

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Christian P. Speer

Etablierung orthotoper Gehirntumor-Modelle in der Maus

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

vorgelegt von
Sebastian Dietl
aus Unterpleichfeld

Würzburg, März 2016

Referent: Prof. Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel

Korreferent: Prof. Dr. med. Anna-Leena Sirén

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2018

Der Promovend ist Arzt

Abkürzungen

AG	Arbeitsgruppe
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ATRT	Atypisch teratoid/rhabdoider Tumor
aq. dest.	aqua destillata
bFGF	basic fibroblast growth factor
BLI	Biolumineszenz imaging
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxynucleic acid
CEP	chromosome enumeration probe
DAB	Diaminobenzidin
DC	dendritic cell
DEAB	Diethylaminobenzaldehyd
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxyribose Nukleosid Triphosphat
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGF	epidermal growth factor
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EGFR	epidermal growth factor receptor
EWS/FLI1	Ewing sarcoma/Friend leukemia virus integration 1
FACS	fluorescence activated cell sorting
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FLuc	firefly luciferase
FSC	forward scatter
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase

Abkürzungen

GFAP	glial fibrillary acidic protein
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin Eosin
HLA	human leukocyte antigen
i.e.	id est
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
IVC	individually ventilated cages
MACS	magnetic activated cell sorting
MEM	minimal essential medium
MHC	major histocompatibility complex
MRT	Magnetresonanztomographie
NOD/SCID	non obese diabetes/severe combined immunodeficiency
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pPNET	peripherer primitiv neuroektodermaler Tumor
PTEN	phosphatase and tensin homolog
ROI	region of interest
RNA	ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
SCM	serum containing medium
SFM	serum free medium
SPF	specific pathogen free
SSC	side scatter
TAE	Tris Acetat EDTA
TBS	tris buffered saline
TRP 2	tyrosinase related protein 2
TSE	Turbospinecho
UKW	Universitätsklinikum Würzburg

Abkürzungen

VEGF	vascular endothelial growth factor
vs.	versus
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. Vorwort	1
2. GL261-FLuc Glioblastom-Modell	2
2.1. Einleitung	2
2.2. Zielsetzung	5
2.3. Material und Methoden	6
2.4. Ergebnisse	22
2.5. Diskussion	33
2.6. Anhang	39
3. MB3W1 Medulloblastom-Modell	40
3.1. Einleitung	40
3.2. Zielsetzung	43
3.3. Material und Methoden	44
3.4. Ergebnisse	61
3.5. Diskussion	84
3.6. Anhang	88
4. Zusammenfassung	90
5. Literaturverzeichnis	93

1. Vorwort

Gehirntumore zählen zu den häufigsten Tumoren des Kindesalters. Sie repräsentieren mit ca. 20 % nach den Leukämien die zweitgrößte Gruppe pädiatrischer Neoplasien. Innerhalb der Gruppe der soliden Tumore stehen Gehirntumore statistisch sogar an erster Stelle [1, 2]. Obwohl zahlreiche medizinische Fortschritte die Überlebenschancen für Kinder und Jugendliche, die an einem Gehirntumor leiden, verbessern konnten, verstorbt auch heute noch ca. 1/3 der Betroffenen [1, 3]. Die Überlebenden leiden häufig ein Leben lang unter den Langzeitfolgen der intensiven Therapie. Nicht selten ist eine körperliche und/oder geistige Behinderung der Preis für das Überleben [4]. Zwei Entitäten, die auch heute noch zu den großen Herausforderungen der pädiatrischen Onkologie zählen, sind das Glioblastom und das Medulloblastom. Da weder der Ursprung noch die verantwortlichen Pathomechanismen dieser Tumore im Detail geklärt sind und bisher auch keine zufriedenstellenden Therapien bestehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei murine Gehirntumor-Modelle etabliert: ein syngenes Glioblastom- sowie ein xenogenes Medulloblastom-Modell.

2. GL261-FLuc Glioblastom-Modell

2.1. Einleitung

Das Glioblastom ist ein hochmaligner hirneigener Tumor. Biologisches Kennzeichen des Glioblastoms ist sein schnelles und invasives Wachstum, das auch heute noch zu einer infausten Prognose führt [5]. Im Erwachsenenalter stellt das Glioblastom den häufigsten Gehirntumor dar. Im Kindesalter kommt es selten vor. Nur 3 % der pädiatrischen Gehirntumore sind Glioblastome [6, 7]. Die Inzidenz pädiatrischer Glioblastome beträgt 0,14 Fälle pro 100.000 Personenjahre und zeigt eine Bevorzugung des männlichen Geschlechts (0,16 Fälle bei Knaben vs. 0,12 Fälle pro 100.000 Personenjahre bei Mädchen) sowie des höheren Kindesalters (0,09 Fälle bei 0-4 Jährigen vs. 0,17 Fälle pro 100.000 Personenjahre bei 15-19 Jährigen) [7]. Obgleich Glioblastome im Kindesalter ihrem adulten Konterpart histomorphologisch gleichen, scheinen sie genetisch und biologisch dennoch verschieden zu sein [8]: So entstehen Glioblastome im Kindesalter fast ausschließlich de novo (primäres Glioblastom), während sie sich im Erwachsenenalter in bis zu 10 % der Fälle sekundär aus Grad II oder III Astrozytomen entwickeln können (sekundäres Glioblastom). Die bei Kindern in die Tumorgenese involvierten Signalwege finden sich jedoch interessanter-weise vor allem bei adulten sekundären Glioblastomen [5, 9, 10]. So weisen pädiatrische Glioblastome in 36-40 % der Fälle prognostisch nachteilige Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53* auf, während diese beim primären Glioblastom des Erwachsenen nur in 28 % der Fälle vorkommen [11-14]. *EGFR* Amplifikationen, die beim primären Glioblastom des Erwachsenen die häufigste Genamplifikation darstellen (36 %), sind beim pädiatrischen Glioblastom selten (6 %) [5, 11], ebenso *PTEN* Mutationen. Während *PTEN* in bis zu 40 % der adulten primären Glioblastome alteriert ist [13], finden sich nur in 4 % der pädiatrischen Glioblastome *PTEN*

Mutationen [15]. Dennoch weisen 46-79 % der pädiatrischen Glioblastome eine Aktivierung des PTEN/AKT Signalweges auf, welche mit einer schlechten Prognose assoziiert zu sein scheint [16, 17]. Ein weiterer Unterschied zwischen pädiatrischen und adulten Glioblastomen besteht hinsichtlich der Prognose. So beträgt das 5-Jahresüberleben der 0-19 Jährigen 18,2 %, während ab dem 75. Lebensjahr nur noch 0,8 % der Betroffenen das 5. Jahr nach Diagnose überleben [7]. Die Therapie des pädiatrischen Glioblastoms erfolgt derzeit multimodal und risikoadaptiert in Therapieoptimierungsstudien. Sie besteht in der Regel aus maximal möglicher Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie [18]. Die Probleme, die bei der Behandlung bestehen, sind dabei mannigfaltig und ergeben sich sowohl aus der Biologie des Glioblastoms als auch aus der Vulnerabilität des kindlichen Gehirns. Eine vollständige Resektion der Tumore ist zumeist unmöglich. Glioblastome wachsen zum einen häufig in oder nahe an Arealen, die von essentieller funktioneller Bedeutung sind, was die Radikalität der Operation stark limitiert. Zum anderen befinden sich zum Zeitpunkt der Operation zumeist schon radiologisch und operationsmikroskopisch unsichtbare invasive Tumorzellen in der Umgebung der Haupttumormasse, die bei der Resektion nicht miterfasst werden [5, 8, 18]. Die Behandlung der nach Resektion verbliebenen Tumorzellen mittels Bestrahlung und Chemotherapie ist nicht minder problematisch. Der Erfolg einer sich anschließenden Radiatio ist nicht nur durch die bestrahlungsbedingte Induktion von Reparaturmechanismen in den Tumoren [19], sondern auch durch die hohe Vulnerabilität des sich entwickelnden kindlichen Gehirns limitiert [4]. In der Regel wird versucht eine Bestrahlung bis zum 4. Lebensjahr zu vermeiden [18, 20]. Einem durchschlagenden Erfolg der zur Therapie eingesetzten Chemotherapeutika stehen nicht nur die geringen lokalen Wirkkonzentrationen, die durch die Bluthirnschrankenfunktion und den hohen physikalischen Druck innerhalb der Haupttumormasse bedingt sind, entgegen [5], sondern auch die zumeist ausgeprägte Toxizität der eingesetzten Medikamente [4, 18] sowie die zahlreichen zellulären Chemoresistenzmechanismen, die Glioblastomzellen während der Therapie entwickeln [5, 19]. Trotz intensiver Therapie sind die Überlebensraten für Glioblastompatienten

auch heute noch im Vergleich zu anderen pädiatrischen Tumoren gering und die Nebenwirkungen der Behandlung immens. Die wenigen Überlebenden leiden häufig unter schweren geistigen und körperlichen Langzeitschäden und unter einem erhöhten Zweitmalignomrisiko [4, 5, 18]. Neue Therapieansätze mit besserer Wirksamkeit und weniger Nebenwirkungen werden dringend benötigt. Eine Möglichkeit könnten Immuntherapien sein. Neue Einblicke in die Funktion des Immunsystems sowie in tumorimmunologische „escape“ Mechanismen haben mittlerweile bereits zur Testung antitumoraler Immuntherapien in der Klinik geführt [21]. Auch beim Glioblastom scheint der Einsatz von Immuntherapien rational, da bereits eine Vielzahl von „immune escape“-Mechanismen bekannt ist, wie beispielsweise die Blockade zytotoxischer T-Lymphozyten und natürlicher Killerzellen durch die Expression von HLA G und E [22, 23], die Vermehrung regulatorischer T-Zellen [24, 25] sowie erhöhte TGF β Blutkonzentrationen [26]. Durch präklinische Studien am Universitätsklinikum Leuven [27-29] haben DC-vermittelte Tumorstimmungen bei Glioblastom-patienten bereits den Weg in die Klinik gefunden [30, 31].

2.2. Zielsetzung

Auch hier am Universitätsklinikum Würzburg sind präklinische und klinische Studien zur Immuntherapie maligner Gliome geplant [32]. Da diese teilweise auf den Forschungsergebnissen der Arbeitsgruppen um Herrn Prof. Stefaan Van Gool (Leuven) aufbauen sollen, war eine Zielsetzung dieser Arbeit, das **syngene GL261 Glioblastom-Modell**, welches auch in Leuven als Tumormodell dient, zu etablieren. Es ist eines der wenigen Glioblastom-Modelle, das die fundamentalen biomorphologischen Charakteristika humaner Glioblastome aufweist und zugleich deren Erforschung in immunkompetenter Umgebung erlaubt [33]. Seit der Induktion der Zelllinie GL261 1939 in C57BL/6 Mäusen liefert das Modell wichtige immunbiologische Erkenntnisse und wird heute als der murine Goldstandard experimenteller Immuntherapie-Modelle angesehen [28]. Zur Etablierung des Glioblastom-Modells wurden lentiviral transduzierte, Luciferase exprimierende Zellen (GL261-FLuc Zellen) verwendet [27], die zu diesem Zweck freundlicherweise von Herrn Prof. Van Gool überlassen wurden.

2.3. Material und Methoden

2.3.1. Material

Tab. 1: Material

Material	Hersteller	Bestellnr.
Accutase	PAA (Cölbe)	L11-007
Antikörperverdünnungspuffer	DCS (Hamburg)	AL120R100
APC anti mouse H-2Kb	BioLegend (Fell)	116518
APC Mouse IgG2a, κ	BioLegend (Fell)	400219
Anti-CD34	BioGenex (Fremont)	AM236-5M
Anti-GFAP	Millipore (Darmstadt)	AB5804
Anti-S100	DAKO (Hamburg)	Z0311
Anti-VEGF	BioGenex (Fremont)	PU360-UP
aq. dest. (steril)	PAA (Cölbe)	S15-012
B6(Cg)- <i>Tyrc^{-2J}</i> /J Mäuse	Jackson Laboratory (Bar Harbor)	
Bepanthen Augen- u. Nasensalbe	Bayer (Leverkusen)	
Black Isoplate-96	PerkinElmer (Waltham)	6005020
Braunol	B. Braun (Melsungen)	
BX51	Olympus (Hamburg)	
C57BL/6J Mäuse	Jackson Laboratory (Bar Harbor)	
cellSens 1.6	Olympus (Hamburg)	
Citronensäure	AppliChem (Darmstadt)	A1350
Chloralhydrat	Merck (Darmstadt)	102425
Chloroform	SIGMA-ALDRICH (Steinheim)	32211
DAB	DAKO (Hamburg)	K3467
DPBS	PAA (Cölbe)	H15-002
DMEM	GIBCO (Carlsbad)	41965-039
DMSO	SIGMA-ALDRICH (Steinheim)	D2650
Eosin	Merck (Darmstadt)	115935
Esketamin	Pfizer (Berlin)	
Ethanol	Universitätsapotheke	
Eukitt	O.Kindler (Freiburg)	
FACS Canto II	BD Biosciences (Heidelberg)	

Material und Methoden

Firefly D-Luciferin	Biosynth (Staad)	L-8220
FKS	PAA (Cölbe)	A15-105
Fucidin Salbe (2 %)	LEO Pharma (Neu-Isenburg)	
Gadopentetat-Dimeglumin	Marotrast (Jena)	
GL261 u. GL261-FLuc Zellen	UZ Leuven (Leuven)	
GraphPad PRISM (5.0c)	GraphPad Software (La Jolla)	
Hämatoxylin	Carl Roth (Karlsruhe)	3816.2
Hamilton Needle (custom made)	Hamilton Company (Bonaduz)	7804-03
Hamilton Syringe (25 µl)	Hamilton Company (Bonaduz)	7636-01
HCl	AppliChem (Darmstadt)	A1434
H ₂ O ₂	Merck (Darmstadt)	107209
IFN γ	BioLegend (Fell)	575306
IVC Anlage	Tecniplast (Hohenpeißenberg)	
IVIS Spectrum	Caliper Life Sciences (Waltham)	
Kalialaun	Merck (Darmstadt)	101042
Knochenwachs W30 E	Ethicon (Norderstedt)	
Kryoröhrchen	Nunc (Waltham)	368632
Living Image 4.0	Caliper Life Sciences (Waltham)	
MAGNETOM Trio	Siemens (Erlangen)	
Microsoft Excel (12.1.0)	Microsoft (Redmond)	
MultiLink Sekundärantikörper	BioGenex (Fremont)	LP000-UL
NaCl	AppliChem (Darmstadt)	A3597
NaCl (0,9 %)	B. Braun (Melsungen)	
NaH ₂ PO ₄	AppliChem (Darmstadt)	A1938
Na ₂ HPO ₄	AppliChem (Darmstadt)	A3599
NaOH	AppliChem (Darmstadt)	A1432
Natriumjodat	Merck (Darmstadt)	106525
Neubauer Zählkammer	A.Hartenstein (Würzburg)	ZK13
Objektträger (SuperFrost Plus)	Menzel (Braunschweig)	J1800AMNZ
OsiriX v.3.9.4	Pixmeo (Bernex)	
Paraffin	Leica Biosystems (Nussloch)	39601006
Penicillin/Streptomycin	PAA (Cölbe)	P11-010
PFA	Merck (Darmstadt)	818715
Präpariertupfer Telaprep No.1	Hartmann (Heidenheim)	
Propanoltupfer QUICKPAD	Holtsch (Taunusstein)	
Rundkopfböhrer (H1, \varnothing 0,4 mm)	NTI-Kahla (Kahla)	
Stereotaxie-Bohrmaschine	David Kopf Instruments (Tujunga)	1471
Stereotaxie-Instrument	David Kopf Instruments (Tujunga)	902, 926, 1772

Material und Methoden

Sterican Gr. 18 (ø 0,45 mm)	B. Braun (Melsungen)	
Sterilfilter (0,2 µm)	A. Hartenstein (Würzburg)	FI02
Streptavidin-Peroxidase	BioGenex (Fremont)	LP000-UL
Tris	AppliChem (Darmstadt)	A1086
Trypanblau	GIBCO (Carlsbad)	15250-061
VenorGeM Mykoplasmen Detektionskit	Minerva Biolabs (Berlin)	11-1025, 53-0050
Vicryl 4-0	Ethicon (Norderstedt)	V392ZH
Xylazin	CP-Pharma (Burgdorf)	
Xylol	Staub & Co (Nürnberg)	1000453910008
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)	658175
Ziegennormalserum	Invitrogen (Darmstadt)	50062Z
3T Loop (7 cm)	Siemens (Erlangen)	
7-AAD	BD Biosciences (Heidelberg)	559925

Tab. 2: 4 % PFA-Lösung (pH 7,4)

4 g PFA 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer [14,32 g Na ₂ HPO ₄ , 1,56 g NaH ₂ PO ₄ , 1 l aq. dest.]

Tab. 3: Luciferin-Grundstock (30 mg/ml, sterilfiltriert)

1g Firefly D-Luciferin 33,3 ml steriles aq. dest.
--

Tab. 4: HE-Lösungen

Hämalaun	Eosin
1,2 g Hämatoxylin 0,2 g Natriumjodat 50 g Kalialaun 50 g Chloralhydrat 1 g Citronensäure 1 l aq. dest.	5 g Eosin 500 ml aq. dest.

Tab. 5: Puffer

Citratpuffer (pH 6,0)	TBS-Puffer (pH 7,6)
10,5 g Citronensäure 5,1 g NaOH 2,5 l aq. dest.	169,4 g NaCl 121,1 g Tris 80 ml HCl (25 %) 2 l aq. dest.

2.3.2. Methoden

2.3.2.1. Zellkultur

Die murine Glioblastomlinie GL261 bzw. GL261-FLuc wurde in DMEM supplementiert mit 10 % FKS und 40 U/ml bzw. µg/ml Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 21 % O₂, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit adhärent in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Das Passagieren der Zellen wurde mechanisch mittels Pipette durchgeführt. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in Stickstoff bei -196 °C. Hierzu wurden die Zellen wie beim Passagieren mechanisch dissoziiert. Nach Zentrifugation (5 min bei 500 g) wurden die Zellen in Kulturmedium supplementiert mit 10 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen über Nacht bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zur Kryokonservierung in Stickstofftanks überführt. Nach Inkulturnahme, vor Kryokonservierung und vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit Hilfe des VenorGeM Mykoplasmen Detektionskits nach Herstellerangabe auf Mykoplasmen getestet. Eine Mykoplasmeninfektion wurde stets ausgeschlossen.

2.3.2.2. Durchflusszytometrie

Die Expression der murinen MHC Klasse I (H2Kb) auf GL261-FLuc Zellen wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers FACS Canto II bestimmt. Hierzu wurden die Zellen für 4 Tage sowohl in reinem Kulturmedium als auch in Kulturmedium plus IFN γ (1000 ng/ml) kultiviert. Nach enzymatischer Zellernte mit Accutase (gemäß Herstellerangabe) wurde eine Zellkonzentration von 1 Millionen Zellen pro 100 µl DPBS eingestellt. Anschließend wurden die Zellen abgedunkelt für 20 min bei Raumtemperatur (RT) mit APC anti mouse H-2Kb (1:100) inkubiert. Als Isotypenkontrolle diente APC Mouse IgG2a, κ (1:100).

Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen nach Hinzugabe von 50 µl DBPS abzentrifugiert (5 min bei 500 g), in 200 µl DPBS resuspendiert und durchflusszytometrisch untersucht. Zur Bestimmung der Lebendpopulation im forward und side scatter (FSC u. SSC) wurde an ungefärbten GL261-FLuc Zellen eine lebend-tot-Färbung mit 7-AAD (nach Herstellerangabe) durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten H2Kb exprimierende B6 Splenozyten, als Negativkontrolle H2Kk exprimierende C3H/HeNCrI Splenozyten.

2.3.2.3. Orthotope Tumorzellinokulation

Die Durchführung der in vivo Versuche erfolgte nach Genehmigung durch die Regierung von Unterfranken gemäß den nationalen tierschutzrechtlichen Richtlinien.

2.3.2.3.1. Versuchstiere

Weibliche C57BL/6J Mäuse (B6) und deren Albinomutante B6(Cg)-*Tyrc^{-2J}/J* (B6a) wurden von „The Jackson Laboratory“ bezogen und unter specific pathogen free (SPF) Bedingungen in einer IVC-Anlage gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

2.3.2.3.2. Tumorzellpräparation

Kurz vor der in vivo Inokulation wurden in vitro kultivierte (siehe Kap. 2.3.2.1.) GL261-FLuc Zellen bei ca. 80 % Konfluenz mit 4 °C kaltem Kulturmedium vom Flaschenboden abpipettiert und mechanisch dissoziiert. Anschließend wurde die Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Exklusion in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellkonzentration nach Zentrifugation

(5 min bei 500 g) auf 5×10^5 Zellen pro 5 μ l Kulturmedium eingestellt. Bis zur Inokulation wurden die Zellen in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß bei RT gelagert.

2.3.2.3.3. Tumorzellinokulation

9 Wochen alte B6 oder B6a Mäuse wurden durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von Esketamin (100-125 mg/kg) und Xylazin (10-12,5 mg/kg) narkotisiert. Bei Erreichen einer suffizienten Narkosetiefe (in der Regel 5-10 min post injectionem) wurde begonnen, die Kalottenbehaarung mit Hilfe einer Pinzette zu epilieren. Das Operationsgebiet wurde mit Propanol und Braunol desinfiziert. Bepanthen-Salbe wurde auf die Augen aufgetragen. Anschließend wurden die Versuchstiere in Bauchlage in ein stereotaktisches Instrument (Abb. 1) eingespannt.

