in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Entscheidende Voraussetzung für die Funktionen der Gelatinasen A und B ist die Umwandlung der inaktiven Zymogenformen in die aktivierten Formen. Anhand von Fibrosarkom- und Gliomzelllinien konnten Deryugina et al. zeigen, dass zur Umstrukturierung der kollagenen Zellmatrix durch die Tumorzellen eine Aktivierung und Zelloberflächenverbindung notwendig ist, wobei die Aktivierung abhängig von MT-1MMP (Membrane Type 1 Matrix Metalloprotease) ist. Hierbei scheint die MMP-2 Aktivität auf der Oberfläche der Tumorzellen eine wesentliche Voraussetzung für die Umstrukturierung der ECM zu sein (DERYUGINA E.I., 1998).

Mittels der Gelatinezymografie ist es möglich, sowohl die aktivierten als auch die latenten Formen der Gelatinasen A und B nachzuweisen. In früheren Untersuchungen zeigte sich, dass die latenten Formen der Gelatinasen in Normalgewebe und auch in neoplastischem Gewebe zu finden waren. Bei der Untersuchung von Pankreasnormalgewebe im Vergleich mit Pankreaskarzinomen waren die aktivierten Formen im Normalgewebe weitaus seltener zu finden, somit konnte eine positive Korrelation zwischen der MMP-Expression und dem TNM-Stadium gezogen werden (KOSHIBA T., 1998). Somit wäre in dieser Studie aufgrund der hohen Malignität und Invasivität der Medulloblastome ein Überwiegen der aktivierten Formen gegenüber der latenten Formen zu erwarten. In der Zymografie dieser Arbeit waren jedoch die Banden der latenten Formen im Vergleich zu den Banden der aktivierten Proteasen

wesentlich stärker. Die Zymografie wurde mit Zellen der wiederholt kultivierten und passagierten Zelllinien durchgeführt, eine zymographische Analyse von Nativmaterial wurde nicht durchgeführt. Es ist zu diskutieren, ob dieses verstärkte Expressionsmuster der inaktiven – latenten Formen durch die wiederholte Passagierung und Kultivierung der Zelllinien induziert sein kann und die Resultate nicht mit *in vivo* Verhältnissen verglichen werden können. In dieser Studie diente die Zymografie in erster Linie jedoch zur Kontrolle der immunhistochemischen Ergebnisse, die dadurch bestätigt wurden.

In dieser Studie wurde weiterhin MMP-3 untersucht, eine Matrix-Metalloprotease, die zu der Untergruppe der Stromelysine zählt. Die Familie der Stromelysine zeichnet sich durch eine weitgefächerte Substratspezifität aus und besitzt die Fähigkeit, verschiedene extrazelluläre Proteine zu degradieren, wie z.B. Proteoglykane, Laminin, Elastin, Fibronectin und die Kollagene Typ III, IV, V, IX (MURPHY J.P., 1996; QUANTIN B., 1996). Eine weitere wichtige Funktion ist die Aktivierung anderer Matrixmetalloproteasen (WILHELM S.M., 1987; MARCY A.I., 1991). MMP-3, das sogenannte Stromelysin-1, ist oft im Zusammenhang mit chronischer Arthritis aber auch mit Invasion und Metastasierung bei Plattenepithel-Karzinomen beschrieben. Auch bei der Untersuchung von Gliomzelllinien *in vitro* deuteten die Ergebnisse auf den Einfluss von MMP-3 auf die Gliominvasion hin (NAKAGAWA T., 1994, RUTKA J.T., 1995). In *in-vivo* Untersuchungen des Labors konnte jedoch in nativen Glioblastom-Tumorproben kein Stromelysin-1 nachgewiesen werden (VINCE G.H., 1999). Auch bei dem Verfahren der *in-situ* Hybridsierung, die Matsuzawa et al. bei Gliomen einsetzten, war MMP-3 nicht nachweisbar (MATSUZAWA K., 1996). Um so erstaunlicher ist im Gegensatz dazu das Ergebnis der Untersuchungen an Medulloblastom-Zelllinien und Nativgewebe: Drei der fünf Zelllinien zeigten eine positive RT-PCR-Reaktion und auch die entsprechenden DAB-Signale in den immunhistochemischen Färbungen, elf der zwölf untersuchten Nativgewebeprobe waren MMP-3-positiv. In der quantitativen Auswertung der Schnitte fand sich das Stromelysin-1 hauptsächlich im Bereich von Nekrosen, aber auch in der Nähe einzelner Tumorzellen und Makrophagen. Somit kann vermutet werden, dass MMP-3 bei Medulloblastomen in bezug auf die zelluläre Transformation und Interaktion mit ECM-Komponenten eine grössere funktionelle Bedeutung hat, als es bei Glioblastomen der Fall ist. Über die genaue Funktion ist bisher jedoch noch nichts bekannt.