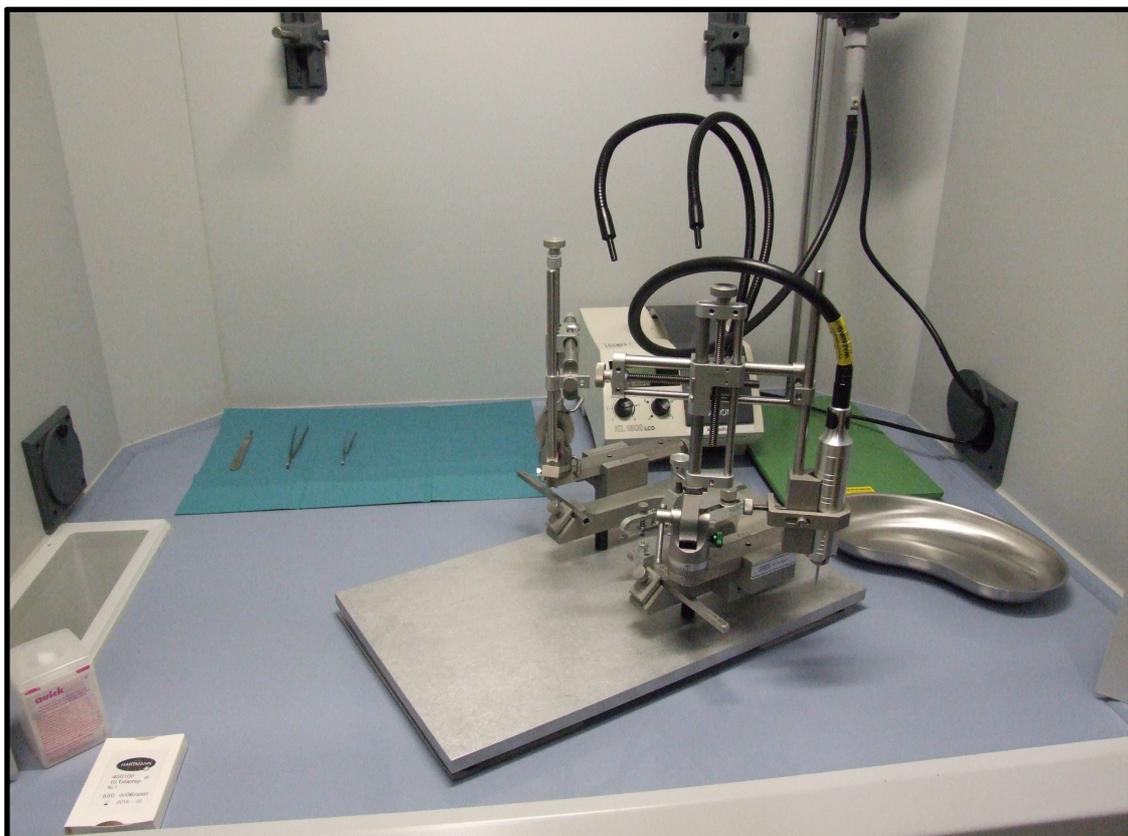


Abb. 1: Stereotaktisches Instrument

Als nächstes wurde die Kalottenhaut durch einen ca. 1 cm langen, knapp paramedianen Sagittalschnitt eröffnet. Der Hautschnitt wurde mit Hilfe einer gekröpften Pinzette aufgespreizt und das Bregma wurde dargestellt. Zur Markierung der Inokulationskoordinaten wurde die Kalotte mit einem Rundkopfböhrer (\varnothing 0,4 mm) und einer Stereotaxie-Böhrmaschine 2 mm rechts und 2 mm caudal des Bregmas angebohrt. Zum letztendlichen Durchbohren des Schädelknochens wurde eine Einmalkanüle mit Facettenschliff (\varnothing 0,45 mm) verwendet. Eventuelle Trepanationsblutungen wurden mit Hilfe eines Präpariertupfers gestoppt. Nun wurden die zu inokulierenden Zellen nochmals mit Hilfe einer 200 μ l Pipette homogen resuspendiert, bevor 5 μ l der Zellsuspension (i.e. 5×10^5 GL261-FLuc Zellen) mit einer 26 G Hamilton Nadel (custom specifications: length 30 mm, point style 4) in eine 25 μ l Hamilton Spritze aufgezogen wurden. Dann wurde die beladene Spritze zur exakten Führung in den stereotaktischen Spritzenhalter eingespannt. Zur Inokulation wurde die Nadel zunächst 3 mm tief ins Hirnparenchym abgesenkt und anschließend wieder 0,5 mm zurückgezogen, so dass vor der Nadelspitze ein 0,5 mm langer Stichkanal entstanden war. Die Nadel wurde für 1 min an Ort und Stelle belassen, bevor die Zellen über einen Zeitraum von 3 min langsam und konstant injiziert wurden. Nach Injektion wurde 2 min gewartet, bevor die Nadel über einen Zeitraum von 3 min vorsichtig wieder zurückgezogen wurde. Nach Entfernen der Nadel wurden eventuelle Flüssigkeitsrückstände am Bohrlochrand mit einem Präpariertupfer entfernt und das Bohrloch wurde mit einem Knochenwachsapfen verschlossen. Die Versuchstiere wurden wieder aus dem Stereotaxie-Instrument ausgespannt und der Schädelknochen wurde mit ca. 500 μ l NaCl (0,9 %) gespült. Die Haut wurde mit 3-4 Einzelheftnähten (Vicryl 4-0) verschlossen. Zum Schluss wurden auf die genähte Schnittwunde 2 % Fucidin Salbe und auf die Augen nochmals Bepanthen-Salbe aufgetragen. Vor der nächsten Inokulation wurde die Spritze samt Nadel zuerst mit 70 % Ethanol und dann mit Kulturmedium durchgespült. Zur Negativkontrolle wurden einzelne Versuchstiere mit reinem Kulturmedium inokuliert.

2.3.2.3.4. Postoperative Evaluation

Die Versuchstiere wurden postoperativ täglich kontrolliert. Bei Zeichen einer versuchsbedingten Belastung wurden die Versuche abgebrochen (humane endpoint). Hierzu wurden die Versuchstiere in tiefer Narkose durch zervikale Dislokation euthanasiert.

2.3.2.4. Biolumineszenz imaging (BLI)

Das BLI erfolgte mit Hilfe eines IVIS Spectrum und der Software Living Image.

2.3.2.4.1. In vitro BLI

Die FLuc-Expression von GL261-FLuc Zellen wurde mittels in vitro BLI und Regressionsanalyse quantifiziert. Hierzu wurden in vitro kultivierte Zellen mit Accutase vom Flaschenboden abgelöst. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen zentrifugiert (5 min bei 500 g) und in einer Konzentration von 10^6 Zellen/100 μ l in Kulturmedium resuspendiert. Mittels 1:10 Verdünnungsreihe wurden verschiedene Konzentrationsstufen bis 10^2 Zellen/100 μ l hergestellt. Triplikate jeder Konzentrationsstufe wurden dann in eine 96-well Black Isoplate (black frame, clear well) überführt und jeweils 2 min nach Zugabe von 100 μ l Luciferin (1,5 mg/ml) vermessen. Zur Quantifizierung der pro Sekunde emittierten Photonen wurden die einzelnen wells als region of interest (ROI) definiert. Das Hintergrundsignal wurde mit Hilfe von 10^6 untransduzierten GL261 Zellen bestimmt.

2.3.2.4.2. In vivo BLI

Das in vivo Wachstums der orthotop inokulierten GL261-FLuc Zellen wurde ab dem 1. postoperativen Tag alle 2 Tage mittels in vivo BLI verfolgt. Hierzu wurden die Versuchstiere durch i.p. Injektion einer Mischung aus Esketamin (80 mg/kg), Xylazin (16 mg/kg) und Luciferin (300 mg/kg) narkotisiert und 10 min post injectionem in Bauchlage mittels BLI untersucht. Zur Quantifizierung des BLI Signals wurde eine quadratische ROI definiert, die den gesamten Schädel einschloss.

2.3.2.4.3. Ex vivo BLI

Um zu überprüfen, ob es im Verlauf der in vivo Versuche zu einem Überqueren des Balkens durch GL261-FLuc Zellen gekommen war, wurden die Gehirne von je 5 tumortragenden B6 und B6a Mäusen am Ende der Versuche auch mittels ex vivo BLI untersucht. Hierzu wurden die Tiere am Tag des Versuchabbruchs zunächst noch mittels in vivo BLI evaluiert und unverzüglich nach der Untersuchung euthanasiert. Nach ihrer Entnahme wurden die Gehirne der Tiere sowohl vor als auch nach Spaltung in der fissura longitudinalis ex vivo mittels BLI evaluiert. Zur Quantifizierung der pro Sekunde emittierten Photonen wurde dieselbe ROI verwendet, die beim in vivo BLI definiert wurde. Um ein Hintergrundsignal festlegen zu können, wurden auch die Gehirne der Negativkontrollen mituntersucht.

2.3.2.5. Magnetresonanztomographie (MRT)

Mit freundlicher Unterstützung der Abteilung für Neuroradiologie (Universitätsklinikum Würzburg) wurde das GL261-FLuc Modell auch mittels MRT evaluiert. Hierzu wurden kontrastmittelgestützte Aufnahmen mit Hilfe einer Ringspule und eines 3 Tesla MRT's angefertigt. Nach i.p. Narkoseinduktion

(80 mg/kg Esketamin und 16 mg/kg Xylazin) wurden zunächst native T1 (TE 11 und TR 610 msec) und T2 (TE 84 und TR 3380 msec) gewichtete TSE Sequenzen aufgenommen. Anschließend wurden 100 µl (0,5 M) Gadopentetat-Dimeglumin i.p. appliziert und nach 5 min wurde die T1 gewichtete TSE Sequenz wiederholt. Zur Bildverarbeitung wurde die Software OsiriX benutzt.

2.3.2.6. Histologie

Die Gehirne aller Versuchstiere wurden histologisch aufbereitet und mit Hilfe des Mikroskops BX51 und der Software cellSens mikroskopisch untersucht.

2.3.2.6.1. Gehirnpräparation

Unmittelbar nach Euthanasie wurden die Gehirne der Versuchstiere entnommen und für 24 h in 4 % PFA bei 4 °C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Gehirne durch einen Coronarschnitt, der entweder mittig durch den Tumor führte oder im Falle der Negativkontrollen nah an der Inokulationsstelle lag, in eine rostrale und caudale Hälfte geteilt. In Einbettkassetten wurden die Gehirne schrittweise dehydriert und in Paraffin eingebettet (Tab. 6). Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 3 µm Schnitte angefertigt, die auf Objektträger aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden über Nacht bei RT getrocknet und schließlich bei RT gelagert.

Tab. 6: Dehydration/Paraffineinbettung

50 % Ethanol	20 min
70 % Ethanol	20 min
80 % Ethanol	20 min
96 % Ethanol	20 min
100 % Ethanol	20 und 30 min
1:1 Ethanol/Chloroform	2x30 min
Chloroform	2x30 min
Paraffin	50 und 30 min
Paraffin	einbetten

2.3.2.6.2.Hämatoxylin Eosin (HE)

Zur morphologischen Beurteilung wurden die histologischen Präparate gemäß eines Routineprotokolls (Tab. 7) HE gefärbt. In Kürze: Nach Entparaffinierung wurden die Schnitte zuerst mit Hämatoxylin und anschließend mit Eosin gefärbt. Nach Entwässerung wurden die gefärbten Präparate schließlich mit Eukitt eingedeckelt.

Tab. 7: HE-Protokoll

Entparaffinieren	
Xylol	2x10 min
100 % Ethanol	kurz schwenken
100 % Ethanol	5 min
96 % Ethanol	kurz schwenken
96 % Ethanol	5 min
70 % Ethanol	kurz schwenken
70 % Ethanol	5 min
aq. dest.	kurz schwenken
Hämalaun-Färbung	
Hämalaun	15 min
aq. dest.	kurz schwenken
fließendes Leitungswasser	10 min
aq. dest.	kurz schwenken
Eosin-Färbung	
Eosin	7 min
fließendes Leitungswasser	kurz spülen
aq. dest.	kurz schwenken
Entwässern	
96 % Ethanol	kurz schwenken
96 % Ethanol	kurz schwenken
100 % Ethanol	kurz schwenken
100 % Ethanol	kurz schwenken
Xylol	2x10 min
Eindeckeln	

2.3.2.6.3. Immunhistochemie (IHC)

Zur weiteren Charakterisierung wurden die histologischen Präparate auch immunhistochemisch untersucht (Tab. 8 und 9). In Kürze: Nach Entparaffinierung wurden die Präparate zur Antigendemaskierung in Citratpuffer gekocht. Durch Inkubation in H_2O_2 und Ziegennormalserum wurden eventuell endogen exprimierte Peroxidase und unspezifische Epitope blockiert. Anschließend wurden die Präparate mit Primärantikörpern (Verdünnung mit Antikörperverdünnungspuffer), biotinylierten MultiLink Sekundärantikörpern und Streptavidin-Peroxidase-Konjugat inkubiert. Nach immunhistochemischer Visualisierung der Antikörperbindung mit Hilfe des Chromogens DAB wurden die Präparate noch mit Hämalaun gegengefärbt und nach Entwässerung mit Eukitt eingedeckelt. Um die Spezifität der eingesetzten Antikörper/Chemikalien zu überprüfen, wurden alle eingesetzten Primärantikörper austitriert, Kontrollfärbungen ohne Primärantikörper mit reinem Antikörperverdünnungspuffer angefertigt und Negativ- sowie Positivkontrollpräparate mitgeführt.

Tab. 8: IHC-Protokoll

Entparaffinieren	
Xylol	2x10 min
100 % Ethanol	kurz schwenken
100 % Ethanol	5 min
96 % Ethanol	kurz schwenken
96 % Ethanol	5 min
70 % Ethanol	kurz schwenken
70 % Ethanol	5 min
aq. dest.	zwischenlagern
Antigen Retrieval	
Retrieval Puffer	10 min (120 °C)
aq. dest.	schrittweise abkühlen
Peroxidase Block	
0,7 % H ₂ O ₂	15 min
aq. dest.	2 min
TBS	2 min
Blocking	
100 µl normal goat serum	20 min (RT)
	abklopfen
Primärantikörper	
100 µl Primärantikörper	24 h (4 °C)
TBS	spülen
TBS	2x5 min
Biotinylierter Sekundärantikörper	
100 µl MultiLink Sekundärantikörper	30 min (RT)
TBS	spülen
TBS	2x5 min

Tab. 8: Fortsetzung IHC-Protokoll

Streptavidin-Peroxidase-Konjugat	
100 µl Streptavidin-Peroxidase TBS TBS	30 min (RT) spülen 2x5 min
DAB Chromogen	
100 µl gepuffertes DAB aq. dest. aq. dest.	5 min (RT) spülen zwischenlagern
Hämalaun	
Hämalaun aq. dest. fließendes Leitungswasser aq. dest.	5 min kurz schwenken 10 min kurz schwenken
Entwässern	
70 % Ethanol 96 % Ethanol 100 % Ethanol Xylol	3 min 3 min 3 min 3 min
Eindeckeln	

Tab. 9: IHC Primärantikörper

Antikörper (Anti-)	Retrieval	Verdünnung
CD34	Citratpuffer	unverdünnt
GFAP	Citratpuffer	1:6000
S100	Citratpuffer	1:3000
VEGF	Citratpuffer	1:20

2.3.2.7. Statistik

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel und GraphPad PRISM.

2.4. Ergebnisse

IFN γ stimuliert in vitro die MHC Klasse I Expression auf transduzierten GL261-FLuc Zellen

Haupteffektoren der antitumoralen Immunabwehr sind zytotoxische T-Lymphozyten. Da ihre Funktion an eine suffiziente Antigenpräsentation durch MHC Klasse I Moleküle gekoppelt ist, entgehen viele Tumore, unter anderem auch Glioblastome, durch Herunterregulation ihrer MHC Klasse I Expression einer durch zytotoxische T-Lymphozyten vermittelten Zellyse [34]. IFN γ ist in der Lage, die MHC I Expression auf Glioblastomzellen zu stimulieren [35] und diesem „immune escape“-Mechanismus entgegenzuwirken. Um zu überprüfen, inwieweit transduzierte GL261-FLuc Zellen MHC Klasse I Moleküle exprimieren, wurden in vitro kultivierte GL261-FLuc Zellen vor und nach viertägiger Stimulation mit IFN γ untersucht. In der durchflusszytometrischen Analyse der Zellen zeigte sich eine klare MHC Klasse I Expression auf unstimulierten GL261-FLuc Zellen. Durch IFN γ ließ sich die MHC Klasse I Expression weiter erhöhen, so dass die Zellen nach Stimulation mit IFN γ eine stärkere MHC Klasse I Expression als B6 Splenozyten, die als Referenz mituntersucht wurden, zeigten (Abb. 2).

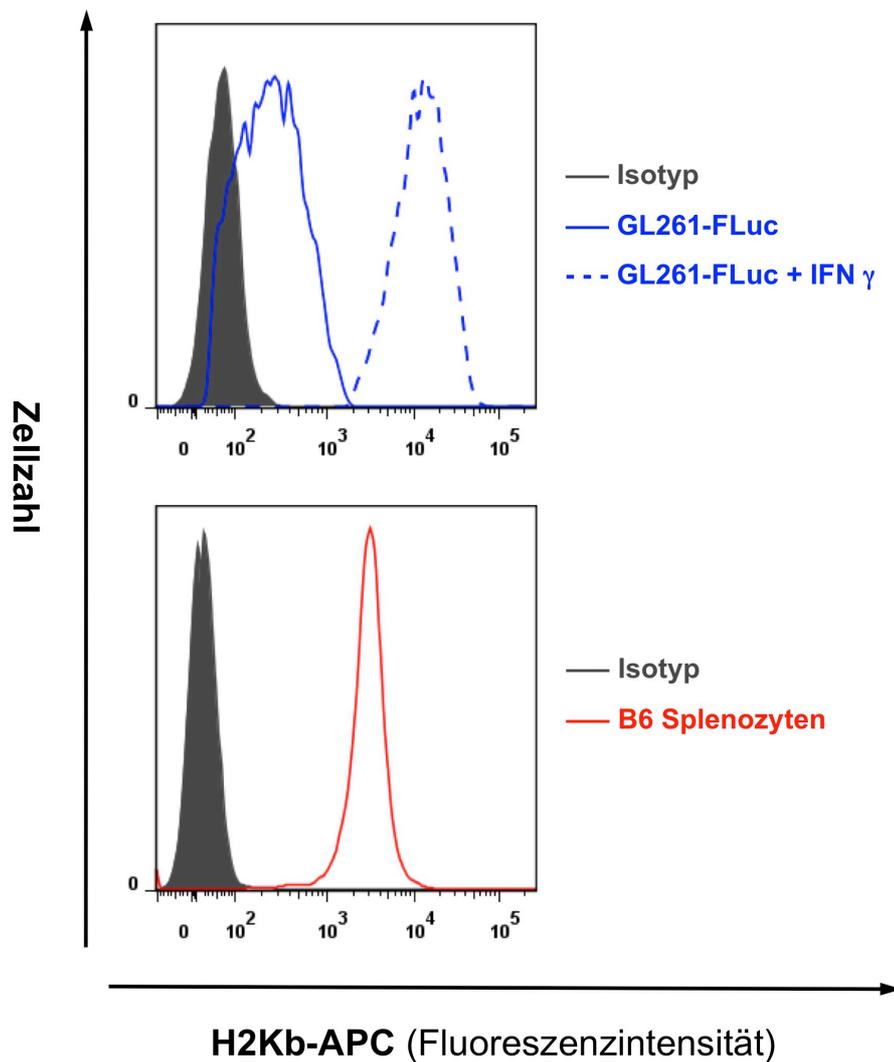


Abb. 2: IFN γ stimuliert in vitro die MHC Klasse I Expression auf GL261-FLuc Zellen.

GL261-FLuc Zellen wurden für 4 Tage mit und ohne Zusatz von IFN γ (1000 ng/ml) kultiviert. Anschließend wurde die Expression des murinen MHC Klasse I Moleküls H2Kb durchflusszytometrisch bestimmt (oberes Histogramm). Als Kontrolle dienten frisch isolierte B6 Splenozyten (unteres Histogramm). GL261-FLuc Zellen zeigten hierbei eine klare konstitutive MHC Klasse I Expression (durchgehend blauer Graph). Nach Stimulation durch IFN γ überstieg die MHC Klasse I Expression (gestrichelt blauer Graph) sogar das Expressionsniveau von B6 Splenozyten (durchgehend roter Graph).

Orthotop inokulierte GL261-FLuc Zellen zeigen in vivo ein aggressives glioblastomtypisches Tumorstadium

Humane Glioblastome sind vor allem durch ihr invasives und schnelles Wachstum gekennzeichnet. Aufgrund dieser aggressiven Biologie überleben nur 36 % der Glioblastom-Patienten das 1. Jahr nach Diagnosestellung [7]. Um zu evaluieren, ob GL261-FLuc Zellen das biologische Verhalten humaner Glioblastome in vivo rekapitulieren, wurden die Zellen syngen und orthotop in B6 und B6a Mäuse inokuliert. Nach supratentorieller Injektion (rechte Großhirnhemisphäre) von 5×10^5 GL261-FLuc Zellen zeigte sich klinisch ein rapides Tumorstadium. Die Versuchstiere entwickelten rasch Zeichen einer zunehmenden Tumorstadium, so dass dies durchschnittlich nach nur 32 (B6) bzw. 40 (B6a) Tagen zum Abbruch der Versuche führte. Am Versuchsende hatten 15/16 der B6 Tiere und 11/13 der B6a Mäuse Tumore entwickelt, so dass orthotop injizierte GL261-FLuc Zellen syngen eine hohe Tumorstadiumpenetranz (94 % in B6 und 85 % in B6a Tieren) zeigten (Abb. 3).

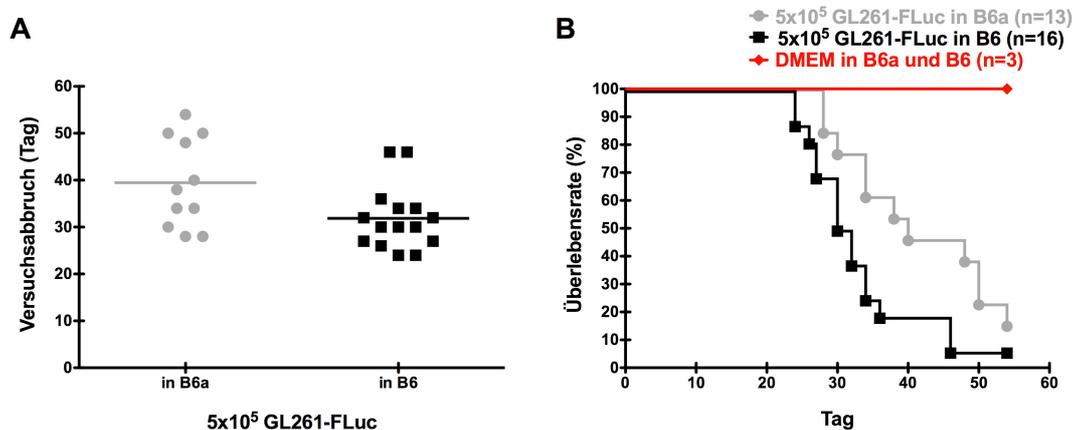


Abb. 3: Supratentoriell injizierte GL261-FLuc Zellen zeigen in vivo ein aggressives Wachstum.

In vitro kultivierte GL261-FLuc Zellen wurden syngen in die rechte Großhirnhemisphäre 9 Wochen alter B6 und B6a Mäuse injiziert (5×10^5 Zellen/Tier). Bei Anzeichen einer zunehmenden Tumorstadium wurden die Versuche abgebrochen (humane endpoint) und die Versuchstiere euthanasiert. **(A)** Durchschnittlich 32 (B6, schwarze Linie) bzw. 40 (B6a, graue Linie) Tage nach orthotoper Inokulation mussten die Versuche abgebrochen werden. **(B)** 94 % der B6 (schwarze Kurve) und 85 % der B6a (graue Kurve) Tiere entwickelten nach orthotoper Inokulation einen Tumor (Kaplan-Meier Kurven). Als Negativkontrollen wurden mit DMEM inokulierte Versuchstiere (rote Kurve) mitgeführt.

Parallel zur klinischen Überwachung wurde die FLuc Expression der inokulierten Zellen genutzt. Die Versuchstiere wurde alle 2 Tage mittels BLI evaluiert, um einen detaillierten Einblick in das in vivo Wachstumsverhalten von GL261-FLuc Zellen zu erhalten. In Übereinstimmung mit der rasch klinisch apparenten Größenzunahme der Tumore zeigte auch das BLI ein schnelles Tumorwachstum der Zellen, welches typischerweise einem triphasischen Verlauf folgte: Die ersten 6 Tage nach Inokulation zeigten die injizierten Zellen als Zeichen einer schnellen Zellproliferation eine starke und stete Zunahme ihrer Photonenemission. Nach dieser initial rapiden Proliferationsphase stagnierten oder fielen (teilweise sogar bis an die untere Nachweisgrenze) die BLI Signale beim Großteil der Versuchstiere wieder. Nach diesem „Adaptationsintervall“, das durchschnittlich vom 6. bis zum 14. Tag andauerte, schloss sich in der Regel wieder eine starke Proliferationstätigkeit (erkennbar an einem erneuten rapiden BLI-Signalanstieg) an, die bis zum Abbruch der Versuche andauerte. Die wenigen Tiere (3/29), bei denen sich letztendlich keine Tumore induzieren ließen, zeigten nach der „Adaptationsphase“ keinen Signalanstieg mehr. Ihre BLI-Signale fielen mit der Zeit unter die Nachweisbarkeitsgrenze (Abb. 4).

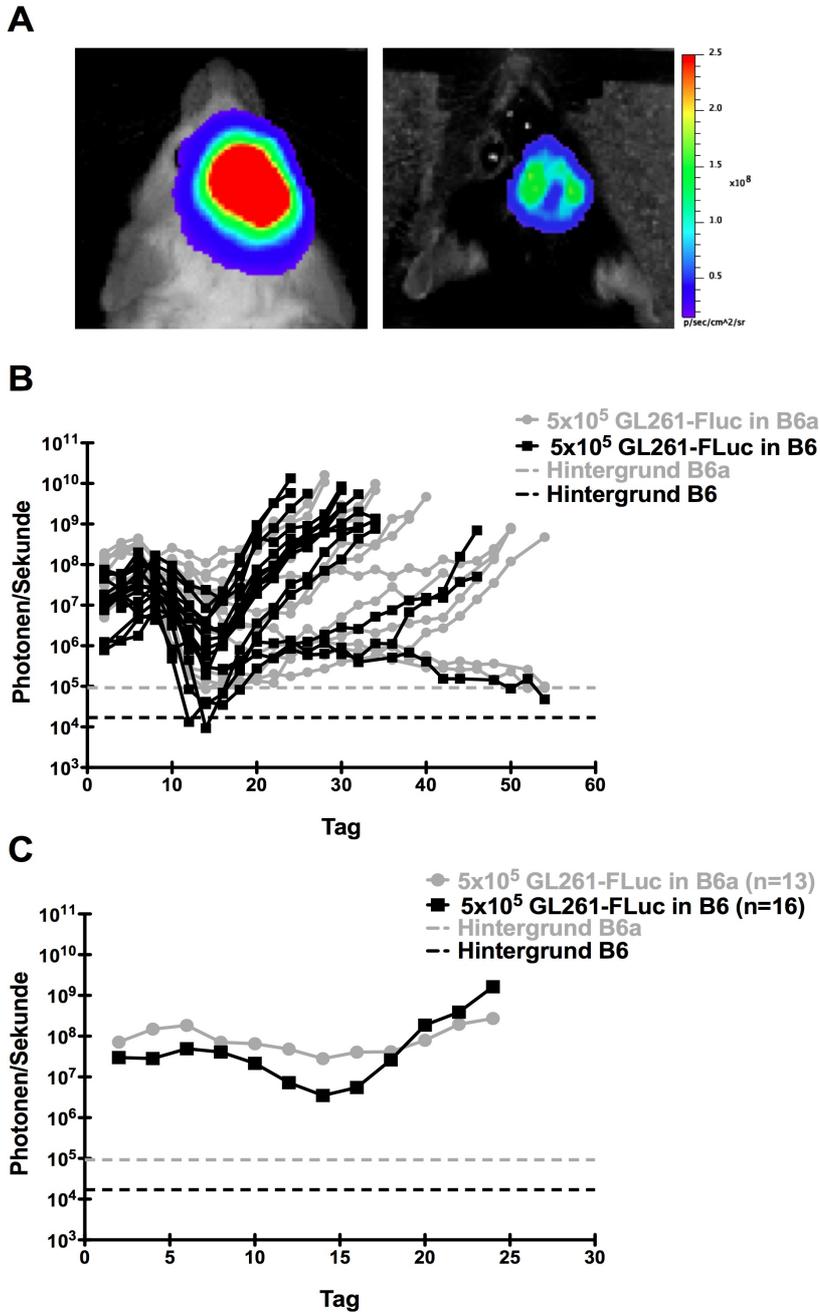


Abb. 4: Orthotop inokulierte GL261-Fluc Zellen zeigen eine triphasische Wachstumskinetik in vivo.

5×10^5 FLuc exprimierende GL261 Zellen wurden orthotop (rechte Hemisphäre) in B6 und B6a Mäuse injiziert. Bis zum Versuchsabbruch wurde die Photonemission der inokulierten Zellen alle 2 Tage mittels BLI gemessen. Hierfür wurden die Versuchstiere 10 min nach i.p. Injektion von Luciferin in Bauchlage in einem IVIS Spectrum evaluiert. **(A)** Repräsentative in vivo BLI Bilder einer mit GL261-FLuc Zellen inokulierten B6a Maus (linkes Bild) und einer B6 Maus (rechtes Bild). **(B)** In vivo BLI Daten der einzelnen Versuchstiere und **(C)** die Mittelwerte der einzelnen BLI Signale im Verlauf. Zur Festlegung der Signalhintergrundniveaus (gestrichelte Linien) wurden auch mit reinem DMEM inokulierte Tiere (zwei B6; drei B6a) evaluiert. Es zeigte sich bei den inokulierten Tieren typischerweise eine triphasische BLI Kinetik: initialer Signalanstieg bis Tag 6, Signalarückgang zwischen Tag 6 und 14, gefolgt von einem Signalwiederanstieg bis zum Versuchsabbruch. Bei 3 von insgesamt 29 inokulierten Tieren fielen die Signale auch über Tag 14 hinaus weiter ab (siehe Abb. 4 B). Bei diesen Tieren ließen sich durch Inokulation von GL261-FLuc Zellen letztendlich keine Tumore induzieren. Zu beachten ist die pigmentbedingt geringere Photonemission bei B6 Mäusen trotz Inokulation gleicher Zellzahlen (siehe Abb. 4 A u. C).

Neben dem raschen Wachstum zählt vor allem auch das ausgeprägte Invasionsverhalten humaner Glioblastome zu den biologischen Charakteristika dieser Tumore. Glioblastomzellen tendieren dazu, sich entlang kompakter Faserbahnen auszubreiten. Ein Überqueren des corpus callosum mit kontralateraler Ausbreitung zählt zu den typischen Erscheinungsbildern [5]. Um zu überprüfen, ob auch GL261-FLuc Zellen diese Eigenschaft besitzen, wurden bei Versuchsabbruch, wenn die Tumore zu einer maximal tolerablen Größe herangewachsen waren, die Gehirne von je 5 B6 und B6a Mäusen entnommen und ex vivo mittels BLI untersucht. Bei insgesamt 8/10 Tieren (3/5 B6a und 5/5 B6) ließen sich nicht nur in der rechten Hemisphäre (dem Ort der ursprünglichen Inokulation), sondern auch auf der kontralateralen Seite links BLI-Signale detektieren (Abb. 5). Bei einer in vitro berechneten durchschnittlichen Anzahl von 819 Photonen/Sekunde/Zelle (siehe Anhang Abb. 8 A) entsprach das ex vivo Signal der linken Hemisphäre durchschnittlich 535 (B6a) bzw. 1143 (B6) GL261-FLuc Zellen.

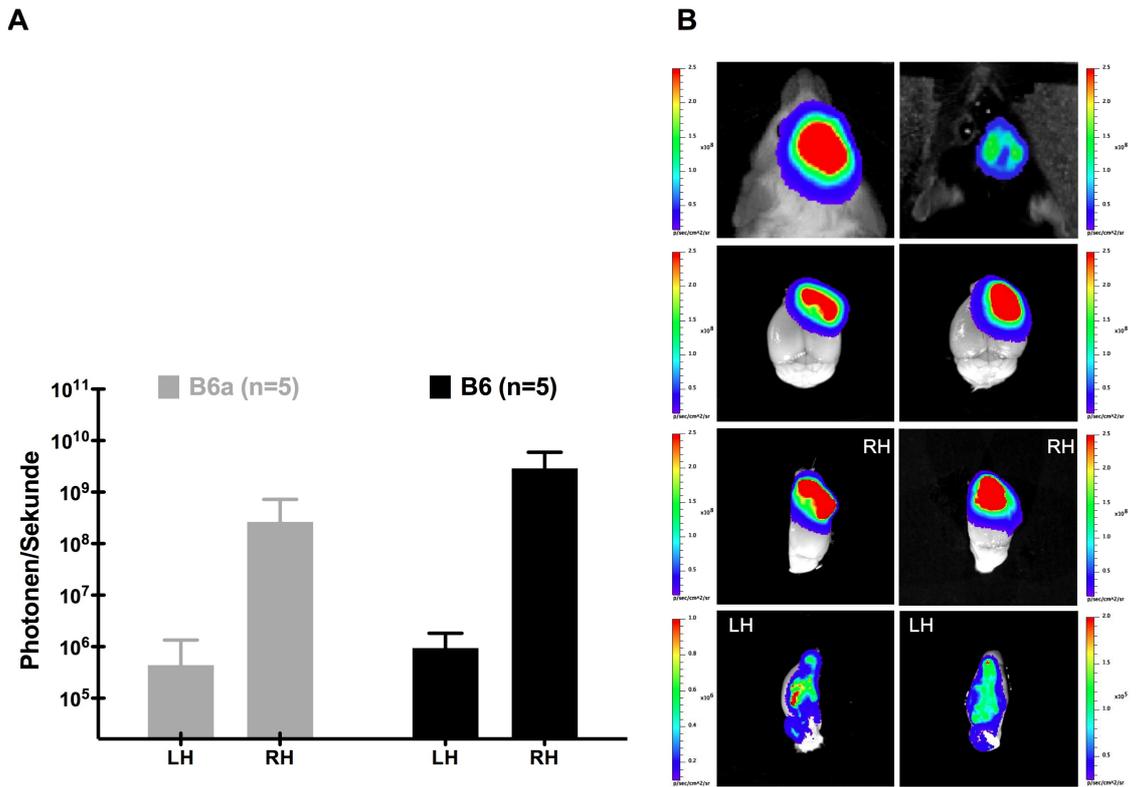


Abb. 5: Rechtshemisphäre inokulierte GL261-FLuc Zellen invadieren in die kontralaterale Hemisphäre.

5×10^5 GL261-FLuc Zellen wurden in die rechte Hemisphäre von B6a und B6 Mäusen inokuliert. Bei Versuchsabbruch, wenn die Tumore zu einer maximal tolerablen Größe herangewachsen waren, wurden die Versuchstiere 10 min nach i.p. Injektion von Luciferin lebend in einem IVIS Spectrum untersucht. Im Anschluss wurden die Tiere unverzüglich euthanasiert und die Gehirne von insgesamt 5 B6a und 5 B6 Tieren wurden ex vivo mittels BLI evaluiert. Da das starke Signal der rechtshemisphär gelegenen Haupttumormasse zu einer Überstrahlung der linken Hemisphäre führte, wurden die Gehirne (nach Untersuchung im Ganzen) in der Medianen sagittal durchtrennt und beide Hemisphären wurden einzeln evaluiert. **(A)** Durchschnittliches ex vivo Signal (abzüglich der Hintergrundbiolumineszenz) der linken (LH) und rechten Hemisphäre (RH) von je 5 B6 und B6a Tieren. **(B)** Repräsentative BLI Bilder einer mit GL261-FLuc Zellen inokulierten B6a (linke Spalte) und einer B6 Maus (rechte Spalte) jeweils am Versuchsende. 1. Reihe = in vivo BLI; 2. Reihe = ex vivo BLI des ganzen Gehirns; 3. Reihe = ex vivo BLI der rechten Hemisphäre (RH); 4. Reihe = ex vivo BLI der linken Hemisphäre (LH). Zu beachten ist die pigmentbedingte Abschwächung des in vivo BLI Signals bei B6 Mäusen (vgl. Reihe 1 u. 2).

GL261-FLuc Tumore erfüllen die histopathologischen Kriterien humaner Glioblastome

Glioblastome sind infiltrativ wachsende, mitotisch hochaktive Gehirntumore, die klassischerweise aus astrozytär differenzierten Tumorzellen aufgebaut sind. Mitunter können Glioblastome histopathologisch derart „multiform“ sein, dass die Diagnosestellung nicht nur auf der Identifikation bestimmter Zelltypen, sondern auch auf der Beurteilung von Gewebsmustern basiert. So ist das Vorliegen von Nekrosen und/oder vaskulären Proliferaten für die Diagnose „Glioblastom“ essentiell [5, 36]. Um zu beurteilen, ob GL261-FLuc Tumore die entscheidenden histopathologischen Merkmale humaner Glioblastome rekapitulieren, wurden die induzierten Tumore am Ende der Versuche mittels HE- und IHC-Färbungen histologisch aufgearbeitet. Es zeigten sich hier zeldichte inhomogene Tumore, die in Analogie zum Menschen aus polymorphen Tumorzellen mit zahlreichen Kernatypien aufgebaut waren (Abb. 6 A u. B). Die Expression von GFAP (Abb. 6 C) und S100 (Abb. 6 D) demonstrierte eine für Glioblastome typische [36] astrozytäre Differenzierung der Zellen. Zahlreiche Mitosen (Abb. 6 E) spiegelten die hohe Proliferationsrate der Tumore, die schon zuvor während des in vivo BLI-Monitorings zu erkennen war, wider. Auch wenn sich insgesamt ein eher kohäsives Tumorstadium, mit einer zumeist guten Abgrenzbarkeit zum Wirtsgewebe, bot, so zeigten die Tumore wie beim humanen Konterpart dennoch regelhaft ein invasives Wachstumsverhalten. GL261-FLuc Zellen drangen in zungenartigen Verbänden oder als diffus invadierende Einzelzellen in das umgebende Hirnparenchym vor (Abb. 6 E). Nekrosen, die nicht nur als ein zur Diagnosestellung nötiges Gewebemuster, sondern auch als Ausdruck einer aggressiven Tumorbilologie angesehen werden [5], ließen sich auch in den im Mausmodell erzeugten Tumoren erkennen. Sie konnten sich zu beachtlicher Größe ausdehnen und zogen sich zuweilen serpentinenartig durch die Tumore (Abb. 6 F).

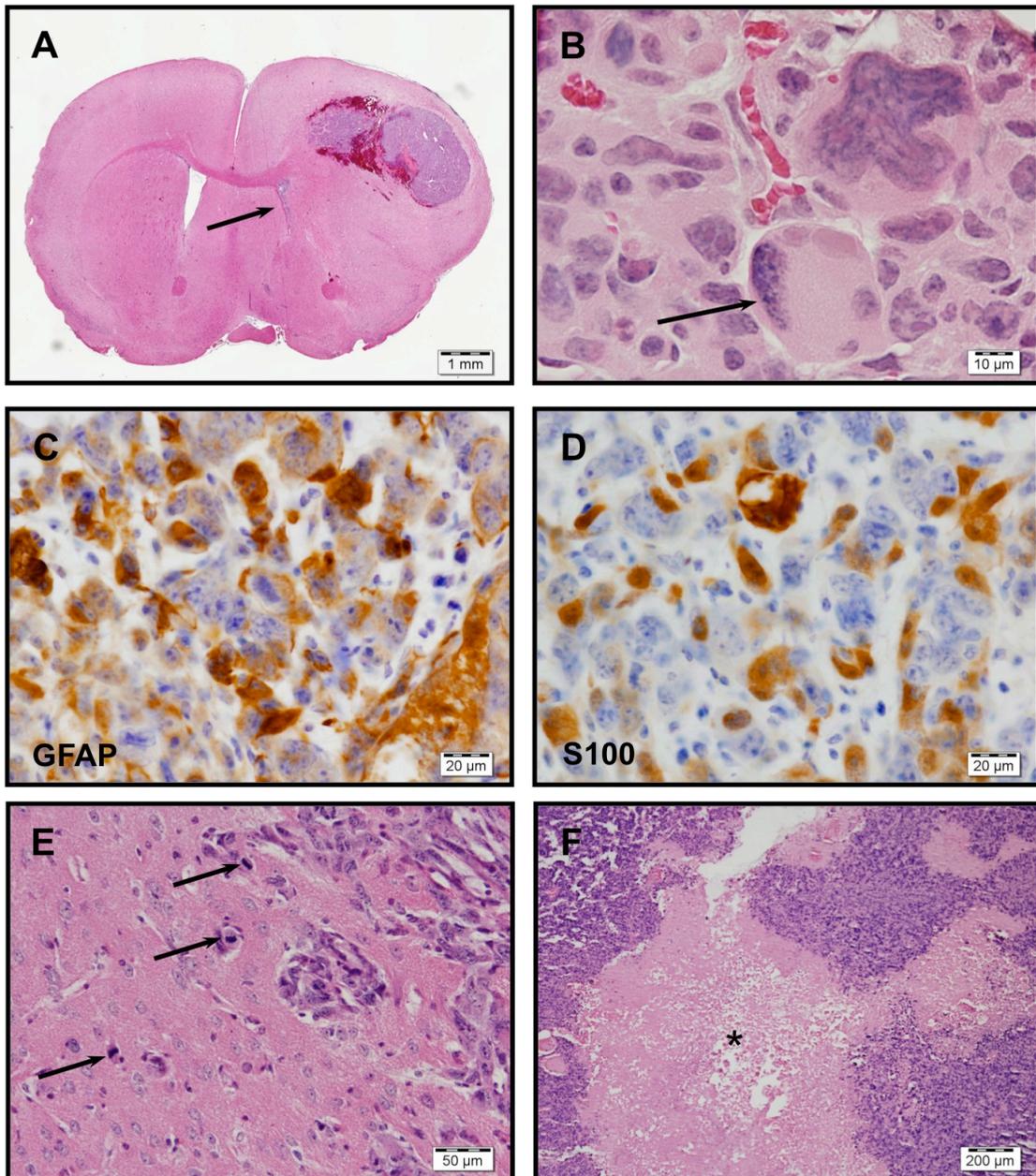


Abb. 6: GL261-FLuc Tumore erfüllen die histopathologischen Kriterien humaner Glioblastome.

Am Ende der Versuche wurden sämtliche Tumore histopathologisch mittels HE- und IHC-Färbungen aufgearbeitet. **(A)** Übersichtsaufnahme (HE gefärbter Coronarschnitt, Ansicht von caudal). Zu beachten sind die durch tumorale Massenverschiebungen bedingte Mittellinienverlagerung nach links und die Kompression des rechten Seitenventrikels (→). **(B)** Polymorphe GL261-FLuc Zellen inklusive glioblastomtypischer multinukleärer Riesenzelle (→) (HE). **(C)** GFAP und **(D)** S100 exprimierende GL261-FLuc Zellen (IHC). **(E)** Invadierende Tumorzellverbände und ins umliegende Hirnparenchym eingewanderte GL261-FLuc Einzelzellen während der Mitose (→) (HE). **(F)** Ausgeprägte intratumorale Nekrosen (*) (HE).