Matrilysin, MMP-7, ist mit einem Molekulargewicht von 28 kDa bis dato die kleinste bekannte Matrixmetalloprotease. Sie wurde aufgrund ihrer Substratspezifität zu Kollagen Typ

IV, Proteoglykane und Laminin anfangs ebenfalls zu der Familie der Stromelysine gezählt, unterscheidet sich von diesen jedoch durch das Fehlen der Homopexin-ähnlichen Domäne im C-Terminal. Ihre Fähigkeit, Proteoglykane zu degradieren wird als fünfmal stärker als die der Stromelysine beschrieben, auch der Abbau von Alpha-1-Antitrypsin ist im Vergleich zu den anderen Matrixmetalloproteasen wesentlich effektiver und schneller (SIREN U.I., 1994). Matrilysin wird in seiner Wirkung nur schwach von TIMP-1 und TIMP-2 gehemmt, was auf die Abwesenheit der Homopexin-ähnlichen Domäne zurückzuführen sein könnte. Somit kann sie ohne wesentliche Inhibitoren zu einer Destruktion der ECM führen (CUVELIER A., 1997). Es wurde gezeigt, dass Matrilysin von gesunden oder neoplastischen Epithelzellen gebildet wird, wohingegen die weiteren MMPs gewöhnlich von gesunden oder neoplastischen Stromazellen exprimiert werden. Weiterhin wird MMP-7 von zirkulierenden Monozyten produziert, andere MMPs werden erst später im Verlauf der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen sezerniert (BUSIEK D.F., 1992). Die genaue Funktion des Enzyms *in vivo* ist jedoch bis dato nicht geklärt.

Borchers et al. beobachteten in einer *in vitro* Studie, dass mit zunehmender Zelldichte und Proliferation des Tumors auch die MMP-7-Expression anstieg (BORCHERS A.H., 1997). Später konnten sie nachweisen, dass diese vermehrte MMP-7-Synthese mit, über E-cadherin vermittelten, interzellulären Kontakten korrelierte. Dies deckt sich mit den Beobachtungen der Matrilysin-expression in Medulloblastomen. Die DAB-Signale fanden sich aber meist in Arealen höherer Zelldichte von Tumorzellen, Makrophagen und Endothelien kleinerer Gefäße, waren im Vergleich zu anderen Proteasen jedoch insgesamt schwächer. Es ist anzunehmen, dass MMP-7 bei der Gewebeumwandlung während der Tumordinvasion zumindest *in vitro* eine aktive Funktion hat. Die Tatsache, dass Matrilysin im Normalgewebe wesentlich stärker exprimiert wird und im Vergleich wesentlich weniger in Medulloblastomen zu finden war, erlaubt jedoch bisher keine weiteren Schlüsse auf die Funktion und Bedeutung des Enzyms für den Tumor und sein Wachstum *in vivo*.

Die Humane Makrophagenelastase MMP 12 wurde in früheren Studien in humanem Plazenta-Gewebe (BELAAOUAJ A., 1995), sowie in aktivierten Makrophagen nachgewiesen (SHAPIRO S.D., 1993). Sie wird im Gegensatz zu den anderen MMPs nicht nur durch Abspaltung eines Propeptids, sondern auch durch den Verlust einer Homopexin-ähnlichen Domäne aktiviert. Die genauen Mechanismen und die Regulierung dieses Vorgangs sind jedoch noch nicht genauer beschrieben (SHAPIRO S.D., 1993). MMP-12 degradiert zahlreiche makromolekulare Strukturen der ECM, besonders hervorzuheben ist das Elastin. Im Gegensatz zu den

Gelatinasen hängt diese elastolytische Aktivität nicht vom Vorhandensein einer fibronectin-ähnlichen Domäne ab, hierfür dient eine katalytische Domäne (SHIPLEY J.M., 1996). In ihrer Aktivität wird sie durch TIMPS sowie durch α_2 -Makroglobuline gehemmt. Sie nimmt weiterhin unter den Matrixmetalloproteasen insofern eine Sonderstellung ein, da sie scheinbar nicht von den Zellen des Tumorgewebes, sondern von den Makrophagen des Wirtsorganismus sezerniert wird. Belaouaj et al. postulieren, dass MMP-12 vor allem bei der Neoangiogenese eine regulatorische Funktion ausübt (BELAAOUAJ A., 1995). Sie wirkt auf den Tumor antiproliferativ, indem sie aus Plasminogen Angiostatin als Vaskularisationsinhibitor freisetzt. Diese Funktion wird als Reaktion und Abwehrmechanismus des Wirtsorganismus auf die neoplastischen Vorgänge verstanden. In der Studie an Medulloblastomen waren zehn der zwölf Proben positiv. Wie zu erwarten war in der histopathologischen Auswertung zu erkennen, dass vor allem Makrophagen die Protease exprimierten, jedoch war auch bei vereinzelt Tumorzellen vor allem im Bereich von Tumorgefäßen ein Signal zu erkennen.