Als weiteren glioblastomtypischen Aspekt rekapitulierte das GL261-FLuc Modell auch das vaskuläre Bild humaner Glioblastome. Das Glioblastom zählt zu den gefäßreichsten Tumoren des Menschen. Im bunten Bild der Tumore finden sich neben Thrombosen und Hämorrhagien kennzeichnenderweise vaskuläre Proliferate, die als diagnosebeweisend gelten. Zentraler Mediator der Gefäßversorgung ist VEGF. Er scheint nicht nur eine induktive Wirkung auf die Tumorangio-genese zu besitzen, sondern auch maßgeblich an der für das Glioblastom typischen Gefäßdysfunktion (erkennbar an einer gestörten Bluthirnschranke) beteiligt zu sein [5]. In Analogie zum Menschen zeigten sich auch im Mausmodell die Tumore äußerst gefäßreich (Abb. 7 A). Neben zahlreichen Kapillaren fanden sich häufig auch stark ektatische Gefäße sowie Thrombosen und Hämorrhagien (Abb. 7 B u. C). Während typische vaskuläre Proliferate nicht detektiert werden konnten, zeigten die Tumorzellen jedoch eine Expression von VEGF (Abb. 7 D). Ebenso entsprachen die intratumoralen Gefäße nicht nur quantitativ dem humanen Gegenstück, sondern auch funktionell. Wie beim Menschen zeigte die kraniale Bildgebung mittels MRT ein Kontrastmittel-„enhancement“ durch das Tumorgewebe und damit die Störung der tumoralen Bluthirnschranke (Abb. 7 E u. F).

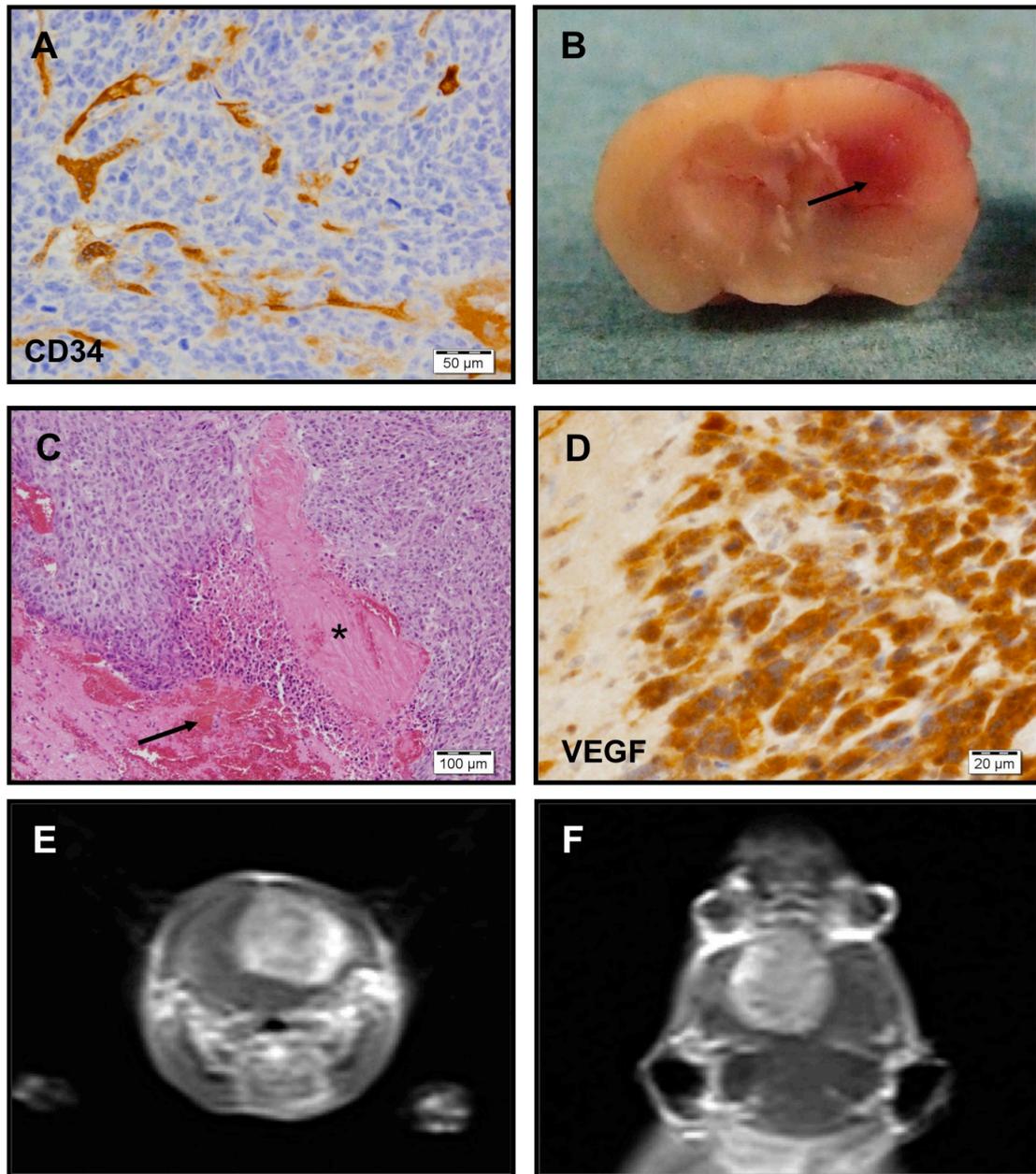


Abb. 7: GL261-FLuc Tumore rekapitulieren die vaskulären Eigenschaften humaner Glioblastome.

Die vaskulären Charakteristika des GL261-FLuc Glioblastom-Modells wurde nicht nur histologisch (HE- u. IHC-Färbungen), sondern am Versuchsende auch mittels MRT evaluiert. Um die Funktion der Bluthirnschranke beurteilen zu können, wurden nach i.p. Injektion des Kontrastmittels Gadolinium MRT Aufnahmen angefertigt. **(A)** CD34 positive intratumorale Gefäße (IHC). **(B)** Bereits makroskopisch erkennbare peritumorale Hämorrhagie (→) (Coronarschnitt, Ansicht von caudal). **(C)** GL261-FLuc Tumor mit peritumorale Hämorrhagie (→) und ektatischem thrombosiertem Gefäß (*) (HE). **(D)** VEGF exprimierende GL261-FLuc Zellen (IHC). **(E)** Coronares und **(F)** axiales MRT Bild (T1 gewichtete TSE Sequenzen) einer B6a Maus. Die Kontrastmittelaufnahme durch den GL261-FLuc Tumor verdeutlicht die Störung der intratumoralen Bluthirnschrankenfunktion in vivo.

2.5. Diskussion

Das Glioblastom des Kindes- und Jugendalters zählt zu den großen Herausforderungen der pädiatrischen Onkologie. Trotz zahlreicher medizinischer Fortschritte und multimodaler Therapieregime sind die Überlebensraten auch heute noch gering [37]. Die Überlebenden leiden häufig ein Leben lang unter zum Teil schweren neurocognitiven und -endokrinen Langzeitschäden aufgrund der intensiven Therapie [4]. Neue Behandlungsansätze werden dringend benötigt. Immuntherapien scheinen hier ein rationaler Ansatz zu sein [38]. Die präklinischen Daten, die mit Hilfe des GL261 Glioblastom-Modells durch die Arbeitsgruppen um Herrn Prof. Van Gool (Leuven) erhoben werden konnten [27-29], haben bereits zur klinischen Erprobung DC-vermittelter Tumorstimmulierung bei Glioblastompatienten geführt [30, 31]. Um auf diesen Ansätzen aufzubauen, wurde im Zuge dieser Arbeit das syngene GL261-FLuc Glioblastom-Modell etabliert und hinsichtlich seiner Eignung als immuntherapeutisches Modell untersucht. Als valides Modell, muss es die fundamentalen immunologischen und biomorphologischen Eigenschaften des humanen Vorbildes widerspiegeln können:

Das GL261-FLuc Glioblastom-Modell rekapituliert fundamentale immunologische Eigenschaften humaner Glioblastome

Im Gegensatz zu xenogenen Tumormodellen, bei denen Tumorzellen in immuninkompetente Versuchstiere injiziert werden, kann die Inokulation beim GL261-FLuc Modell syngene in B6 bzw. B6a Mäuse erfolgen. Da B6 Mäuse alle Zelltypen der angeborenen sowie adaptiven Immunabwehr besitzen [39], findet das Tumorstimmulierung in Analogie zum Menschen in einer prinzipiell immunkompetenten Umgebung statt. Dies ist eine fundamentale immunologische Gegebenheit, die sonst nur noch durch Tumormodelle, bei denen es zu einer „spontanen“ Tumorentstehung in genetisch manipulierten

Versuchstieren kommt, erfüllt wird [33]. Dass es im syngenen GL261-FLuc Modell zu einer tumorimmunologischen Auseinandersetzung der Wirtstiere mit den inokulierten GL261-FLuc Zellen kommt, lässt sich aufgrund des typischen BLI Musters und der Tatsache, dass sich bei manchen Versuchstieren (3/29) keine erfolgreiche Tumorinduktion erzielen ließ, vermuten: Nach orthotoper Inokulation in B6 oder B6a Mäuse zeigten die initial noch stark proliferierenden GL261-FLuc Zellen typischerweise zwischen dem 6. und 14. postoperativen Tag eine rückläufige Photonenemission. Bei 3 von insgesamt 29 Versuchstieren fielen die BLI Signale sogar bis unter die Nachweisgrenze ab, ohne im Verlauf wieder anzusteigen. Eine mögliche Erklärung wäre eine mit der starken Proliferation der Tumorzellen nicht schritthaltende Tumolvaskularisation und die konsekutive Entstehung von Nekrosen aufgrund einer Mangelversorgung. Die Ergebnisse von Zagzag et al. sprechen jedoch gegen eine nutritive Genese des Signalrückgangs. Zagzag et al. konnten zeigen, dass im gut vaskularisierten Organ Gehirn keine anfängliche avaskuläre Tumorstadiumsphase besteht. Bei orthotoper Injektion von 10^5 GL261 Zellen in B6 Mäuse war das native Gefäßsystem zu Beginn für eine suffiziente Versorgung der Tumore ausreichend. Tumornekrosen konnten erst nach 3 Wochen nachgewiesen werden [40]. Die histologische Aufarbeitung (HE Färbung) derjenigen B6 und B6a Tiere, bei denen sich durch Inokulation von GL261-FLuc Zellen kein erfolgreiches Tumorstadium induzieren ließ (3/29), zeigte am Versuchsende im Bereich des ehemaligen Stichkanals neben wenigen verbliebenen Tumorzellen reichlich Siderophagen. Nekrosen konnten nicht beobachtet werden (siehe Anhang Abb. 8 B). Um valide Aussagen über Ursache und Mechanismus dieser vermutlich immunologisch bedingten „Adaptations- bzw. Abstoßungsphänomene“ im syngenen GL261-FLuc Modell machen zu können, sind weitere detailliertere Untersuchungen in einer Folgearbeit geplant. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten weisen jedoch auf einen immunologischen Zusammenhang hin. So zeigen GL261-FLuc Zellen das festgestellte typische BLI Muster unabhängig von der inokulierten Zellzahl und nur in B6 bzw. B6a Mäusen: Auch aus der Inokulation von 10^3 , 10^4 , 10^5 und 10^6 GL261-FLuc Zellen in B6a Tiere resultierte nach initialer Proliferation ein

typischer Signalrückgang zwischen Tag 6 und 14, unabhängig von der injizierten Zellzahl (Daten nicht gezeigt). Bei einem Einfluss der Gefäßversorgung auf den Signalrückgang in dieser Phase, hätten sich unter der Annahme, dass die inokulierte Zellzahl und die benötigte Gefäßversorgung miteinander korrelieren, bei Injektion verschiedener Zellzahlen auch unterschiedliche BLI Kinetiken ergeben müssen. Dies war jedoch in den durchgeführten Versuchen nicht der Fall. Bei xenogener Injektion von GL261-FLuc Zellen in immuninkompetente NOD/SCID Mäuse hingegen konnte eine völlig andere BLI Kinetik beobachtet werden. Hier zeigte sich von Beginn an ein kontinuierlicher Anstieg des BLI Signals ohne einen Signalrückgang im Verlauf (Daten nicht gezeigt). Da NOD/SCID Mäuse keine suffiziente adaptive Immunabwehr besitzen, ist eine immunologisch spezifische Tumorabwehr nicht möglich [41], so dass es bei Inokulation von GL261-FLuc Zellen in NOD/SCID Mäuse vermutlich zu einem immunologisch weitgehend ungehinderten Tumorwachstum kommt. Eine valide Erklärung dieses Sachverhalts ist jedoch ohne weitere Zusatzuntersuchungen noch nicht möglich. Die Tatsache, dass GL261-FLuc Zellen eine konstitutive und durch IFN γ noch weiter stimulierbare MHC Klasse I Expression zeigten, ist für das Modell immuntherapeutisch bedeutsam: Die DC-basierte „Tumorzellvaksinierung“ scheint bei Glioblastompatienten ein rationaler Ansatz zu sein, der sich bereits in der klinischen Erprobung befindet [28-31]. Endstrecke der dendritischen Zelltherapie ist die Tumorzelllyse durch zytotoxische T-Lymphozyten [42]. Da ihre Funktion an die Antigenpräsentation durch MHC Klasse I Moleküle gekoppelt ist, stellt die MHC Klasse I Expression auf GL261-FLuc Zellen eine zentrale Voraussetzung für das Gelingen immunbasierter Strategien, die in einer durch zytotoxische T-Lymphozyten vermittelten Zelllyse enden, dar. Präklinisch ist bereits die Heilung etablierter GL261 Tumore durch eine kombinierte Immuntherapie mit GM-CSF und IFN γ beschrieben [43]. So scheint die MHC Klasse I Expression auf GL261-FLuc Zellen sowie deren Stimulierbarkeit durch IFN γ für zukünftige Immuntherapien eine wichtige Feststellung zu sein.

GL261-FLuc Tumore erfüllen die biomorphologischen Diagnosekriterien humaner Glioblastome

Neben der Rekapitulation immunologischer Eigenschaften muss ein geeignetes Tumormodell auch die fundamentalen biologischen und morphologischen Kennzeichen des humanen Vorbildes widerspiegeln. Biologisches Kennzeichen humaner Glioblastome ist ihr aggressives Wachstumsverhalten. Glioblastomzellen besitzen eine ausgeprägte Neigung, in ihre Umgebung zu invadieren, so dass eine Resektion in sano oftmals nicht durchgeführt werden kann. Die dann verbliebenen zumeist radio- und chemoresistenten Zellen zeigen eine solche rasche Proliferation, dass die betroffenen Patienten innerhalb kurzer Zeit versterben [5]. Das syngene GL261-FLuc Glioblastom-Modell rekapituliert nicht nur das schnelle Wachstum humaner Glioblastome, sondern auch deren Invasionsneigung. Das schnelle Wachstum der orthotop inokulierten GL261-FLuc Zellen zeigte sich nicht nur in der kurzen Latenzzeit klinischer Symptome, sondern auch im insgesamt schnellen Anstieg des BLI Signals. In der histologischen Aufarbeitung spiegelte sich die ausgeprägte Proliferation in einer hohen Mitoserate wider. Auch die für Glioblastome typische Invasionsneigung fand sich im Mausmodell. In der histologischen Aufarbeitung der Tumore konnten sowohl in die Umgebung invadierende Tumorverbände als auch einzelne Tumorzellen im peritumoralen Hirnparenchym beobachtet werden. Die am Ende der in vivo Versuche durchgeführten ex vivo BLI Untersuchungen zeigten deutliche BLI Signale der linken Hemisphäre, obwohl die Tumorzellen ursprünglich rechtshemisphär inokuliert worden waren. Histologisch ließ sich eine Invasion in die Gegenseite durch GL261-FLuc Zellen nicht sichern, was wahrscheinlich auf die geringen Zellzahlen zurückzuführen ist. Das ex vivo Signal der linken Hemisphäre entsprach durchschnittlich nur 535 (B6a) und 1143 (B6) GL261-FLuc Zellen. Ein Überqueren der Zellen in die kontralaterale Hemisphäre ist im GL261 Modell auch von anderen Autoren beschrieben [27]. Über die biologischen Eigenschaften humaner Glioblastome hinaus erfüllt das GL261-FLuc Modell auch die histopathologischen Diagnosekriterien des Glioblastoms. Sowohl die geforderte astrozytäre

Differenzierung als auch das Vorliegen eines glioblastomtypischen Gewebsmusters (i.e. Nekrosen) waren im Mausmodell nachweisbar. Obgleich Glioblastome in ihrer Morphologie „multiform“ sein können und auch epitheliale Wachstumsformen beschrieben sind [5, 36], so muss dennoch erwähnt werden, dass das überwiegend kohärente Wachstumsmuster von GL261-FLuc Zellen im murinen Modell nicht dem prototypisch diffusen Wachstum des humanen Konterparts entspricht. Dies stellt möglicherweise eine Limitation des Modells dar.

GL261-FLuc Tumore zeigen eine glioblastomtypische Vaskularisation

Glioblastome zählen zu den gefäßreichsten Tumoren des Menschen. Das ausgeprägte intratumorale Gefäßnetz beinhaltet in der Regel eine Vielzahl morphologisch und funktionell aberranter Gefäße. Treibende Kraft dieser pathologischen Gefäßneubildung scheint VEGF zu sein [5]. Auch die induzierten Tumore im Mausmodell zeigten eine äußerst starke Vaskularisation. Häufig fanden sich stark ektatische oder thrombosierte Gefäße und auch Hämorrhagien waren keine Seltenheit. Die für Glioblastome typische intratumorale Kontrastmittelanreicherung [36] konnte mittels MRT auch bei GL261-FLuc Zellen nachgewiesen werden. Sie ist Ausdruck einer gestörten Bluthirnschrankenbarriere und als Indiz einer funktionell aberranten Vaskularisation in GL261-FLuc Tumoren zu werten [5]. Der immun-histochemische Nachweis von VEGF in GL261-FLuc Zellen lässt eine Rolle dieses Angiogenesefaktors vermuten. Weitere funktionelle Untersuchungen etwa zur Rolle von VEGF oder der Eignung des Modells zur Evaluation antiangiogener Therapiestrategien wären hier nötig.

Conclusio

Das im Zuge dieser Arbeit etablierte und evaluierte syngene GL261-FLuc Glioblastom-Modell rekapituliert sowohl zentrale immunologische als auch biomorphologische Kerneigenschaften des humanen Vorbildes. Als Transplantationsmodell zeichnet es sich durch eine gute Reproduzierbarkeit aus. Der Umstand, dass GL261-FLuc Zellen mittels BLI einfach und nichtinvasiv visualisiert werden können, gewährt nicht nur wichtige tumorbiologische Einblicke, sondern trägt auch zur hohen Voraussagbarkeit des Modells bei, da sich der Erfolg der Tumorinduktion von Beginn an per Bildgebung verfolgen lässt und nicht erst durch das Auftreten klinischer Symptome gegen Versuchsende ersichtlich wird. Besondere Berücksichtigung muss die festgestellte „Adaptationsphase“ bis Tag 14 finden. Erst nach diesem Zeitpunkt lässt sich eine sichere Tumorinduktion voraussagen. In Zusammenschau der Ergebnisse handelt es sich um ein valides tumorimmunologisches Glioblastom-Modell. Die Frage, inwieweit sich das GL261-FLuc Modell auch als pädiatrisches Glioblastom-Modell eignet, bleibt an dieser Stelle noch offen. Denn trotz gleicher Morphologie unterscheiden sich Glioblastome des Kindes- und Jugendalters biologisch und genetisch von ihrem adulten Konterpart [8]. Auch wenn bereits genetische Alterationen in GL261 Zellen beschrieben sind, wie etwa ein mutiertes Trp53 Gen [44] oder ein aktivierter AKT Signalweg [33], die sich typischerweise beim pädiatrischen Glioblastom finden [11, 12], so bedarf die Antwort derzeit noch weiterer Untersuchungen. Die Tatsache, dass beispielsweise TRP 2, ein zur Immuntherapie pädiatrischer Glioblastome geeignetes Antigen [45], von GL261 Zellen exprimiert wird und erfolgreich als Antigen zur DC-Vakzinierung im GL261-Modell genutzt wird [46, 47], zeigt jedoch, dass das Modell auch für das pädiatrische Glioblastom bereits wichtige präklinische Informationen liefern kann.

2.6. Anhang

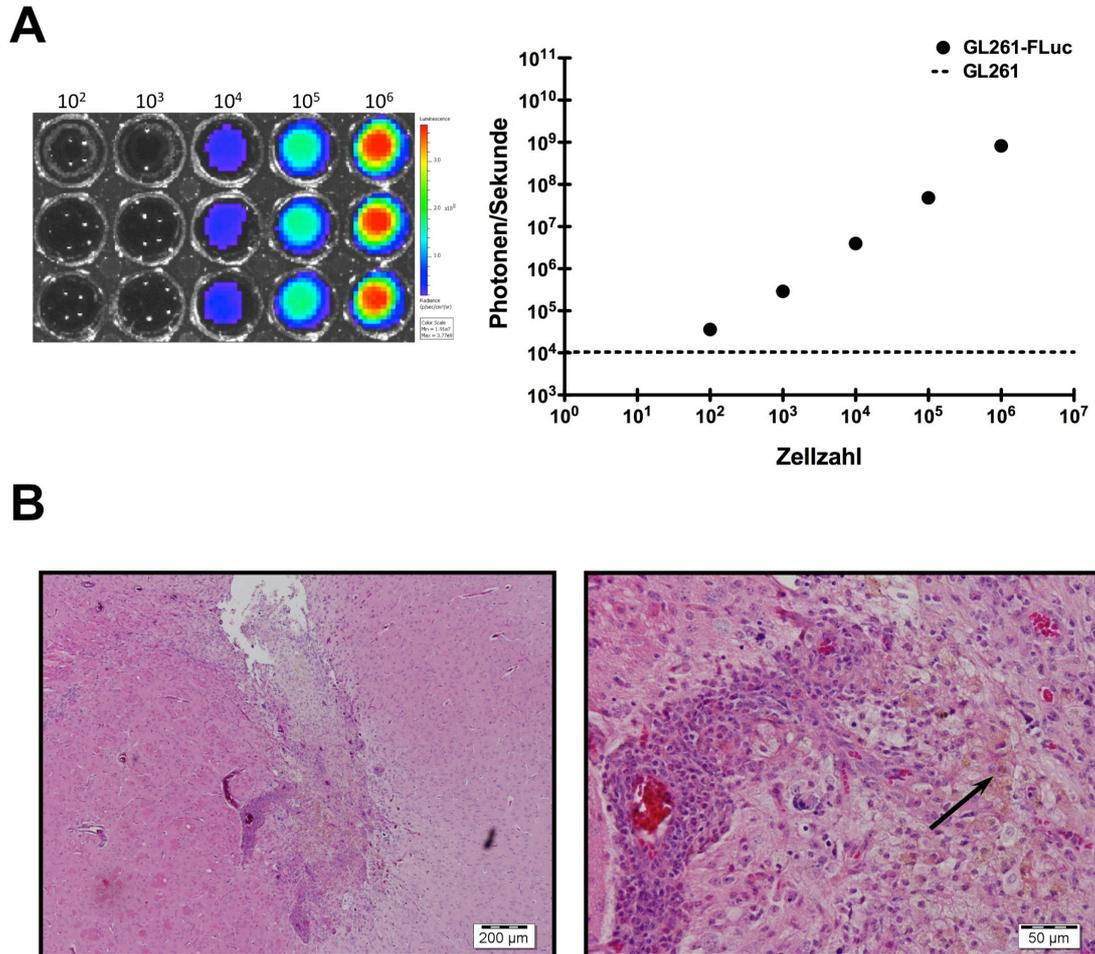


Abb. 8: FLuc Expression und regressive GL261-FLuc Tumore.

(A) FLuc Expression: Verschiedene Konzentrationsstufen in vitro kultivierter GL261-FLuc Zellen wurden mittels Verdünnungsreihe (10^6 - 10^2 Zellen) hergestellt. 2 min nach Hinzugabe von D-Luciferin wurden die einzelnen Konzentrationsstufen triplikatweise mittels BLI vermessen. Zur Festlegung des Hintergrundsignals wurden untransduzierte GL261 Zellen mitgeführt. Repräsentative in vitro BLI Aufnahme (linkes Bild). Mittels Regressionsanalyse ($R^2=0,99$; $n=15$) wurde die durchschnittliche Photonenemission einer einzelnen Zelle (durchschnittlich 819 Photonen/Sekunde) interpoliert (rechtes Bild). **(B)** Regressive GL261-FLuc Tumore: Auch die Gehirne derjenigen Versuchstiere, bei denen sich kein Tumor induzieren ließ (3/29), wurden am Ende histologisch aufgearbeitet. Die HE gefärbten Präparate zeigen regressives Tumorgewebe im Bereich des ehemaligen Stichkanals und reichlich Siderophagen (\rightarrow).

3. MB3W1 Medulloblastom-Modell

3.1. Einleitung

Das Medulloblastom ist der häufigste maligne Gehirntumor im Kindesalter [1]. Es handelt sich um einen invasiven embryonalen Tumor, der im Bereich der fossa posterior entsteht und eine ausgeprägte Neigung besitzt, zentral über die Liquorwege zu metastasieren. Gemäß WHO werden derzeit 5 histomorphologische Varianten des Medulloblastoms unterschieden: klassisch, nodulär/desmoplastisch, extensiv nodulär, anaplastisch und großzellig. Die Inzidenz des Medulloblastoms beträgt im Kindesalter ca. 0,5 pro 100.000 Personenjahre [5], mit einem bevorzugten Auftreten beim männlichen Geschlecht (Knaben/Mädchen = 1,9) [48]. Die Therapie des Medulloblastoms erfolgt risikoadaptiert und multimodal in Therapieoptimierungsstudien. Sie beinhaltet chirurgische Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie [49]. Für bestimmte Hochrisikogruppen stellt auch die Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation eine Option dar. Durch diese Behandlungsansätze konnten die Überlebensraten innerhalb der letzten Jahrzehnte signifikant verbessert werden (5-Jahresüberleben von 30 % auf 70-80 %) [1, 5, 48, 49]. Trotz aller Fortschritte gibt es auch heute noch eine Untergruppe von Medulloblastomen, die eine extrem schlechte Prognose aufweist. Diese aggressiven Tumore zeigen nicht einmal auf intensiviertere Therapieregime ein ausreichendes Ansprechen und können derzeit nicht geheilt werden [50]. Als Indikatoren einer schlechten Prognose gelten: großzellig/anaplastische Histologie [51-54], Metastasierung [55, 56], Amplifikationen des *MYC* Onkogens [51-53, 56-58], *TP53* Alterationen [59, 60], *erbB-2* Expression [61] und Chromosom 17q Zugewinne [57]. Neue Genexpressionsstudien zeigen nun, dass das Medulloblastom nicht als eine einzelne Erkrankung angesehen werden kann, sondern vielmehr aus

verschiedenen Tumorsubtypen besteht, die sich in ihrem Ursprung, ihren Signalwegaktivierungen und in ihren klinisch-histopathologischen Eigenschaften unterscheiden [62-65]. Gemäß einer Konsensusentscheidung werden die verschiedenen Subtypen seit 2012 in vier molekulare Hauptgruppen unterteilt: WNT Gruppe, SHH Gruppe, Gruppe 3 und Gruppe 4 [66]. Während die Ursprungszellen und die verantwortlichen Signalwege der WNT und SHH Gruppen bekannt sind und gut validierte Mausmodelle bestehen [67-70], gibt es nur limitierte Daten über Gruppe 3 und 4 Tumore, unter anderem auch deshalb, weil kaum geeignete Mausmodelle existieren. Da Gruppe 3 Medulloblastome mit Abstand die schlechteste Prognose unter allen identifizierten Subtypen besitzen, werden gerade für diese Tumore geeignete Tumormodelle benötigt. Beim Menschen treten Gruppe 3 Medulloblastome fast ausschließlich bei Kindern auf, vor allem im Säuglings- und Kleinkindalter und bevorzugt beim männlichen Geschlecht. Obwohl die meisten Gruppe 3 Tumore eine „klassische“ Morphologie besitzen, weist diese Subgruppe die höchste Inzidenz großzellig/anaplastischer Histologien auf. Klinisch sind Gruppe 3 Medulloblastome vor allem durch ihre extrem hohe Metastasierungstendenz und ihre schlechte Prognose gekennzeichnet (5-Jahresüberleben: 45 % bei unter Vierjährigen). Gruppe 3 Medulloblastome metastasieren in einem derart hohen Prozentsatz, dass ein hoher Metastasierungsstatus als Surrogatmarker für eine Gruppe 3 Zugehörigkeit diskutiert wird. Derzeit sind weder die Ursprungszelle noch der verantwortliche Signalweg, der zur dieser Untergruppe führt, bekannt. Da Gruppe 3 Medulloblastome jedoch im Erwachsenenalter praktisch fast nicht mehr vorkommen, wird eine Ursprungszelle vermutet, die nur im Kindesalter existiert. Die Überexpression von Genen, die in die retinale Entwicklung involviert sind, scheint Gruppe 3 Tumore zu charakterisieren. Genetische Alterationen, die darüber hinaus häufig in dieser Subgruppe gefunden werden, sind Chromosom 17q Zugewinne und eine Amplifikation des *MYC* Onkogens. Letzteres scheint sogar fast auf Gruppe 3 Medulloblastome beschränkt zu sein [63, 66, 71]. Auch die einzigen zwei derzeit publizierten Gruppe 3 Modelle fokussieren und bekräftigen die Rolle des *MYC* Signalwegs. In beiden Modellen führte eine genetisch manipulierte *MYC* Überexpression

zusammen mit einer TP53 Blockade zur Formation hoch aggressiver Gruppe 3 Medulloblastome [72, 73]. Die Tatsache, dass sowohl die verwendeten Ursprungszellen (CD133⁺ Zellen der weißen Substanz des Kleinhirns und granule neuron precursors) als auch die entstehenden Tumorzellen viele stammzelltypische Aspekte zeigen, spricht dafür, dass die Tumorstammzellhypothese auch für Gruppe 3 Medulloblastome zutreffen könnte [74, 75]. Die Tumorstammzellhypothese postuliert einen hierarchischen Aufbau innerhalb eines Tumors. Stamm- oder Progenitorzellen sind die Ursprungszellen eines entstehenden Tumors. Diese undifferenzierten, sich selbsterneuernden Zellen sind der proliferierende Pool, der für das Tumorstammzellwachstum verantwortlich ist. Nur die wenigen Tumorstamm- oder Progenitorzellen eines Tumors sind in der Lage, neue Tumore/Metastasen zu generieren, während der Großteil der entstehenden, stärker differenzierten, Tumorzellen diese Fähigkeit nicht besitzt [76]. Tumorstammzellen scheinen darüber hinaus aufgrund ihrer hohen Radio- und Chemoresistenz der Hauptgrund für die Aggressivität und Rezidivneigung maligner Tumore zu sein [77]. Die Erforschung von Tumorstammzellen scheint ein rationaler und vielversprechender Ansatz zu sein, nicht nur um die Tumorphathogenese besser verstehen, sondern auch um neue Therapiestrategien entwickeln zu können [78].

3.2. Zielsetzung

Der Fall eines zweijährigen Jungen, der sich an der Universitätskinderklinik in Behandlung befand, war Hintergrund für die Etablierung eines Medulloblastom-Modells. Der Knabe war an einem äußerst aggressiven Medulloblastom erkrankt, das nicht nur viele Kennzeichen eines Gruppe 3 Medulloblastoms, sondern auch Tumorstammzellcharakteristika zeigte. Da bis dato kein genetisch unmanipuliertes Gruppe 3 Modell beschrieben war und auch die Tumorstammzellhypothese ein vielversprechender Ansatz zu sein scheint, wurde weltweit erstmalig mit den Zellen dieses Tumors (**MB3W1** Zellen) ein orthotopes **xenogenes Medulloblastom-Modell** etabliert.

3.3. Material und Methoden

3.3.1. Material

Tab. 10: Material

Material	Hersteller	Bestellnr.
Accutase	PAA (Cölbe)	L11-007
Aceton	VWR International (Darmstadt)	20066.467
Agarose	AppliChem (Darmstadt)	A1091
ALDEFLUOR Kit	STEMCELL Technologies (Köln)	01700
Antikörperverdünnungspuffer	DCS (Hamburg)	AL120R100
Anti-β-Catenin	BD Biosciences (Heidelberg)	610153
Anti-βIII-Tubulin	Abcam (Cambridge)	ab18207
Anti-CD99	DAKO (Hamburg)	M3601
Anti-CD133/1 (AC133)	Miltenyi (Bergisch Gladbach)	130-090-422
Anti-CD133/1 (AC133)-PE	Miltenyi (Bergisch Gladbach)	130-080-801
Anti-CD133/2 (293C3)-PE	Miltenyi (Bergisch Gladbach)	130-090-853
Anti-GFAP	Millipore (Darmstadt)	AB5804
Anti-Her2/neu	DAKO (Hamburg)	A0485
Anti-INI-1	BD Biosciences (Heidelberg)	612110
Anti-Ki-67	dianova (Hamburg)	M501
Anti-Nestin	Millipore (Darmstadt)	MAB5326
Anti-Olig2	LINARIS (Dossenheim)	BHU0409
Anti-p53	DAKO (Hamburg)	M7001
Anti-Synaptophysin	DAKO (Hamburg)	M0776
Anti-Vimentin	DAKO (Hamburg)	M0725
aq. dest. (steril)	PAA (Cölbe)	S15-012
B-27 Supplement 50x	GIBCO (Carlsbad)	17504-044
Bepanthen Augen- u. Nasensalbe	Bayer (Leverkusen)	
bFGF	PEPROTECH (Hamburg)	100-18B
Black Isoplate-96	PerkinElmer (Waltham)	6005020
Braunol	B. Braun (Melsungen)	
BX51	Olympus (Hamburg)	
CD133 MicroBead Kit	Miltenyi (Bergisch Gladbach)	130-050-801

Material und Methoden

cellSens 1.6	Olympus (Hamburg)	
Citronensäure	AppliChem (Darmstadt)	A1350
Chloralhydrat	Merck (Darmstadt)	102425
Chloroform	SIGMA-ALDRICH (Steinheim)	32211
CliniMACS PBS/EDTA Puffer	Miltenyi (Bergisch Gladbach)	700-25
Colcemid	GIBCO (Carlsbad)	15210-040
DAB	DAKO (Hamburg)	K3467
DPBS	PAA (Cölbe)	H15-002
DMEM	GIBCO (Carlsbad)	41965-039
DMEM/F12	GIBCO (Carlsbad)	31331-028
DMSO	SIGMA-ALDRICH (Steinheim)	D2650
dNTPs (EWS/FLI1 PCR)	Fermentas (Waltham)	R0182
dNTPs (Reverse Transkription)	Genaxxon (Ulm)	M3016
DTT	Invitrogen (Darmstadt)	18080-093
EDTA	AppliChem (Darmstadt)	A3553
EGF	PEPROTECH (Hamburg)	AF-100-15
Eisessig	SIGMA-ALDRICH (Steinheim)	695092
Eosin	Merck (Darmstadt)	115935
Esketamin	Pfizer (Berlin)	
Ethanol	Universitätsapotheke	
Eukitt	O.Kindler (Freiburg)	
FACS Aria	BD Biosciences (Heidelberg)	
FACS Canto II	BD Biosciences (Heidelberg)	
FcR Blocking Reagent	Miltenyi (Bergisch Gladbach)	130-059-901
Firefly D-Luciferin	Biosynth (Staad)	L-8220
Fixogum	Marabu (Tamm)	2901 17 000
FKS	PAA (Cölbe)	A15-105
Fucidin Salbe (2 %)	LEO Pharma (Neu-Isenburg)	
FUGLW Vector	Stanford University (Stanford)	
GenElute Mammalian Total RNA Kit	SIGMA-ALDRICH (Steinheim)	RTN70
Giemsa	AppliChem (Darmstadt)	A0885
GraphPad PRISM (5.0c)	GraphPad Software (La Jolla)	
Hämatoxylin	Carl Roth (Karlsruhe)	3816.2
Hamilton Needle (custom made)	Hamilton Company (Bonaduz)	7804-03
Hamilton Syringe (25 µl)	Hamilton Company (Bonaduz)	7636-01
HCl	AppliChem (Darmstadt)	A1434
H ₂ O ₂	Merck (Darmstadt)	107209
Human Serum	PAA (Cölbe)	C15-021

Material und Methoden

Ikaros	MetaSystems (Altlussheim)	
Isis	MetaSystems (Altlussheim)	
IVC Anlage	Tecniplast (Hohenpeißenberg)	
IVIS Spectrum	Caliper Life Sciences (Waltham)	
Kalialaun	Merck (Darmstadt)	101042
KCl Lösung (0,075 M)	SIGMA-ALDRICH (Steinheim)	P9327
KH ₂ PO ₄	AppliChem (Darmstadt)	A3620
Knochenwachs W30 E	Ethicon (Norderstedt)	
Kryoröhrchen	Nunc (Waltham)	368632
Living Image 4.0	Caliper Life Sciences (Waltham)	
LS Säulen	Miltenyi (Bergisch Gladbach)	130-042-401
MB3W1 Zellen	UKW (Würzburg)	
MEM Vitamins 100x	GIBCO (Carlsbad)	11120-037
Methanol	AppliChem (Darmstadt)	A0688
MgCl ₂ (PCR)	Invitrogen (Darmstadt)	10342
MgCl ₂ (PFA-Lösung)	AppliChem (Darmstadt)	A3818
Microsoft Excel (12.1.0)	Microsoft (Redmond)	
MultiLink Sekundärantikörper	BioGenex (Fremont)	LP000-UL
NaCl	AppliChem (Darmstadt)	A3597
NaCl (0,9 %)	B. Braun (Melsungen)	
NaH ₂ PO ₄	AppliChem (Darmstadt)	A1938
Na ₂ HPO ₄	AppliChem (Darmstadt)	A3599
NaOH	AppliChem (Darmstadt)	A1432
Natriumjodat	Merck (Darmstadt)	106525
Neubauer Zählkammer	A.Hartenstein (Würzburg)	ZK13
NOD.CB17- <i>Prkdc</i> ^{scid} /J Mäuse	Jackson Laboratory (Bar Harbor)	
Objektträger (SuperFrost Plus)	Menzel (Braunschweig)	J1800AMNZ
Paraffin	Leica Biosystems (Nussloch)	39601006
PathVysion HER-2 DNA Probe Kit II	Abbott (Wiesbaden)	06N46-036
PE Mouse IgG1, κ Isotype Control	BD Biosciences (Heidelberg)	555749
Penicillin/Streptomycin	PAA (Cölbe)	P11-010
Pepsin	SIGMA-ALDRICH (Steinheim)	P6887
Pertex	MEDITE (Burgdorf)	41-4011-00
PFA	Merck (Darmstadt)	818715
pMD2.G	Addgene (Cambridge)	12259
pMDLg/pRRE	Addgene (Cambridge)	12251
Polybrene	SIGMA-ALDRICH (Steinheim)	H9268
Präpariertupfer Telaprep No.1	Hartmann (Heidenheim)	

Material und Methoden

Primer (Reverse Transkription)	Roche (Basel)	10814270001
Primer (EWS/FLI1 PCR)	Eurofins Genomics (Ebersberg)	
Propanolupfer QUICKPAD	Holtzsch (Tausnusstein)	
pRSV-Rev	Addgene (Cambridge)	12253
QuadroMACS Separator	Miltenyi (Bergisch Gladbach)	130-090-976
RNaseOUT (Reverse Transkription)	Invitrogen (Darmstadt)	10777-019
Rundkopfböhrer (H1, ø 0,4 mm)	NTI-Kahla (Kahla)	
Specific Albumin (22 %)	Medion Diagnostics (Miami)	050111
Stereotaxie-Bohrmaschine	David Kopf Instruments (Tujunga)	1471
Stereotaxie-Instrument	David Kopf Instruments (Tujunga)	902, 926, 1772
Sterican Gr. 18 (ø 0,45 mm)	B. Braun (Melsungen)	
Sterilfilter (0,2 µm)	A. Hartenstein (Würzburg)	FI02
Streptavidin-Peroxidase	BioGenex (Fremont)	LP000-UL
SuperScript III RT	Invitrogen (Darmstadt)	18080-093
Taq DNA Polymerase	Invitrogen (Darmstadt)	10342
Tris	AppliChem (Darmstadt)	A1086
Trypanblau	GIBCO (Carlsbad)	15250-061
Trypsin	SERVA (Heidelberg)	37289.01
VECTASHIELD (with DAPI)	Vector (Burlingame)	H-1200
VenorGeM Mykoplasmen Detektionskit	Minerva Biolabs (Berlin)	11-1025, 53-0050
Vysis MYC FISH Probe Kit	Abbott (Wiesbaden)	01N63-020
Vicryl 4-0	Ethicon (Norderstedt)	V392ZH
Xylazin	CP-Pharma (Burgdorf)	
Xylol	Staub & Co (Nürnberg)	1000453910008
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)	658175
Ziegennormalserum	Invitrogen (Darmstadt)	50062Z
1x TAE Puffer	SIGMA-ALDRICH (Steinheim)	T9650-1L
5x Puffer (Reverse Transkription)	Invitrogen (Darmstadt)	18080-093
7-AAD	BD Biosciences (Heidelberg)	559925
10x Puffer (EWS/FLI1 PCR)	Invitrogen (Darmstadt)	10342
24-well Platten	Nunc (Waltham)	142475
293FT Zellen	Invitrogen (Darmstadt)	R700-07

Tab. 11: Giemsa-Lösung

5 g Giemsa
100 ml Sörensenpuffer [4,14 g Na ₂ HPO ₄ und 3,6 g KH ₂ PO ₄ in 2 l aq. dest.]

Tab. 12: Pepsin-Lösung

4 mg Pepsin 100 ml 0,01 M HCl

Tab. 13: 1% PFA-Lösung (pH 7,4)

1 g PFA 0,05 M MgCl ₂ 100 ml DPBS
--

Tab. 14: 4% PFA-Lösung (pH 7,4)

4 g PFA 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer [14,32 g Na ₂ HPO ₄ , 1,56 g NaH ₂ PO ₄ , 1 l aq. dest.]

Tab. 15: Luciferin-Grundstock (30 mg/ml, sterilfiltriert)

1g Firefly D-Luciferin 33,3 ml steriles aq. dest.
--

Tab. 16: HE-Lösungen

Hämalaun	Eosin
1,2 g Hämatoxylin 0,2 g Natriumjodat 50 g Kalialaun 50 g Chloralhydrat 1 g Citronensäure 1 l aq. dest.	5 g Eosin 500 ml aq. dest.

Tab. 17: Puffer

Citratpuffer (pH 6,0)	Tris/EDTA-Puffer (pH 9,0)	TBS-Puffer (pH 7,6)
10,5 g Citronensäure 5,1 g NaOH 2,5 l aq. dest.	1,2 g Tris 0,375 g EDTA 1 l aq. dest.	169,4 g NaCl 121,1 g Tris 80 ml 25 % HCl 2 l aq. dest.