Matrixmetalloproteasen werden immer wieder mit der Invasionsfähigkeit von Tumoren in Verbindung gebracht. Die Fähigkeit der Tumore, in die normale extrazelluläre Matrix zu invadieren, ist ein ausschlaggebendes Charakteristikum der hochgradig malignen ZNS-Tumore und bedingt auch die bisher begrenzten therapeutischen Möglichkeiten und den oft infausten Verlauf der Patienten. Der Pathomechanismus der Invasion ist sehr komplex und wird durch das Zusammenspiel von Aktivatoren und Inhibitoren der Serin-, Cystein- und Matrixmetalloproteasen charakterisiert. Diese Enzyme stellen den Angriffspunkt vieler experimenteller Studien dar, mit dem Ziel, eine geeignete Therapie zu entwickeln. Bisher ist jedoch noch nicht völlig geklärt, welche Funktionen die MMPs bei diesen Vorgängen übernehmen, neben ihrer Fähigkeit zur Degradierung der ECM besitzen sie die Eigenschaft, andere Proteasen zu aktivieren und sie können teilweise auch die Neoangiogenese des Tumors fördern. Für die Entwicklung zukünftiger Therapieschemata ist ein besseres Verständnis und Wissen über diese Enzyme, die Tumorwachstum, Neovaskularisation und Invasion beeinflussen, hilfreich. Es darf jedoch nicht außer acht gelassen werden, dass die Proteasen auch bei physiologischen Vorgängen eine Funktion erfüllen, was bei anti-invasiven Therapien zu unerwünschten Nebeneffekten führen kann.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgestellten Untersuchungen sind teilweise unter *in vitro*-Bedingungen durchgeführt worden. Inwiefern die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen mit den pathophysiologischen Vorgängen in Medulloblastomen vergleichbar

sind, kann Gegenstand weiterer Diskussionen im wissenschaftlichen Kontext sein. *In vitro*-Untersuchungen dienen als Modellversuche, um Vorgänge und Charakteristika in Tumoren darzustellen. Leider ist es trotz fortgeschrittener Entwicklung der Methoden noch nicht möglich, *in vivo*-Bedingungen über *in vitro*-Verhältnisse exakt zu realisieren, weswegen Rückschlüsse auf den Originaltumor mit Vorsicht gezogen werden müssen. Die vorliegende Untersuchung ist als erster Schritt in der Grundlagenforschung über Matrixmetalloproteasen in Medulloblastomen zu sehen. Die Arbeit mit Primärkulturen kommt den tatsächlichen *in vivo*-Gegebenheiten ein Stück näher, die Übertragbarkeit ist jedoch auch hier eingeschränkt. Dies muss bei zukünftigen Überlegungen zur funktionellen Bedeutung und therapeutischen Ansätzen mit in Betracht gezogen werden.

Die vorliegenden Daten und die bisher bekannten Forschungsergebnisse bezüglich anderer Tumorentitäten lassen den Schluss zu, dass sich jede Entität durch ihr spezifisches MMP-Expressionsmuster und Verteilung im Gewebe auszeichnet, was Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen sein kann. Abschliessend bleibt somit festzuhalten, dass durch bessere Kenntnis der MMP-Verteilungsmuster in Medulloblastomen und anderen astrozytären Tumoren die Hemmung der MMPs als anti-invasive Therapie vielversprechend sein könnte. Jedoch müssen erst die verschiedenen Invasionsmechanismen und die Expressionscharakteristika der Tumore genauer untersucht und definiert werden, um die Erfolge einer anti-invasiven Therapie abschätzen zu können.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand von Tumorzelllinien und Nativmaterial untersucht, ob und in welchem Masse Medulloblastome verschiedene Matrixmetalloproteasen exprimieren. Diese Enzyme spielen sowohl in physiologischen Prozessen als auch bei der Gewebeumstrukturierung und Neoangiogenese im Rahmen der Tumorinvasivität eine wesentliche Rolle. Im Vergleich zu anderen astrozytären Tumoren, wie zum Beispiel dem Glioblastom, ist über das Verteilungsmuster bei Medulloblastomen bisher noch wenig bekannt. Dies ist ein erster Ansatz, um mittels Vergleich mit dem Vorkommen in Glioblastomen mehr über die MMP-Expression und -verteilung im diesem kindlichen Hirntumor zu erfahren. In der vorliegenden Untersuchung wurden 5 Zelllinien und 12 Primärkulturen von Medulloblastomen hinsichtlich ihrer Expression von MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 und MMP-12 untersucht. Die Analyse erfolgte mittels PCR auf RNA-Ebene und über immunhistochemische Färbungen sowie Zymografie auf Protein-Ebene.

Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Zelllinien und Primärkulturen die Fähigkeit besitzen, mRNA einzelner Proteasen zu exprimieren. Der Vergleich der PCR-Resultate innerhalb der verschiedenen Präparate zeigte eine unterschiedliche Ausprägung hinsichtlich der Expression der getesteten Matrixmetalloproteasen. Die Gelatinase A zählte zu den am stärksten exprimierten Proteasen, in den immunhistochemischen Färbungen waren die DAB-Signale besonders in der Nähe von Tumorzellnestern zu finden. Die Immunreaktivität für die Gelatinase B zeigte sich, ähnlich wie bei anderen astrozytären Tumoren schon beschrieben, insbesondere entlang der Gefäßendothelien sowie bei vereinzelt Tumorzellen und in nekrotischen Bereichen. Matrilysin war sowohl in den Zelllinien als auch in den Primärkulturen nur schwach exprimiert. Die Humane Makrophagen Elastase wird hauptsächlich von den in den Tumor eingewanderten Makrophagen aber auch von vereinzelt Tumorzellen sezerniert. Überraschend war der Nachweis von Stromelysin-1 in den Nativpräparaten, da es in Glioblastomen bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich jede Tumorentität durch ein ihr eigenes Expressions- und Verteilungsmuster auszeichnet und kein einheitliches Expressionsschema im Vergleich der Tumortypen untereinander zu erkennen ist. Diese Überlegung sollte bei weiteren zukünftigen Untersuchungen und Entwicklung anti-invasiver Therapien in Betracht gezogen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. **Ara T., Fukuzawa M., Kusafuka T., Komoto Y., Oue T., Inoue M., Okada A.:** Immunohistochemical expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 in neuroblastoma: association with tumor progression and clinical outcome. *J. Pediatr. Surg.* 33 (1998): 1272-1278
2. **Belaouaj A., Shipley J.M., Kobayashi D.K., Zimonjic, D.B., Popescu N., Silverman G.a., Shapiro S.D.:** Human macrophage metalloelastase. Genomic organization, chromosomal location, gene linkage, and tissue specific expression. *J. Biol. Chem.* 270 (1995): 14568-14575
3. **Berens M.E. Rutka J.T., Rosenblum M.L.:** Brain tumor epidemiology, growth and invasion. *J. Neurosurg. Clin. North. Am.* 1 (1990): 1-18
4. **Berstein J.J., Goldberg W.J. Laws E.R. Conger D., Morreale V. Wood L.R.:** C6 glioma cell invasion and migration of rat brain after neural homografting: ultrastructure. *Neurosurgery* 26 (1990): 622-628
5. **Birkedal-Hansen H.:** Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (1995): 728-735

6. **Borchers A.H., Sanders L.A., Bowden G.T.:** Regulation of matrilysin expression in cells of squamous cell carcinoma by E-cadherin-mediated cell-cell-contact. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 123 (1997): 12-20
7. **Borden P., Heller R.A.:** Transkriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 7 (1997): 159-178
8. **Bradford M.M.:** A rapid and sensitive method for quantitation of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976): 248-254
9. **Bramhall S.R.:** The matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Int. J. Pancreatol.* 21 (1997): 1-12
10. **Brooks P.C., Stromblad S., Sanders L.C., von Schalscha T.L., Aimes R.T., Stetler-Stevenson W.G., Quigley J.P., Cheresch D.A.:** Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the cell surface of invasive cells by interaction with integrin α_3 . *Cell* 85 (1996): 683-693
11. **Busiek D.F., Ross F.P., McDonnell S., Murphy G., Matrisian L.M., Welgus H.G.:** The matrix metalloproteinase matrilysin (PUMP) is expressed in developing human mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.* 267 (1992): 9087-9092
12. **Carroll S.L. et al.,** *J. Neurosci.* 15 (1995): 3342-3356

13. **Couldwell W.T., de Tribolet N., Antel J.P., Gauthier T., Kuppner M.C.:**
Adhesions molecules in malignant gliomas: implications for tumorigenesis. *J. Neurosurg.* 76 (1992): 782-791
14. **Coussens L.M., Werb Z.:** Matrix metalloproteinases and the development of cancer;
Chem. Biol. 3 (1996): 895-904
15. **Cuvelier A., Kuntz C., Sesboüé R., Miur J.F., Martin J.P.:** Les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMP): structure et activité. *Rev. Mal. Res.* 14 (1997):1-10
16. **Davidson B., Goldberg I., Kopolovic J., Lerner-Geva L., GotliebW., Weis B., Ben-Baruch G., Reich R.:** Expression of Matrix-Metalloproteinase-9 in Squamous Cell Carcinoma in the Uterine Cervix – Clinicopathologic Study Using Immunohistochemistry and mRNA in Situ Hybridization; *Gynecologic. oncology,* 72(3) (1999): 380-386,
17. **Davies B., Miles D.W., Happerfield L.C., Naylor M.S., Bobrow L.G., Rubens RD, Balkwill F.R.:** Activity of type IV collagenase in benign and malignant disease. *Br. J. Cancer* 67 (1993): 1126-1131
18. **Davies B., Waxman J., Wasan H., Abel P., Williams G., Krausz T., Neal D., Thomas D., Hanby A., Balkwill F.R.:** Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res.* 53 (1993): 5365-5369

19. **DeClerck Y.A., Darville M.I., Eeckhout Y., Rousseau G.G.:** Characterization of the promotor of the gene encoding human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP2). *Gene* 139 (1994): 185-191
20. **Deryugina E.I., Bourdon M.A., Reisfeld R.A., Strongin A. :** Remodeling of collagen matrix by human tumor cells requires activation and cell surface association of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res.* 58 (1998): 3743-3750
21. **De Vita, Rosenberg:** Cancer, 1998
22. **Dong Z., Kumar R., Yang X., Fidler I.J.:** Macrophage-derived metalloelastaseis responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell.* 88 (1997): 801-810
23. **Goldbrunner R.H., Bernstein J.J., Plate K.H., Vince G.H., Roosen K., Tonn J.-C.:** Vascularization of human glioma spheroids implanted into rat cortex is conferred by two distinct mechanisms. *Int. J. Neurosci. Res.* 55 (1999): 486-495
24. **Greenberg H.S., Chandler W.F. , Sandler H.M.:** Brain Tumors, *Oxford, University Press Inc* (1999)
25. **Guo H., Zucker S., Gordon M.K., TooleB.P., Biswas C.:** Stimulation of matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 272 (1997): 24-27

26. **Harisiadis L., Chang C.H.:** Medulloblastoma in children: a correlation between staging and results of treatment. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2 (1977): 833-841
27. **Heppner K.J., Matrisian M.L., Jensen R.A., Rodgers W.H.:** Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am. J. Pathol.* 149 (1996): 273-282
28. **Hernaiz Driever P., Frank T., Korf H.W., Schlote W.:** Medulloblastome – Eine neuropathologische Betrachtung, *W. Zuckerschwerdt Verlag München (1999)*
29. **Hibbs M.S., Hastv K.A., Sever J.M., Kang A.H., Mainardi C.L.:** Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* 260 (1985): 2493-2500
30. **Hibbs M.S., Hoidal J.R., Kang A.H.:** Expression of a metalloproteinase that degrades native type IV collagen and denatured collagens by cultured human alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* 80 (1987): 1644-1650
31. **Kellog 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 (1990): 202-208
32. **Kleihues P., Burger P.C., Scheithauer B.W.:** Histological Typing of Tumors of the Central Nervous System, Second Edition. *World Health Organization, Springer Verlag (1993)*

33. **Kleihues P., Webster K.C.:** Pathology and Genetics of the Nervous System, *International Agency for Research on Cancer, Lyon (1997)*
34. **Kohn E.C., Liotta L.A.:** Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res. 52 (1992): 1856-1862*
35. **Koshiba T., Hosotani R., Wada M., Miyamoto Y., Fujimoto K., Lee J.U., Doi R., Aii S., Imamura M.:** Involvement of matrix metalloproteinase-2 activity in invasion and metastasis of pancreatic carcinoma. *Cancer 82 (1998): 642-650*
36. **Laemmler U.K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature 227 (1970): 680-685*
37. **Lampert K., Machein U., Machein M.R., Conca W., Peter H.H., Volk B.:** Expression of Matrix Metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors. *Amer. J of Pathol., Vol 153 (1998): 429-437*
38. **Liotta L.A., Stetler-Stevenson W.G.:** Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res. 51(1991): 5054-5059*
39. **Mahaley M.S., Mettlin C., Natarajan N. et al.:** National survey of patterns of care for brain-tumor patients. *J. Neurosurg. 71 (1989): 826-836*
40. **Marcy A.I., Eiberger L.L., Harrison R., Chan H.K., Hutchinson N.I., Hagmann W.G.:** Human fibroblast stromelysin catalytic domain: expression, purification and characterization of a C-terminally truncated form. *Biochem 30 (1991): 6476-6483*

41. **Matsuzawa K., Fukuyama K., Dirks P.B., Hubbard S.L., Murakami M., Becker L.E., Rutka J.T.:** Expression of stromelysin-1 in human glioma cell lines. *J. Neuro-Oncol.* 30 (1996): 181-188
42. **Molenaar W.M., Tronjanowski J.Q.:** Primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system in childhood: tumor biological aspects. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 17 (1994): 1-25
43. **Murphy J.P., Murphy G., Reynolds J.J.:** The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. *FEBS Lett.* 289 (1996): 4-7
44. **Nagase H., Barrett A.J., Wessner J.F.:** Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl.* 1 (1992): 421-424
45. **Nakagawa T., Kubota T., Kabuto M., Sato K., Kawano H., Hayakawa T., Okada Y.:** Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by human brain tumors. *J. Neurosurg.* 81 (1994): 69-77
46. **Nakano A., Tani E., Miyazaki K., Yamamoto Y., Furuyama J.:** Matrix-Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gliomas. *J. Neurosurg.* 83 (1995): 298-307
47. **Noel A., Emonard H., Polette M., Birembaut P., Foidart J.M.:** Role of matrix, fibroblasts and type IV collagenases in tumor progression and invasion. *Pathol. Res Pract* 190 (1994): 934-941