3.3.2. Methoden

3.3.2.1. Zellkultur

Die humane Medulloblastomlinie MB3W1 bzw. MB3W1-eGFP/FLuc wurde in serumfreiem Medium (serum free medium = SFM) bestehend aus DMEM/F12, 2 % B-27 Supplement 50x, 1 % MEM Vitamins 100x, 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF und 40 U/ml bzw. µg/ml Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 21 % O₂, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Unter diesen Bedingungen wuchsen die Zellen in Form von Neurosphären in Suspension. Zum Weiterpassagieren wurden Aliquots der Zellsuspension in frisches Kulturmedium überführt. Um den Einfluss der Sauerstoffspannung auf die CD133 Expression zu testen, wurde ein Teil der Zellen unter hypoxischen Bedingungen (2 % O₂) kultiviert. Zur Differenzierung wurden MB3W1 Zellen auch in serumhaltigem Medium (serum containing medium = SCM) bestehend aus DMEM, 10 % FKS und 40 U/ml bzw. µg/ml Penicillin/Streptomycin gezüchtet. Bei Kultur in SCM wurden die Zellen teilweise adhärent. Ein Teil der Zellen wuchs jedoch auch weiterhin in Suspension. Unter Verwendung von Accutase (gemäß Herstellerangabe) wurde nur die adhärente Phase der serumhaltigen Kultur weiterpassagiert. Die Langzeitlagerung und Testung auf Mykoplasmen erfolgte ident zum Glioblastom-Modell (siehe Kap. 2.3.2.1.). Alle verwendeten Zellen waren stets Mykoplasmen-frei.

3.3.2.2. Proliferationsassay

MB3W1 Zellen wurden durch mechanische Dissoziation (SFM-Kultur) bzw. mit Hilfe von Accutase (SCM-Kultur) vereinzelt. Nach Resuspension im jeweiligen Kulturmedium (2×10^5 Zellen/ml) wurden die Zellen triplicatweise in 24-well Platten ausgesät (2×10^5 Zellen/well) und weiterkultiviert. Am 4. Tag wurde pro

well 1 ml frisches Kulturmedium hinzugefügt. Jeden Tag wurden die Zellen je eines Triplikats gezählt. Hierzu wurden die in Suspension wachsenden Zellen der serumfreien und serumhaltigen Kulturen aspiriert, abzentrifugiert (5 min bei 500 g) und in 200 µl des jeweiligen Kulturmediums resuspendiert. Im Anschluß wurde die adhärente Phase der in SCM kultivierten Zellen mit 200 µl Accutase geerntet. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau-Exklusion wurde jeweils die mittlere Zellzahl eines jeden Triplikats bestimmt.

3.3.2.3. Lentivirale Transduktion

MB3W1 Zellen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Simone Riedel (AG Prof. Andreas Beilhack) mit einem eGFP und FLuc codierenden Vektor nach einem an anderer Stelle beschriebenen Protokoll [79] lentiviral transduziert. In Kürze: In vitro kultivierte 293FT Zellen wurden durch Hinzugabe des FUGLW Vectors (eine freundliche Gabe von Dr. Michael Bachman der Universität Stanford) und der drei Hilfsplasmide pRSV-Rev, pMDLg/pRRE und pMD2.G cotransfiziert. Nach 48 Stunden wurde der Virus beinhaltende Überstand der transfizierten Zellkultur gewonnen und zusammen mit Polybrene zur Transduktion nativer MB3W1 Zellen verwendet. Nach Wiederanzucht wurden die erfolgreich transduzierten Zellen (MB3W1-eGFP/FLuc) durch zweimalige eGFP-Aufreinigung mit einem FACS Aria selektioniert.

3.3.2.4. Polymerase chain reaction (PCR)

Mit Hilfe des GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kits wurde nach Herstellerangaben die RNA in vitro kultivierter MB3W1 Zellen isoliert. Nach photometrischer und gelelektrophoretischer Qualitätskontrolle wurde die RNA revers transkribiert (Tab. 18). Durch PCR (Tab. 19-21) wurde das Vorliegen eines EWS/FLI1 Fusionsgens evaluiert. Das Design der Primer orientierte sich an in der Literatur validierten Sequenzen [80]. Als Positivkontrolle diente ein

Ewing Sarkom mit bekanntem EWS/FLI1 Fusionsgen, als Negativkontrolle destilliertes Wasser. Zur Transkriptions- und PCR-Überprüfung wurde auch GAPDH amplifiziert. Die Gelelektrophorese der Amplifikate erfolgte in einem 2 % Agarosegel bei 100 Volt für 60 min in 1x TAE Puffer.

Tab. 18: Reverse Transkription

Inhaltsstoff	Volumen
RNA (100 ng/μl)	9,5 μl
20 μM Primer	2,5 μl
10 mM dNTPs	1 μl
65 °C für 5 min	
4 °C für 2 min	
+ 5x Puffer	4 μl
+ RNaseOUT	1 μl
+ 0,1 M DTT	1 μl
+ SuperScript III RT	1 μl
55 °C für 45 min	
70 °C für 15 min	
4 °C für ∞	

Tab. 19: PCR-Ansatz (1x)

Inhaltsstoff	Volumen
Aq. dest.	16,87 μl
10x Puffer	2,5 μl
50 mM MgCl ₂	1 μl
2,5 mM dNTPs	2 μl
25 μM Primer 5'3'	0,5 μl
25 μM Primer 3'5'	0,5 μl
Taq DNA Polymerase	0,13 μl
cDNA (100 ng/μl)	1,5 μl

Tab. 20: PCR-Primer

Gen	Sequenz
GAPDH	CCGCTTCGCTCTCTGCTCCTCC GATCTTGAGGCTGTTGTCATAC
EWS/FLI1	CCACTAGTTACCCACCCCAAAC GTGATACAGCTGGCGTTGGCG

Tab. 21: PCR-Zyklusprotokoll

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing	65 °C	30 sec
Elongation	72 °C	30 sec
abschließende Elongation	72 °C	7 min
	8 °C	∞

3.3.2.5. Karyogramm

In SFM kultivierte MB3W1 Zellen wurden durch Hinzugabe von 10 µl/ml Colcemid und Inkubation (30 min im Brutschrank) zellzyklusarretiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min bei 200 g), in 37 °C warmer 0,075 M KCl Lösung resuspendiert und im Wasserbad bei 37 °C für 20 min inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren (10 min bei 200 g) wurden die Zellen in eiskalter Fixativlösung (1 Teil Eisessig und 3 Teile Methanol) resuspendiert, auf kalte entfettete Objektträger aufgetropft und 4 Tage bei 56 °C gelagert. Die getrockneten Objektträger wurden anschließend für 20 sec in Trypsin (500 µg/ml) inkubiert und nach zweimaligem Waschen in DPBS für 6 min in 5 % Giemsalösung gefärbt. Nach zweimaligem Waschen in aq. dest. wurden die gefärbten Zellen mit Pertex eingedeckelt und mikroskopiert. Die Aufnahme und Auswertung der angefertigten Karyogramme erfolgte mit Hilfe der Software Ikaros.

3.3.2.6. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

In Fixativlösung resuspendierte MB3W1 Zellen (siehe Kap. 3.3.2.5.) wurden auf Objektträger aufgetropft und für 30 min bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Zellen je 8 min in 70 %, 90 % und 100 % Ethanol entwässert, in Pepsinlösung inkubiert (4 min bei 37 °C) und nach Waschen in DPBS (5 min) in 1 % PFA Lösung für 5 min bei 4 °C refixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen für 10 min in DPBS gewaschen, rehydriert (je 5 min in 100 %, 90 % und 70 % Ethanol) und für 10 min bei 37 °C getrocknet. Dann wurden die Zellen mit 1,43 µl der FISH-Sonden des PathVysion HER-2 DNA Probe Kits II oder des Vysis MYC Break Apart Rearrangement FISH Probe Kits versetzt, luftblasenfrei mit einem Deckgläschen und Fixogum zugedeckelt und zur DNA-Denaturierung für 10 min bei 80 °C auf einer Heizplatte gelagert. Zur Sondenhybridisierung wurden die Zellen anschließend über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Deckgläschen samt Kleber entfernt, die Zellen wurden für 4 min in 73 °C warmer Waschlösung (PathVysion HER-2 DNA Probe Kit II) gewaschen, anschließend dehydriert (je 5 min in 70 %, 90 % und 100 % Ethanol), getrocknet (10 min bei 37 °C) und zum Schluss mit VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI eingedeckelt und mit Hilfe des Isis Systems mikroskopiert.

Eine Amplifikationsanalyse des *MYC* Gens wurde freundlicherweise von Herrn Daniel Picard (AG Dr. Marc Remke, Universität Düsseldorf) mit Hilfe von Vysis LSI MYC/CEP 8 Sonden von Abbott Molecular nach Herstellerangabe durchgeführt.

3.3.2.7. nanoString Assay

Die Expressionsanalyse von 22 Medulloblastom-Subgruppen-spezifischen Markergenen erfolgte freundlicherweise durch Herrn Dr. Marc Remke (AG Prof. Michael Taylor, University of Toronto). RNA-Extrakte früher (<5) und später

(>20) in vitro Passagen von MB3W1 Zellen wurden nach einem wie an anderer Stelle beschriebenen Protokoll [81] mit Hilfe der nanoString nCounter Technology analysiert. Heatmaps wurden mit der Software GenePattern (www.genepattern.org) erstellt.

3.3.2.8. Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mit Hilfe eines FACS Canto II durchgeführt.

3.3.2.8.1. CD133

MB3W1 Zellen wurden durch mechanische Dissoziation (SFM-Kultur) bzw. Accutase (SCM-Kultur) vereinzelt. Nach Zentrifugation (5 min bei 500 g) wurden die Zellen in CliniMACS PBS/EDTA Puffer, supplementiert mit 0,5 % Human Serum, resuspendiert (10^7 Zellen/ml) und nach Hinzugabe von FcR Blocking Reagent (1:4) für 10 min bei 4 °C mit CD133/1 (AC133)-PE (1:11) inkubiert. Als Isotypenkontrolle diente PE Mouse IgG1, κ Isotype Control (1:11). Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen nach Hinzugabe von 50 μ l Puffer abzentrifugiert (5 min bei 500 g), in 200 μ l Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch untersucht. Zur Bestimmung der Lebendpopulation wurde zuvor eine 7-AAD Färbung nach Herstellerangabe durchgeführt.

3.3.2.8.2. eGFP

Die eGFP Expression lentiviral transduzierter MB3W1-eGFP/FLuc Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft. Hierzu wurden die Zellen zuerst mechanisch vereinzelt und die Zellzahl auf 1 Millionen Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde die eGFP Expression im FITC Kanal evaluiert. Als Kontrolle dienten native MB3W1 Zellen.

3.3.2.8.3. Magnetic activated cell sorting (MACS)

In SFM kultivierte MB3W1 Zellen wurden mit Hilfe des CD133 MicroBead Kits separiert. Hierzu wurden die Zellen nach mechanischer Dissoziation in CliniMACS PBS/EDTA Puffer, supplementiert mit 0,5 % Human Serum, resuspendiert (10^8 Einzelzellen/300 μ l) und nach Hinzugabe von FcR Blocking Reagent (1:4) und CD133/1 (AC133) MicroBeads (1:4) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Um nach Separation den Grad der Aufreinigung bestimmen zu können, wurden die Zellen durch Hinzugabe von CD133/2 (293C3)-PE (1:11) noch fluoreszenzmarkiert (5 min bei 4 °C). Nach Inkubation wurden die Zellen mit 10 ml Puffer gewaschen, abzentrifugiert (5 min bei 500 g), in 3 ml Puffer resuspendiert und nochmals mechanisch dissoziiert. Dann wurden die Zellen nach Herstellerangabe mit Hilfe eines QuadroMACS Separator und LS Säulen aufgetrennt. Um den Grad der Aufreinigung zu erhöhen, wurde die Separation für beide Zellfraktionen (CD133⁻ u. CD133⁺) zweimal wiederholt. Am Ende wurde der Aufreinigungsgrad durchflusszytometrisch bestimmt.

3.3.2.8.4. Aldehyddehydrogenase (ALDH) Assay

Die Evaluation der ALDH-Expression in SFM kultivierter MB3W1 Zellen erfolgte mit Hilfe des ALDEFLUOR Kits nach Herstellerangabe. In Kürze: CD133⁻ und CD133⁺ MB3W1 Einzelzellen wurden nach Zentrifugation (5 min bei 500 g)

jeweils in ALDEFLUOR Assay Puffer resuspendiert (1 Millionen Zellen/ml). Nach Hinzugabe von ALDEFLUOR Reagent (5 µl/ml) wurde jeweils die Hälfte der Zellsuspension entnommen und mit DEAB (5 µl/500 µl Zellsuspension) versetzt. Nach Inkubation (60 min bei 37 °C) wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min bei 500 g), in 200 µl Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.3.2.9. Orthotope Inokulation

Die Durchführung der *in vivo* Versuche erfolgte größtenteils ident zum Glioblastom-Modell (siehe Kap. 2.3.2.3.).

3.3.2.9.1. Versuchstiere

Weibliche NOD.CB17-*Prkdc^{scid}*/J (NOD/SCID) Mäuse wurden von „The Jackson Laboratory“ bezogen und unter SPF-Bedingungen in einer IVC-Anlage gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

3.3.2.9.2. Tumorzellpräparation

Kurz vor Inokulation wurden in SFM kultivierte MB3W1 bzw. MB3W1-eGFP/FLuc Zellen mechanisch dissoziiert. Zur Inokulation differenzierter MB3W1 Zellen, wurde nach 12 tägiger Kultur in SCM die noch Neurosphären enthaltende Suspensionsphase zunächst verworfen und die übriggebliebenen adhären Zellen nach zweimaligem Waschen mit reinem Kulturmedium mit Hilfe von Accutase (nach Herstellerangabe) geerntet. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Exklusion wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min bei 500 g) und die Zellkonzentration auf 5×10^5 bzw. 5×10^4 Zellen/5 µl des jeweiligen Kulturmediums eingestellt. Durch 1:10

Verdünnung wurde die Zellkonzentration jeweils bis auf 5×10^3 bzw. 5×10^2 Zellen heruntertitriert. Zur infratentoriellen Inokulation wurde das Inokulationsvolumen reduziert (5×10^4 MB3W1-eGFP/FLuc Zellen in 3 μ l Kulturmedium). Bis zur Inokulation wurden die Zellen in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß in ihrem jeweiligen Medium bei RT gelagert.

3.3.2.9.3. Tumorzellinokulation

10-13 Wochen alte NOD/SCID Mäuse wurden durch i.p. Injektion von Esketamin (80-100 mg/kg) und Xylazin (8-10 mg/kg) narkotisiert. Alle weiteren Schritte erfolgten wie beim Glioblastom-Modell (siehe Kap. 2.3.2.3.3.). Lediglich die infratentorielle Inokulation wies folgende Modifikation im Vorgehen auf: Der Hautschnitt wurde 0,5 cm weiter caudal angesetzt und es wurde 2 mm rechts und 2 mm caudal von Lambda (Kreuzung der Sagittal- und Lambdanaht) trepaniert. Außerdem wurde das inokulierte Injektionsvolumen von 5 μ l auf 3 μ l reduziert.

3.3.2.9.4. Postoperative Evaluation

Die postoperative Evaluation entsprach der des Glioblastom-Modells (siehe Kap. 2.3.2.3.4.).

3.3.2.10. BLI

Das BLI erfolgte mit Hilfe eines IVIS Spectrum und der Software Living Image.

3.3.2.10.1. In vitro BLI

Auch die FLuc-Expression transduzierter MB3W1-eGFP/FLuc Zellen wurde mittels in vitro BLI und Regressionsanalyse quantifiziert. Hierzu wurden die in vitro kultivierten Zellen mechanisch dissoziiert und anschließend wie im Glioblastom-Modell behandelt (siehe Kap. 2.3.2.4.1.). Das Hintergrundsignal wurde mit Hilfe von 10^6 untransduzierten MB3W1 Zellen bestimmt.

3.3.2.10.2. In vivo BLI

Das in vivo BLI wurde bereits ab dem Inokulationstag durchgeführt. Lediglich mit Ausnahme geringerer Anästhetikadosen (60 mg/kg Esketamin und 12 mg/kg Xylazin) erfolgte es prinzipiell wie beim Glioblastom-Modell (siehe Kap. 2.3.2.4.2.).

3.3.2.11. Histologie

Die histologische Aufarbeitung der Versuche lief weitgehend ident zum Glioblastom-Modell ab (siehe Kap. 2.3.2.6.).

3.3.2.11.1. Gehirnpräparation

Siehe Kap. 2.3.2.6.1. Glioblastom-Modell.

3.3.2.11.2. HE

Siehe Kap. 2.3.2.6.2. Glioblastom-Modell.

3.3.2.11.3. Zytospin

Bei Gehirnentnahme wurden meningeotische Auflagerungen mit Hilfe einer 200 µl Pipette aspiriert und in DPBS überführt. Anschließend wurden die Zellen gezählt und die Zellkonzentration wurde auf 10^6 Zellen/ml DPBS eingestellt. Nach Vorlage von 2 Tropfen Specific Albumin (22 %) wurden 200 µl der Zellsuspension mittels Zytospintrichter auf Objektträger zentrifugiert (5 min bei 55 g). Nach Trocknung (bei RT über Nacht) wurden die Präparate bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur histologischen Evaluation wurden die Zellen aufgetaut, 10 min in eiskaltem Aceton fixiert und ohne Entparaffinierungsschritt HE gefärbt (siehe Kap. 2.3.2.6.2 Glioblastom-Modell).

3.3.2.11.4. IHC

Die immunhistochemische Aufbereitung erfolgte wie beim Glioblastom-Modell (siehe Kap. 2.3.2.6.3.). Die verwendeten Primärantikörper finden sich in Tab. 22.

Tab. 22: IHC Primärantikörper

Antikörper (Anti-)	Retrieval	Verdünnung
β-Catenin	Citratpuffer	1:4000
βIII-Tubulin	Citratpuffer	1:500
CD99	Citratpuffer	1:200
CD133/1	Tris/EDTA-Puffer	1:40
GFAP	Citratpuffer	1:6000
Her2/neu	Citratpuffer	1:4000
INI-1	Citratpuffer	1:100
Ki-67	Citratpuffer	1:80
Nestin	Citratpuffer	1:200
Olig2	Citratpuffer	1:100
p53	Citratpuffer	1:100
Synaptophysin	Citratpuffer	1:80
Vimentin	Citratpuffer	1:4000

3.3.2.12. Statistik

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit Microsoft Excel und GraphPad PRISM.

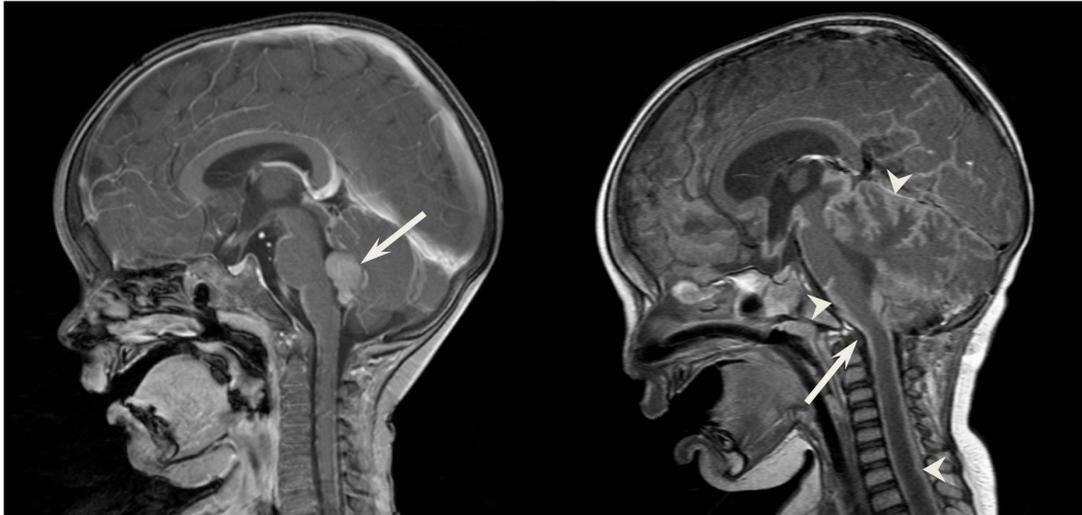
3.4. Ergebnisse

Therapieresistente MB3W1 Zellen zeigen eine Amplifikation des *MYC* Onkogens und eine extraneurale Metastasierung

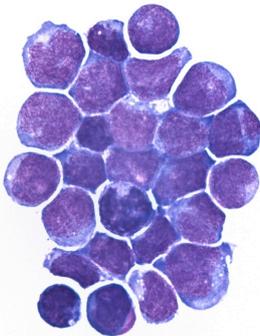
Ein 22 Monate alter Junge präsentierte sich an der Universitätskinderklinik Würzburg mit rasch progredienter Gangunsicherheit. Das initiale MRT zeigte einen kontrastmittelaufnehmenden Tumor, der vom Boden des 4. Ventrikels ausging, sowie eine sich über das gesamte ZNS erstreckende Meningeose (Abb. 9 A linkes Bild). In der Liquorzytologie fanden sich zahlreiche klein- und blauzellige Tumorzellen (Abb. 9 B). Unverzüglich wurde die neurochirurgische Resektion des Tumors durchgeführt. Das unmittelbar postoperativ durchgeführte Kontroll-MRT zeigte kein residuales Tumorgewebe im Bereich der Resektionsstelle. Die histopathologische und molekulargenetische Beurteilung des Resektats ergab die Diagnose „anaplastisches Medulloblastom“ (Abb. 9 C) mit Amplifikation des *MYC* Onkogens (festgestellt durch die Referenzpathologie des Universitätsklinikums Bonn). Beides Befunde, die mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind [51, 52]. Differentialdiagnostisch konnten ein atypisch teratoid/rhabdoider Tumor (ATRT) und ein peripherer primitiv neuroektodermaler Tumor (pPNET) mittels PCR und Immunhistochemie ausgeschlossen werden (siehe Anhang Abb. 21 A-C). Wenige Tage nach Operation entwickelte der Junge Zeichen eines erhöhten Hirndrucks, so dass ein ventrikuloperitonealer Shunt angelegt wurde. Nach einer kurzzeitigen Normalisierung der intrakraniellen Druckwerte kam es zwei Wochen nach Resektion zu einem dramatischen Wiederanstieg des Hirndrucks mit Zeichen eines Mittelhirnsyndroms und einer ausgeprägten Hirnstammsymptomatik. Die erneute Bildgebung mittels MRT zeigte einen massiven Progress der Meningeose mit Kompression des Hirnstamms (Abb. 9 A rechtes Bild). Notfallmäßig wurde der Junge einer kranialen Bestrahlung (initial 3 Gy/d, gefolgt von 2 Gy/d) unterzogen. Unter klinischer und radiologischer Verbesserung wurde die Bestrahlung auf die gesamte Neuralachse

ausgeweitet, auch um eine sich entwickelnde Querschnittssymptomatik zu behandeln. Die Gesamtdosen für das Neurocranium und die spinale Achse betragen zum Schluss 29 bzw. 32 Gy. Die Bestrahlung der hinteren Schädelgrube wurde zusätzlich auf 53 Gy aufgesättigt.

A



B



C

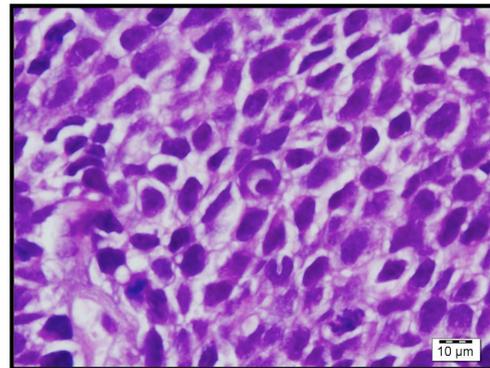


Abb. 9: MB3W1 Zellen zeigen einen aggressiven klinischen Verlauf.

(A) Kontrastmittelverstärkte sagittale MRT Bilder in T1 Wichtung (mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. Dr. Monika Warmuth-Metz). Linkes Bild: Cerebellärer Tumor (→) im Bereich des 4. Ventrikels bei Erstvorstellung. Rechtes Bild: Massiver Progress der Meningeose (▶) mit Kompression des Hirnstammes (→) 2 Wochen nach Resektion. (B) Die initiale Liquorzytologie (Pappenheim Färbung) zeigt medulloblastomtypische klein- und blauzellige Tumorzellen (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Paul-Gerhardt Schlegel). (C) Repräsentative HE Färbung des Tumorresektats mit typischer Morphologie eines anaplastischen Medulloblastoms (mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Camelia Monoranu).

Der bestrahlungsinduzierte Rückgang der Meningeose wurde in Anlehnung an das HIT 2000 Protokoll durch eine Erhaltungskemotherapie mit Lomustin, Vincristin und Cisplatin aufrechterhalten. Ein unter dieser Therapie neu aufgetretener Hörverlust zwang jedoch zum Therapiewechsel auf Cyclophosphamid und Etoposid. Neun Monate nach Diagnosestellung rezidierte der Tumor im Bereich des ehemaligen Tumorbetts und des linken Seitenventrikels. Außerdem kam es zu einem erneuten Progress der Meningeose. Im Sinne einer individuellen Therapieentscheidung wurde das Chemotherapieregime erneut gewechselt. Adaptiert an das HIT-REZ 2005 Protokoll wurde Etoposid nun intraventrikulär verabreicht. Dennoch konnte trotz intensiver Therapie keine Kontrolle des Tumorwachstums erzielt werden. Kurz vor seinem Tod, zehn Monate nach Diagnosestellung, entwickelte der Junge Aszites und beidseitige Pleuraergüsse (zuerst rechts, dann auch links). Die Entlastung mittels Pleurazentese ergab zahlreiche maligne Zellen (morphologisch identisch zur Liquorzytologie bei Diagnosestellung). Mittels Ficoll Gradient konnten die Tumorzellen aus den Pleuraaspiraten isoliert und direkt als in vitro Zelllinie (genannt **MB3W1** für **Medulloblastom-Gruppe 3-Würzburg 1**) etabliert werden.

MB3W1 Zellen zeigen phänotypische und funktionelle Aspekte von Tumorstammzellen in vitro

Nach Isolation und einer kurzen Kultur (4 Tage) in serumhaltigem Medium (serum containing medium = SCM) wurden die Zellen durchflusszytometrisch evaluiert. Erstaunlicherweise zeigten die Zellen eine starke Expression von CD15 und CD133 (Abb. 10 A), beides Marker, die typischerweise von Tumorstammzellen exprimiert werden [82-87]. In Anbetracht dieses Phänotyps wurden MB3W1 Zellen unter in vitro Bedingungen weitervermehrt, die bei neuronalen Stammzellen Anwendung finden. Geeigneterweise werden sie in serumfreiem Medium (serum free medium = SFM), welches basic fibroblast growth factor (bFGF) und epidermal growth factor (EGF) enthält, kultiviert.

Unter diesen Bedingungen bleiben neuronale Stammzellen in einem undifferenzierten Zustand und behalten die Fähigkeit der Selbsterneuerung und exponentiellen Langzeitproliferation. Typischerweise wachsen sie in Suspension in Form von dreidimensionalen Neurosphären [86, 88, 89]. Unter Kultur in SFM zeigten auch MB3W1 Zellen diese Eigenschaften. Sie formten (in Suspension wachsend) Neurosphären (Abb. 10 B linkes Bild) und zeigten ein exponentielles Proliferationsverhalten (Abb. 10 C). Auch Langzeitkulturen konnten problemlos etabliert werden. Selbst in der 30. in vitro Passage kam es zu keiner Änderung des Wachstumsmusters. Auch CD133 wurde fast gänzlich unverändert exprimiert (Abb. 10 D oberes Histogramm). Da CD133 in vitro durch Hypoxie getriggert exprimiert werden kann [90], wurden die Zellen auch unter hypoxischen Bedingungen kultiviert (5 Tage bei 2 % O₂), um eine artifizielle CD133 Expression auszuschließen. Ein Einfluss der Sauerstoffspannung auf die Expression von CD133 konnte in vitro jedoch nicht beobachtet werden (siehe Anhang Abb. 21 D). Wenn MB3W1 Zellen allerdings in serumhaltigem Medium kultiviert wurden, änderte sich ihr Wachstumsverhalten. Die Zellen wurden teilweise adhären (Abb. 10 B rechtes Bild) und ihre Proliferationsgeschwindigkeit sank (Abb. 10 C). Dennoch blieb die Formation von Neurosphären erhalten (Abb. 10 B rechtes Bild). Diejenigen Zellen, die Neurosphären formten, waren die eigentliche proliferierende Fraktion, während die adhären Zellen so gut wie keine Vermehrung zeigten (Abb. 10 C). Trotz des Einflusses dieser Kulturbedingungen auf das Wachstumsverhalten blieb die Expression von CD133 unverändert. Sowohl die adhären als auch die Neurosphären-bildenden Zellen exprimierten weiterhin CD133, selbst in ihrer 30. in vitro Passage (Abb. 10 D mittleres u. unteres Histogramm). In Zusammenschau der in vitro Ergebnisse zeigte sich also, dass MB3W1 Zellen eine Vielzahl typischer Aspekte, die für Stammzellen beschrieben sind, erfüllen.

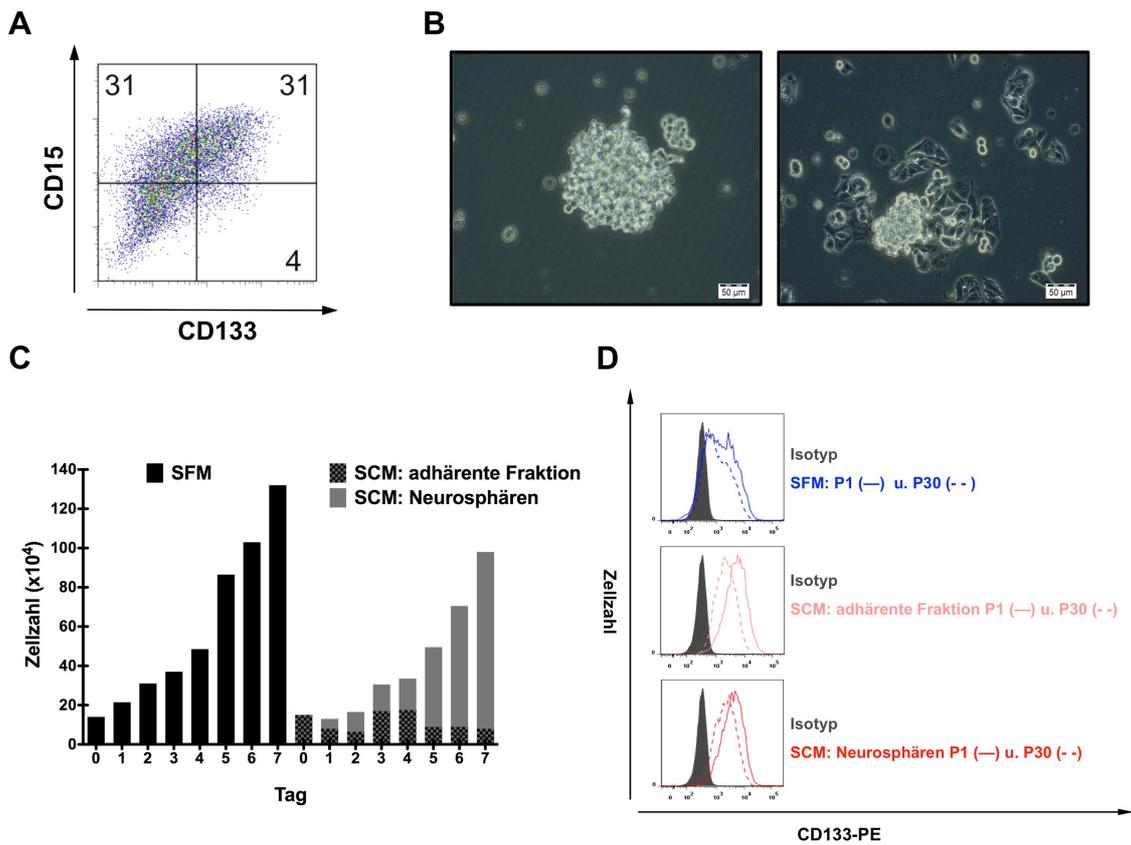


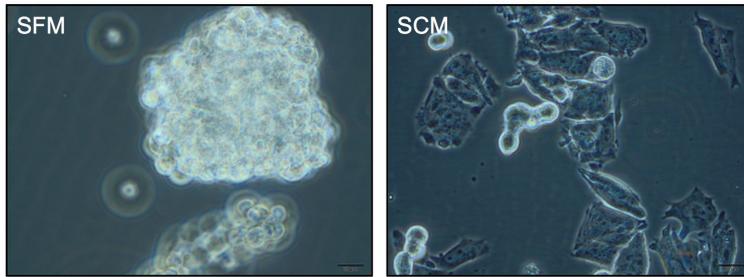
Abb. 10: MB3W1 Zellen zeigen Tumorstammzeleigenschaften in vitro.

(A) Nach Isolation aus malignen Pleuraergüssen und viertägiger in vitro Kultur wurden MB3W1 Zellen durchflusszytometrisch untersucht (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Priv. Doz. Dr. Matthias Wöfl). MB3W1 Zellen zeigten dabei eine starke Expression der Stammzellmarker CD15 und CD133 (Dot Plot Diagramm). (B) Durchlichtmikroskopie: Während in serumfreiem Medium (SFM) kultivierte MB3W1 Zellen stammzelltypisch in Suspension wachsende Neurosphären ausbilden (linkes Bild), werden in serumhaltigem Medium (SCM) kultivierte MB3W1 Zellen teilweise adhärent. Ein Teil der Zellen formiert jedoch auch weiterhin Neurosphären (rechtes Bild). (C) Proliferationsassay: 2×10^5 in SFM und SCM kultivierte MB3W1 Zellen wurden in 24 well Platten ausgesät und täglich mittels Trypanblau-Exklusion gezählt. In SFM kultivierte MB3W1 Zellen zeigen eine exponentielle Proliferation (schwarze Balken). SCM führte zu einer signifikanten Reduktion der Wachstumsrate. Bei genauer Betrachtung proliferierte nur der Neurosphären ausbildende Anteil (graue Balken) der SCM Kultur, während die adh rente Fraktion (schwarz schraffierte Balken) keine Zellvermehrung zeigte. (D) In SFM (blaue Graphen) und SCM (rosarote u. rote Graphen) kultivierte MB3W1 Zellen wurden in ihrer 1. (durchgehende Graphen) und 30. (gestrichelte Graphen) in vitro Passage (P) mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer CD133 Expression evaluiert. Weder das Passagieren noch die Kultur in SCM führte zu einer signifikanten Reduktion der CD133 Expression. Isotypenkontrolle = graue Graphen.

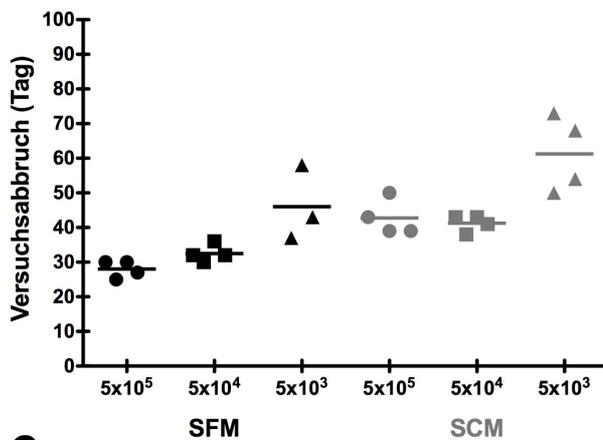
MB3W1 Zellen zeigen ein aggressives Tumorwachstum in immuninkompetenten Mäusen

Ein typisches Kennzeichen von Tumorstammzellen ist, dass sie bei Transplantation in immuninkompetente Mäuse hoch tumorigen sind [87]. Um zu überprüfen, ob MB3W1 Zellen auch diese in vivo Eigenschaft besitzen, wurden (5×10^3 bis 5×10^5) in SFM kultivierte MB3W1 Zellen intrakraniell in immuninkompetente NOD/SCID Mäuse injiziert. Da serumhaltiges Medium eine differenzierende Wirkung auf MB3W1 Zellen in vitro zu haben schien (Adhärenz, verlangsamte Proliferation), wurden auch in SCM kultivierte Zellen (5×10^3 bis 5×10^5 Zellen der adhären Phase nach 12 Tagen in SCM) inokuliert. In SFM kultivierte MB3W1 Zellen erwiesen sich hierbei als hochgradig tumorinduktiv. Alle Versuchstiere entwickelten Tumore (11/11), selbst wenn nur 5000 Zellen injiziert wurden. Das mediane Überleben der Versuchstiere (Inokulationstag bis humane endpoint) betrug laut Kaplan-Meier Analyse 28,5 (5×10^5), 32 (5×10^4) und 43 (5×10^3) Tage. Wenn die Zellen vor Inokulation 12 Tage in SCM kultiviert wurden, zeigte sich zwar auch in vivo ein verlangsamtes Wachstum (vgl. Abb. 10 C), dennoch entwickelten alle Versuchstiere (12/12) am Ende Tumore. Das mediane Überleben im Falle der in SCM kultivierten Zellen betrug 41 (5×10^5), 42 (5×10^4) und 61 (5×10^3) Tage (Abb. 11).

A



B



C

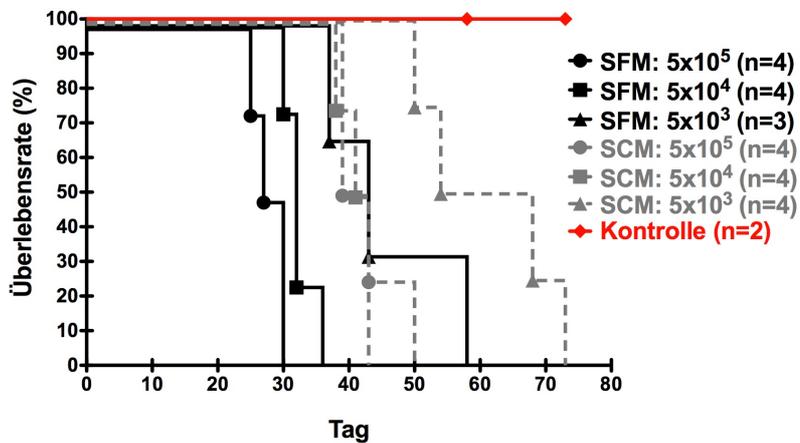


Abb. 11: Orthotop inokulierte MB3W1 Zellen sind hoch tumorigen in NOD/SCID Mäusen.

5×10^3 - 5×10^5 in SFM oder SCM (nur die adhärenente Phase) kultivierte MB3W1 Zellen wurden in die rechte Hemisphäre von NOD/SCID Mäusen inokuliert. Bei Erreichen des humane endpoint, wenn die Versuchstiere Anzeichen einer zunehmenden Tumorlast zeigten, wurden die in vivo Versuche abgebrochen. Zur Kontrolle wurden mit reinem Kulturmedium inokulierte Versuchstiere mitgeführt. **(A)** Durchlichtmikroskopie: In SFM kultivierte MB3W1 Neurosphären (linkes Bild) und in SCM kultivierte adhärenente MB3W1 Zellen (rechtes Bild). **(B)** Trotz Inokulation gleicher Zellzahlen kam es bei in SFM kultivierten Zellen zu einem schnelleren Tumorwachstum und Versuchsabbruch. Die Dauer bis zum Versuchsende differierte zwischen in SFM und SCM kultivierten Zellen durchschnittlich um 15 (5×10^5), 8 (5×10^4) und 15 (5×10^3) Tage. **(C)** Kaplan-Meier Kurven: Sowohl bei Inokulation von in SFM als auch in SCM kultivierten MB3W1 Zellen entwickelten 100 % der Versuchstiere Tumore, selbst bei Inokulation von nur 5000 Zellen.

Da die Koppelung der tumorinitiierenden Kapazität humaner Gehirntumore an die Expression von CD133 beschrieben ist [87], wurde nachfolgend evaluiert, ob dies auch für MB3W1 Zellen zutrifft. Hierfür wurden MB3W1 Zellen (freundlicherweise von Frau Dr. Simone Riedel, AG Prof. Andreas Beilhack) zuvor mit einem für FLuc und eGFP codierenden Vektor lentiviral transduziert (siehe Anhang Abb. 22 A u. B), um das Tumorwachstum in vivo überwachen zu können. Die transduzierten Zellen (MB3W1-eGFP/FLuc) zeigten weder veränderte Wachstumseigenschaften noch änderte sich ihre CD133 Expression. Vor Inokulation wurden die Zellen dann mit Hilfe magnetischer beads in CD133⁺ und CD133⁻ Fraktionen aufgereinigt (MACS). Die CD133 Separation resultierte in Reinheiten von 88 % für die CD133⁺ und 95 % für die CD133⁻ Zellfraktion (Abb. 12 A). Je 5×10^2 bis 5×10^4 transduzierte MB3W1-eGFP/FLuc Zellen wurden supratentoriell in die rechte Hemisphäre von NOD/SCID Mäusen injiziert. Zum Vergleich wurden auch 5×10^4 unseparierte CD133[±] MB3W1-eGFP/FLuc Zellen inokuliert (supra- und auch infratentoriell). Erstaunlicherweise zeigten die supratentoriell inokulierten CD133⁺ Zellen kein besseres Tumorwachstum als CD133⁻ MB3W1-eGFP/FLuc Zellen. Beide Fraktionen besaßen eine äußerst hohe Proliferationskapazität in vivo. Das BLI zeigte in beiden Fällen eine schnell und kontinuierlich zunehmende Photonenemission. Letztendlich resultierte sowohl die Inokulation von CD133⁺ als auch von CD133⁻ MB3W1-eGFP/FLuc Zellen in einer 100 % Tumorratenrate, sogar bei Injektion von nur 500 Zellen. Beide Fraktionen besaßen die gleiche, hohe tumorinitiierende Kapazität, unabhängig von ihrer CD133 Expression. Auch der Vergleich mit unseparierten CD133[±] MB3W1-eGFP/FLuc Zellen erbrachte keine Unterschiede. Unabhängig davon, ob die Zellen separiert oder supra- bzw. infratentoriell injiziert wurden, bei Inokulation von 5×10^4 MB3W1-eGFP/FLuc Zellen betrug das Intervall bis zum Versuchsabbruch jedesmal durchschnittlich 38 ± 4 Tage. Auch das in vivo BLI zeigte bei allen Konditionen die gleiche Kinetik, unabhängig vom CD133 Expressionsgrad oder dem Ort der Inokulation (Abb. 12 B-D).