48. **O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J.:** A novel angiogenesis inhibitor which mediates the suppression of metastasis by Lewis lung carcinoma. *Cell* 79 (1994): 315-328
49. **Packer R.J.:** Medulloblastoma. In Gilman S., Goldstein G., Waxman S. (eds): Neurobase. *Arbor Publishing Corporation, San Diego (1998)*
50. **Pepper M.S., Wasi S., Ferrera N., Orci L., Montesano R.:** *In vitro* angiogenic and proteolytic properties of bovine lymphatic endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 210 (1994): 298-305
51. **Pietsch T., Scharmann T., Fonatsch C., Schmidt D.:** Characterization of five New Cell Lines Derived from Human Primitive Neuroectodermal Tumors of the Central Nervous System. *Cancer Research* 54(12) (1994): 3278
52. **Plate K.H., Risau W.:** Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia.* 15 (1995) : 339-347
53. **Poeck, Hacke:** Neurologie, *Springer-Verlag, 10.Auflage (1998)*
54. **Powell W.C., Matrisian L.M.:** Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Curr. Top.Microbiol. Immunol.* 23 (1996): 1-21
55. **Pyke C., Ralfkiaer E., Huhtala P., Hurskainen T., Dano K., Tryggvason K.:** Localization of messenger RNA für Mr 72.000 and 92.000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res.* 52 (1992): 1336-1341

56. **Quantin B., Murphy G., Breathnach R.** : Pump-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase members. *Biochemistry* 28 (1996): 5327-5334
57. **Rao J.S., Steck P.A., Mohanam S., Gokaslan Z.L., Fuller G.N., Stetler-Stevenson W.G., Rao V.H., Liotta L.A., Nicolson G.L., Sawaya R.F.**: Expression and location of 92kDa type IV collagenase/gelatinase B (MMP 9) in human gliomas. *Clin. Exp. Metastasis* 14 (1996): 12-18
58. **Rao J.S., Steck P.A., Mohanam S., Stetler-Stevenson W.G., Liotta L.A., Sawaya R.F.**: Elevated levels of M 92000 type IV collagenase in human brain tumors. *Cancer Res.* 53 (1993): 2208-2211
59. **Rao J.S., Steck P.A., Tofilon P., Boyd D., Ali-Osmon F., Stetler-Stevenson W.G., Liotta L.A., Sawaya R.F.**: Role of plasminogen activator and of 92 kDa type IV collagenase in glioblastoma invasion using an *in vitro* matrigel model. *J. Neuro-Oncol.* 18 (1994): 129-138
60. **Robert A.M., Godeau G.**: Action of proteolytic and glycolytic enzymes on the permeability of the blood-brain-barrier. *Biomedicine* 21 (1974): 36-39
61. **Rorke L.B.**: The cerebellar medulloblastoma and its relationship to primitive neuroectodermal tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 42 (1983): 1-15

62. **Rosenberg G.A., Kornfeld M., Estrada E., Kelley R.O., Liotta L.A., Stetler-Stevenson W.G.:** TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain-barrier by type IV collagenase. *Brain Res. 576 (1992): 203-207*
63. **Rubinstein, L.J.:** Justification for a cytogenetic scheme of embryonal central neuroepithelial tumors. In Fields, W.S.(ed): Primary braintumors. A review of Histologic Classification. *New York-Springer-Verlag (1998): 16-27*
64. **Rutka J.T., Hubbard S.L., Fukuyama K., Matsuzawa K., Becker L.E., Stetler-Stevenson W.G., Dirks P.B.:** Expression of TIMP-1, TIMP-2, 72- and 92-kDa type IV collagenase transcripts in human astrocytoma cell lines: Correlation with astrocytoma cell invasiveness. *Int. J. Oncol. 6 (1995): 877-884*
65. **Saarialho-Kere U.K., Crouch F.C., Parks W.C.:** Matrix metalloproteinase matrilysin is constitutively expressed in adult human exocrine epithelium. *J. Invest. Dermatol. 105 (1995): 190-196*
66. **Sawaya R.E., Yamamoto M., Gokaslan Z.L., Wang S.W., Mohanam S., Fuller G.N., McCutcheon E., Stetler-Stevenson W.G., Nicholson G.L., Rao J.S.:** Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas *in vivo*. *Clin. Exp. Metastasis 14 (1996): 35-42*
67. **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 (1988):487-491*

68. **Schlegel U., Westphal M.:** Neuronkologie. *Thieme-Verlag (1998)*
69. **Schwabe D., Hernaíz Driever P.:** Hirntumoren im Kindesalter. *W.Zuckerschwerdtverlag München (1999)*
70. **Shapiro S.D., Kobayashi D.K., Ley T.J.:** Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J. Biol. Chem. 268 (1993): 23824-23829*
71. **Shinonaga M., Chang C.C., Suzuki N., Sato M., Kuwabara T.:** Immunohistological evaluation of macrophage infiltrates in brain tumors. *J. Neurosurg. 68 (1988): 259-265*
72. **Shiple J.M., Doyle G.A., Fliszar C.J., Ye Q-Z, Johnson L.L., Shapiro S.D., Welgus H.G., Senior R.M.:** The structural basis for the elastolytic activity of 92-kDa and 72-kDa gelatinases. *J. Biol. Chem. 271(1996):4335-4341*
73. **Sires U.I., Murphy G., Baragi V.M., Fliszar C.J., Welgus H.G., Senior R.M.:** Matrilysin is much more efficient than other matrix metalloproteinases in the proteolytic inactivation of α_1 -antitrypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 204 (1994): 613-620*
74. **Springman E.B., Angleton E.L., Birkedal-Hansen H., Van Wart H.E.:** Multiple Modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a

Cys⁷³ active-site zinc complex in latency and a “cystine switch” mechanism for activation. *Proc. Natl Acad Sci USA (1990): 364-368*

75. **Stetler-Stevenson W.G., Kruttsch H.C., Wacher M.P., Margulies I.M., Liotta L.A.:** The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation. *J. Biol. Chem. 264 (1989): 1353-1356*

76. **Strachnan T., Andrew P.:** Human Molecular Genetics. BIOS Scientific Publishers Limited, 2nd edition (1999)

77. **Tomita T., Kazushi I.:** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in colon adenomas-adenocarcinomas. *Di. Colon Rectum 39 (1996): 1255-1264;*

78. **Tomlinson F.H., Scheithauer B.W., Mexer F.B. et al.:** Medulloblastoma. Diagnostic and therapeutic overview. *Journal Child Neurol 7 (1992): 142-155*

79. **Van Wart H.E., Birkedal-Hansen H.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(1990): 5578-5582*

80. **Vince G.H., Wagner S., Pietsch T., Klein R., Goldbrunner R.H., Roosen K., Tonn J.C.:** Heterogeneous regional expression patterns of matrix metalloproteases in human malignant gliomas. *Int. J. Devl. Neurosci. 17(1999): 437-445,*

81. **Wagner S.** : Der Einfluss von Interleukin 10 und Matrix-Metalloproteinasen auf die Invasionseigenschaften maligner Gliome. (1999)
82. **Wilhelm S.M., Collier I.E., Kronberger A., Eisen A.Z., Marmer B.L., Grant G.A.**: Human fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity and differential expression in normal and tumorigenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987): 6725-6729
83. **Yong V.W., Krekowski C.A., Forsyth P.A., Bell R., Edwards D.R.**: Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neuro. Sci.* 21 (1998): 75-80

7. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung	Seite	
1.1.	MRT eines Medulloblastom	4
1.2.	Histologische Färbung eines Kryoschnittes eines MDB	6
1.3.	Immunhistochemische Merkmale eines MDB	7
1.4.	Desmoblastisches MDB	8
1.5.	Schematischer Aufbau der verschiedenen MMPs	13
1.6.	Schema der Aktivierungskaskade der MMPs	15
1.7.	Histologische Kryoschnitte eines Glioblastoms	18
3.1.	Semiquantitative PCR-Analyse der Expression von MMP-mRNA	42
3.2.	IHC-Färbung an nativen Tumorgewebe auf Gelatinase-A	53
3.3.	IHC-Färbung an nativen Tumorgewebe auf Gelatinase-B	54
3.4.	IHC-Färbung an nativen Tumorgewebe auf Stromelysin-1	56
3.5.	IHC-Färbung an nativen Tumorgewebe auf Matrilysin	57
3.6.	IHC-Färbung an nativen Tumorgewebe auf Humane Makrophagen Elastase	58
4.1.	Schema der Aktivierungskaskade der MMPs	61

8. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle		Seite
1.1.	ECM-Strukturen und ihre Komponenten	9
1.2.	MMPs und ihre bevorzugten Substrate	12
1.3.	Merkmale der verschiedenen TIMPs	16
2.1.	Daten der Primärkulturen für Paraffinschnitte	23
2.2.	Daten der Nativgewebe für Kryoschnitte	29
2.3.	Optimierte PCR-Bedingungen	41
3.1.	Semiquantitative Auswertung der IHC-Färbungen der Zelllinien und Primärkulturen (Paraffinschnitte)	49
3.2.	Semiquantitative Auswertung der IHC-Färbungen an nativen Tumormaterial (Kryostatschnitte)	52
3.3.	Vorwiegende MMP-9-Lokalisation in nativen Tumorgewebe	55
3.4.	Semiquantitative Auswertung der MMP-3-Expression unter Berücksichtigung des vorherrschenden Ausreifungstyps	56

9. Abkürzungsverzeichnis

A

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AP	Activator-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
assoz.	assoziiert

B

β -ME	beta-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise

C

ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlendioxid

D

DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanintriphosphat
d.h.	das heißt
d H ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat

DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat

E

ECM	extracellular matrix (Extrazellular-Matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol

F

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

G

g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme

H

h	Stunde(n)
H	Wasserstoff
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

I

Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie

K

kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid

L

l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid

M

M	molar (mol/l)
MDB	Medulloblastom
MetOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
μ	Mikro (x 10 ⁻⁶)
min	Minute(n)
M-MLV	Murine Maloney Leukemia Virus
MMP	Matrix-Metalloproteinase
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA
MT-MMP	Membran-ständige Matrix-Metalloproteinase

N

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Nm	Nanometer

O

OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt

P

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered Saline-Puffer
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol ester Tumor Promotor

R

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

S

s.	siehe
sec	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecyl-Sulfat
s.o.	siehe oben

T

t	time
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylenethyldiamin
TGF- β	Transforming-growth-factor beta
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase (körpereigener MMP-Inhibitor)
t-PA	tissue-type Plasminogen-Aktivator
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

U

U	Unit
u.a.	unter anderem
u-PA	urokinase-type plasminogen activator
UV	ultraviolett

V

V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche

W

WHO

World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

Z

z.B.

zum Beispiel

ZNS

Zentrales Nervensystem

An dieser Stelle möchte ich 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, sowie für die Übernahme der Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J.-C. Tonn für die Bereitstellung des Themas im tumorbiologischen Labor. Ohne seine fachkundigen Hinweise wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Herrn Dr. G. Vince möchte ich für die Einarbeitung in die verschiedenen Techniken der Molekularbiologie und seine Anregungen zur Gestaltung der vorliegenden Arbeit danken.

Bedanken möchte ich mich besonders bei Frau S. Kerkau für die Einarbeitung in die angewandten Zellkulturen und die hilfreiche Unterstützung während der Experimente.

Herrn PD Dr. Pietsch vom Institut für Neuropathologie, Bonn, verdanke ich die Überlassung der in dieser Arbeit verwendeten Medulloblastom-RNA.

Diese Dissertation hätte nicht ohne die Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern und Studenten des Tumorbiologischen Labors der Neurochirurgischen Klinik Würzburg entstehen können. Ihnen allen möchte ich meinen Dank aussprechen.

Curriculum vitae

Stefanie Franz

Persönliche Daten

Geboren: 13. Februar 1971 in Ulm / Deutschland
Staatsangehörigkeit: deutsch
Zivilstand: ledig

Schulbildung

1977 bis 1988 Dossenberger Grundschule in Günzburg
1981 bis 1991 Dossenberger Gymnasium Günzburg
1988 bis 1989 Austauschschülerin an der amerikanischen Highschool in
Poulsbo, Washington State, USA

Studium

1991 bis 1994 Psychologiestudium an der Universität Konstanz
07/1993 Vordiplom Psychologie
07 - 09/1994 Medizinstudium an der Semmelweis-Universität Budapest,
Ungarn
10/1994 Beginn des Medizinstudiums an der Julius-Maximilian-
Universität Würzburg
04/1997 Ärztliche Vorprüfung
04/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

1997 – 2000 Chirurgie (Berlin), Anästhesie (Valencia, Spanien),
Pneumologie (Würzburg)

Praktisches Jahr

10/00 – 02/01 Pädiatrie, Hospital Pediatrico Docente de Centro Habana, Cuba
02/01 – 06/01 Chirurgie, Hospital Universitario de Salamanca, Spanien
06/01 – 08/01 Innere Medizin, Kantonsspital Basel, Schweiz

AIP

04/02 – 09/02 AIP Kardiologie, Klinikum am Urban, Berlin
10/02 – 09/03 AIP Anästhesie, Dominikus Krankenhaus, Berlin

Seit 11/03

Assistenz

Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin des
Ernst-von-Bergmann-Klinikum, Potsdam

Seit 1998

Promotion

Thema: „ Die Expression und Verteilung von Matrix-Metallo-
Proteasen in humanen Medulloblastomen“; Tumorbiologie der
Neurochirurgischen Abteilung Universität Würzburg

1991 – 1994

Nebentätigkeiten

Aushilfstätigkeit im Pflegedienst auf verschiedenen Stationen,
BKH Günzburg

1994 – 1996

Aushilfstätigkeit in einem Wohnheim für geistig und körperlich
Behinderte

1996 – 1998

Einsatz im Pflegedienst auf verschiedenen Stationen der
Universitätsklinik Würzburg

1996 – 1998

Wissenschaftliche Assistenz und Supervision im
Untersuchungslabor für Schlafstörungen von Dr. med. L.
Blecher in Würzburg, Deutschland

Sprachen

Englisch / Spanisch: fließend

Französisch / Italienisch: Mittelstufe

Berlin, im Juni 2004