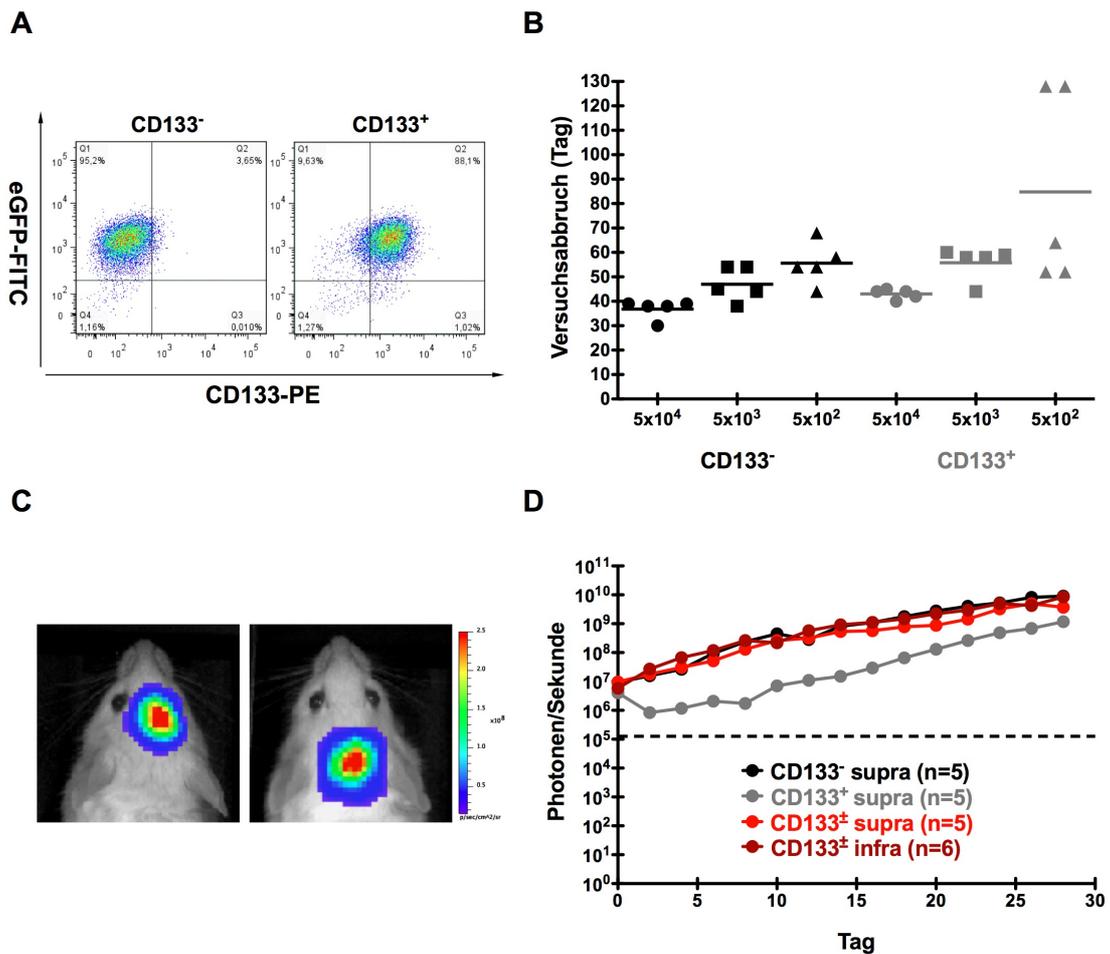


Abb. 12: CD133 zeigt keinen Einfluss auf die Tumorigenität von MB3W1 Zellen in vivo.

5x10² - 5x10⁴ CD133⁻ und CD133⁺ MB3W1-eGFP/FLuc Zellen wurden nach MACS Separation in die rechte Hemisphäre von NOD/SCID Mäusen inokuliert. Zur Kontrolle wurden auch 5x10⁴ CD133[±] Zellen supra- und infratentoriell inokuliert. Das Zellwachstum wurde ab dem Inokulationstag alle 2 Tage mittels BLI kontrolliert. **(A)** Durchflusszytometrie (Dot Plot): Die MACS Separation resultierte in Aufreinigungsraten von 95 % (CD133⁻) und 88 % (CD133⁺). **(B)** Sowohl CD133⁻ als auch CD133⁺ MB3W1-eGFP/FLuc Zellen zeigten ein aggressives in vivo Wachstum. Sogar bei Inokulation von nur 500 Zellen entwickelten alle Versuchstiere Tumore (je 5/5). **(C)** Repräsentatives in vivo BLI Bild supra- (links) und infratentoriell (rechts) inokulierter MB3W1-eGFP/FLuc Zellen. **(D)** MB3W1-eGFP/FLuc Zellen zeigten ab dem Inokulationstag eine schnelle und kontinuierliche Zunahme ihrer Photonemission (repräsentative BLI Mittelwerte bei Inokulation von 5x10⁴ Zellen). Zur Festlegung eines Hintergrundniveaus (gestrichelte schwarze Linie) wurde 2 Versuchstieren reines Kulturmedium injiziert.

Da die orthotope Inokulation von MB3W1-eGFP/FLuc Zellen nach MACS Aufreinigung in vivo keine Unterschiede ergab, wurde die Rolle von CD133 nochmals in vitro untersucht. Neben der Expression typischer Oberflächenmarker, gelten auch hohe Aldehyddehydrogenase (ALDH) Expressionslevel als funktionelles Kennzeichen von Tumorstammzellen [91, 92]. Also wurden MB3W1 Zellen erneut in vitro MACS-separiert. Nach CD133

Aufreinigung wurden die Zellen dann mittels ALDEFLUOR Assay evaluiert, um zu überprüfen, ob sich die ALDH Expression zwischen CD133⁺ und CD133⁻ MB3W1 Zellen unterscheidet. Die Aufreinigung resultierte in Reinheitsgraden von 87 % (CD133⁻) und 88 % (CD133⁺). In der durchflusszytometrischen Analyse zeigten die Zellen als weiteres stammzelltypisches Merkmal hohe ALDH Level (CD133⁺ Zellen 74 %, CD133⁻ Zellen 80 %), jedoch ergaben sich schon wie in den Xenotransplantationsversuchen zuvor auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen CD133⁺ und CD133⁻ MB3W1 Zellen. Beide Fraktionen zeigten die gleiche hohe ALDH Aktivität (Abb. 13).

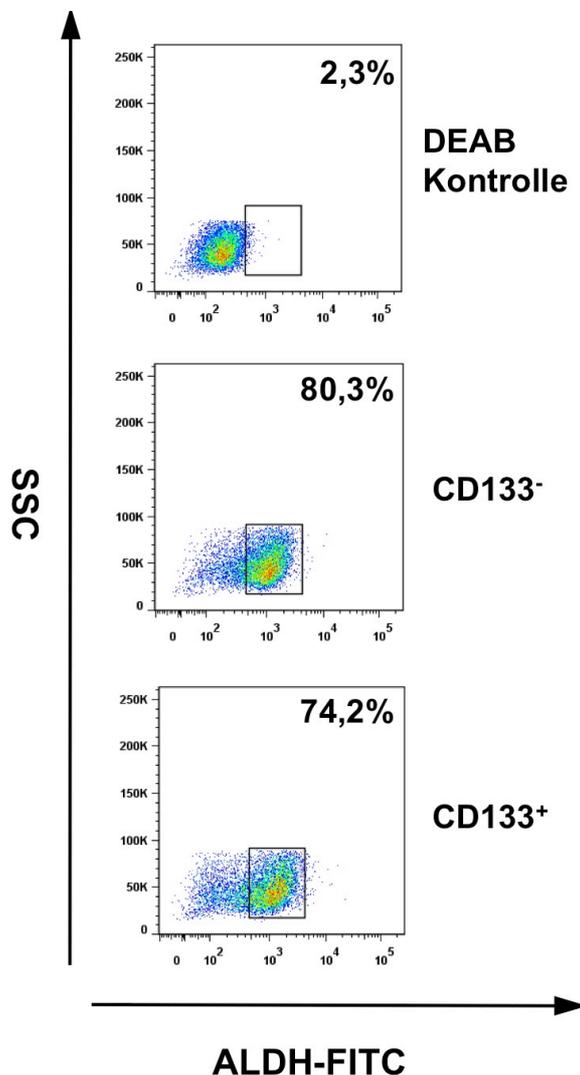


Abb. 13: CD133⁻ und CD133⁺ MB3W1 Zellen zeigen eine hohe ALDH Expression.

MB3W1 Zellen wurden nach CD133 MACS Aufreinigung mittels ALDEFLUOR Assay evaluiert. Zur Festlegung der Hintergrundfluoreszenz wurde bei einem Aliquot der zu analysierenden Zellen ALDH mittels DEAB inhibiert (DEAB Kontrolle).

Orthotop xenotransplantierte MB3W1 Zellen führen zu exakten Kopien des Ursprungstumors

Eine fundamentale Eigenschaft von Tumorstammzellen besteht darin, dass Xenotransplantate die histopathologischen Charakteristika des Ursprungstumors exakt rekapitulieren [87]. Daher wurden die xenotransplantierten Tumore mit der Histologie des Primärtumors verglichen. Hierbei rekapitulierten die durch orthotope Inokulation induzierten Tumore exakt die morphologischen und biologischen Eigenschaften des Originaltumors. Sowohl die Xenotransplantate als auch der Primärtumor zeigten eine anaplastische Morphologie mit ausgeprägtem Zellkernpolymorphismus, nukleären Angulationen und Einmüldungen bis hin zu für anaplastische Medulloblastome typischen cell wrapping Phänomenen (Abb. 14, Reihe 2). Apoptosen (auch ganze Flächen apoptotischer Zellen) und Nekrosen waren ebenfalls häufig zu sehen (Abb. 14, Reihe 3). Zahlreiche Mitosen und ein hoher Ki-67 Proliferationsindex (50-60 %) bildeten die hohe Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore auf histologischer Ebene ab (Abb. 14, Reihe 4 u. 5).

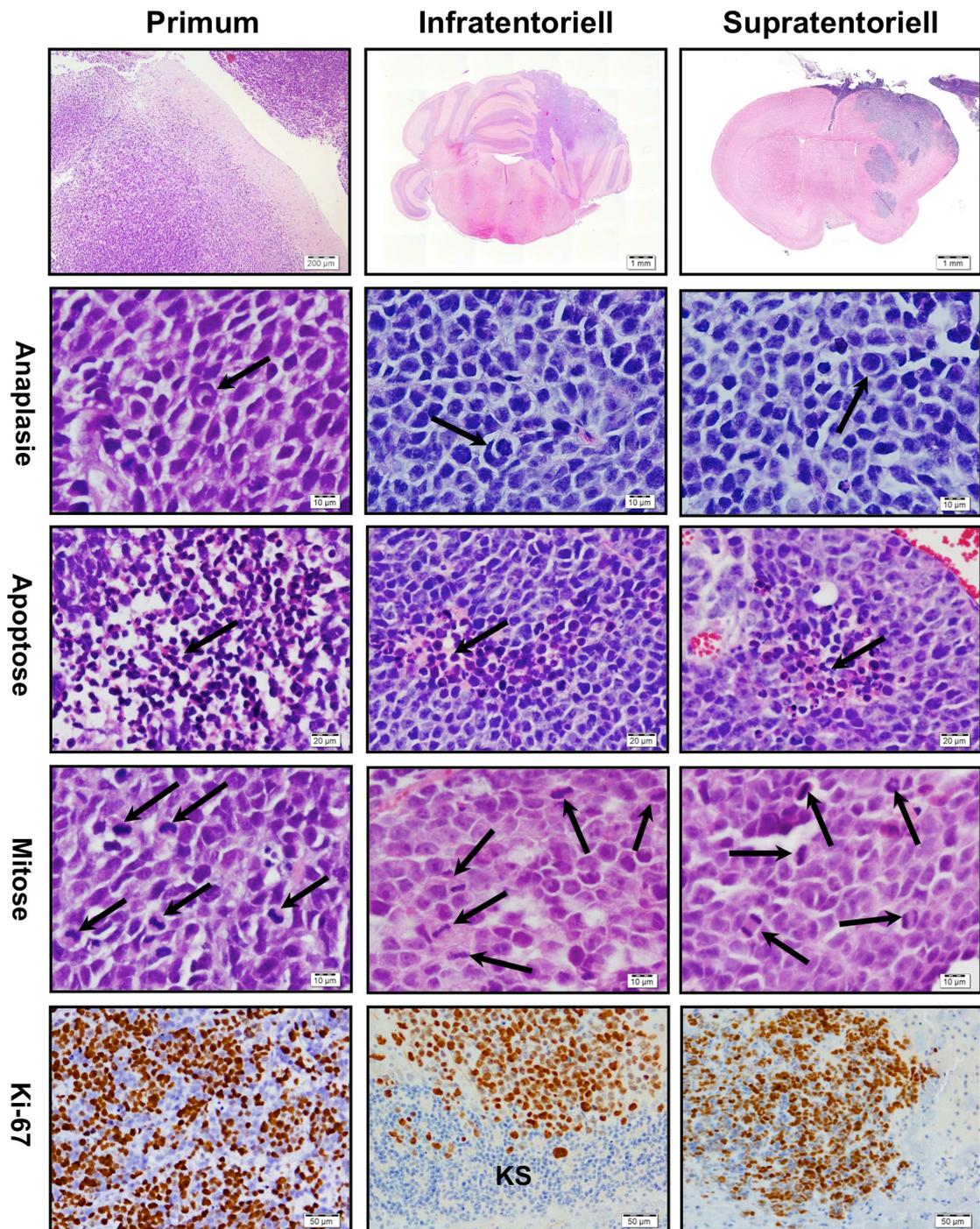


Abb. 14: MB3W1 Xenotransplantate rekapitulieren den Tumor des Patienten.

Die durch infra- (mittlere Spalte) und supratentorielle (rechte Spalte) Inokulation entstandenen MB3W1 Xenotransplantate wurden histologisch (HE und IHC) mit dem Ursprungstumor des Patienten (linke Spalte) verglichen. Reihe 1 (HE): histologische Großansicht. Reihe 2 (HE): Anaplastische Zellmorphologie mit nukleären Angulationen, Einmündungen und typischen cell wrapping Phänomenen (→). Reihe 3 (HE): Flächige Apoptosen (→). Reihe 4 (HE) u. 5 (IHC): Zahlreiche Mitosen (→) und der hohe Anteil Ki-67 positiver Tumorzellen als Ausdruck einer hohen Proliferationsneigung. Körnerzellschicht (KS).

Neben der Expression typischer Stammzellmarker zählt auch die Fähigkeit zur multilineären Differenzierung zu den Kerneigenschaften von Stammzellen. Neuronale Stammzellen können hierbei in Neurone und Gliazellen (vor allem Astrozyten und Oligodendrozyten) differenzieren [88]. Wie die immunhistochemische Aufarbeitung der Tumore zeigte, besitzen auch MB3W1 Zellen diese Eigenschaft. Neben den typischen Stammzellmarkern CD133 und Nestin [93, 94], exprimierten MB3W1 Zellen auch neuronale (Synaptophysin und β III-Tubulin) [95, 96], oligodendrogliale (Olig2) [97, 98] und primitiv astrozytäre Marker (Vimentin) [99] (Abb. 15). Eine reife astrozytäre Differenzierung, angezeigt durch GFAP [100] konnte nicht detektiert werden.

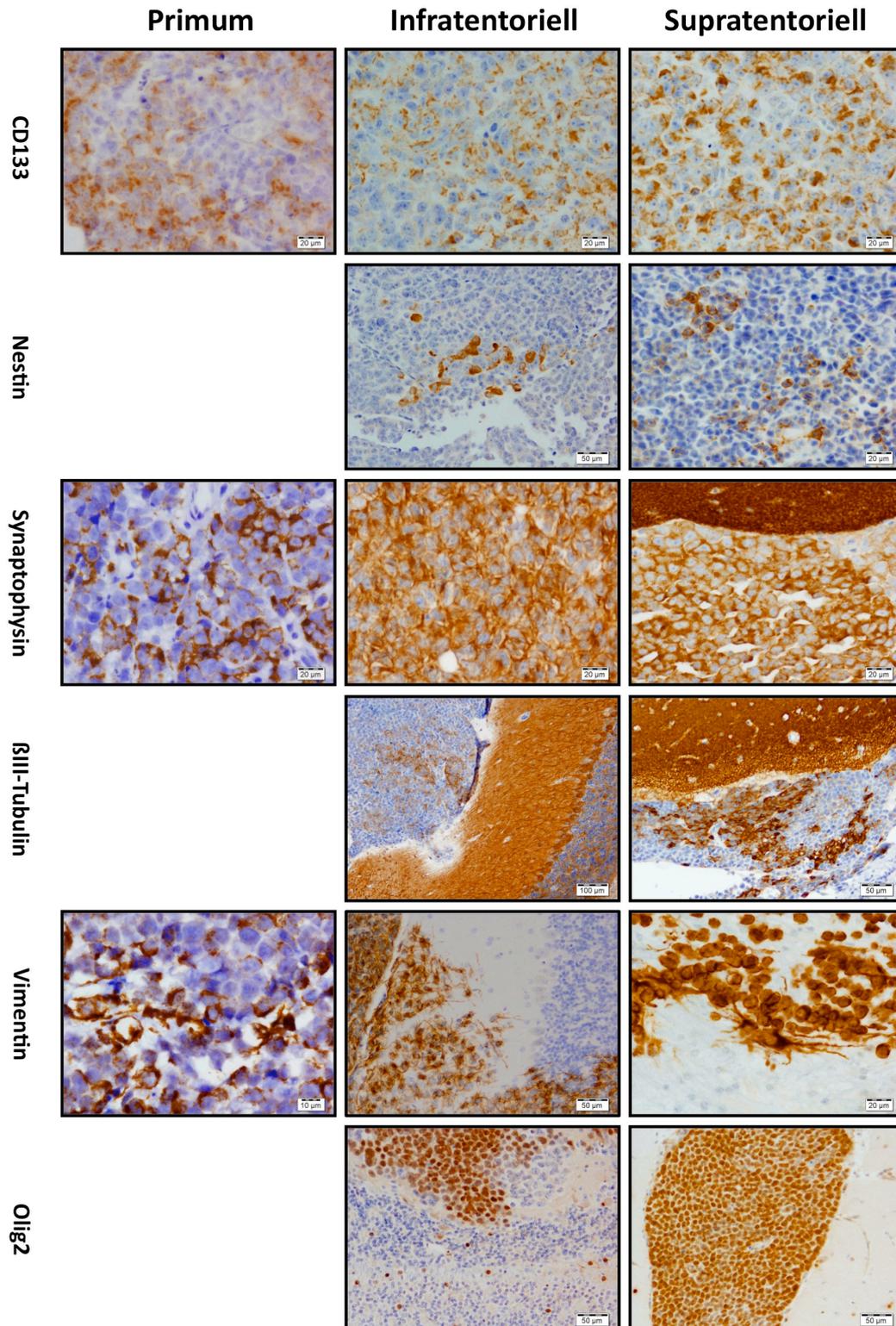


Abb. 15: MB3W1 Zellen zeigen eine multilineäre Differenzierungskapazität in vivo.

Die Differenzierung infra- (mittlere Spalte) und supratentoriell (rechte Spalte) inokulierter MB3W1 Zellen wurden mittels IHC untersucht und mit dem Primärtumor (linke Spalte) verglichen. Da im Falle des Primärtumors nur wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung stand, wurde hier teilweise auf die immunhistochemische Aufarbeitung verzichtet. MB3W1 Zellen exprimieren nicht nur die neuronalen Stammzellmarker CD133 und Nestin, sondern auch neuronale (Synaptophysin u. βIII-Tubulin), primitiv astrozytäre (Vimentin) und oligodendrogliale (Olig2) Marker.

Insgesamt rekapitulierten die Xenotransplantate also sowohl die histopathologischen als auch die immunhistochemischen Eigenschaften des Primärtumors. Die breite Expression linearer Marker unterstreicht die multilineäre Differenzierungskapazität von MB3W1 Zellen, wie sie typischerweise bei Stammzellen beobachtet werden kann. Zu erwähnen bleibt noch, dass der histopathologische Vergleich der Tumore, die aus in SFM und in SCM kultivierten MB3W1 Zellen entstanden waren, keinerlei Unterschiede ergab. Die Tumore glichen sich morphologisch (Anaplasie), biologisch (Mitosen, Apoptosen, Ki-67) und immunhistochemisch (Stammzell- u. Differenzierungsmarker) völlig. Gleiches galt für den histologischen Vergleich der Tumore, die durch Injektion von CD133[±], CD133⁺ und CD133⁻ MB3W1-eGFP/FLuc Zellen induziert wurden. Erstaunlicherweise zeigten alle Tumore (unabhängig vom CD133 Expressionsstatus der primär inokulierten Zellen) am Ende die gleiche diffuse CD133 Expression (Abb. 16). Selbst wenn die Versuchstiere nur ein paar Tage nach Inokulation euthanasiert wurden, färbte sich der Großteil der primär CD133⁻ aufgereinigten Tumorzellen CD133 positiv. Auch die milieugerechte infratentorielle Inokulation und die Transduktion der Zellen mit einem für eGFP und FLuc codierenden lentiviralen Vektor ergab, verglichen mit supratentoriell inokulierten un-transduzierten MB3W1 Tumoren, histopathologisch und immunhistochemisch keinerlei Unterschiede.

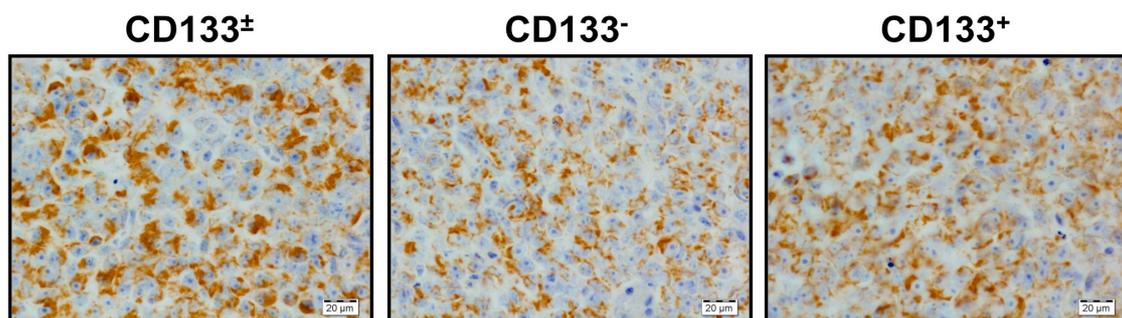


Abb. 16: Vor Xenotransplantation aufgereinigte CD133⁻ und CD133[±] MB3W1 Zellen zeigen in vivo die gleiche CD133 Expression.

Die immunhistochemische Analyse der vor Inokulation CD133 MACS aufgereinigten MB3W1-eGFP/FLuc Zellen zeigte in vivo eine vom initialen CD133 Expressionsstatus unabhängige diffuse CD133 Expression.

MB3W1 Zellen zeigen typische Eigenschaften eines Gruppe 3 Medulloblastoms

Unter den kürzlich identifizierten molekularen Subgruppen besitzen Gruppe 3 Medulloblastome die aggressivste Tumorbilologie. Tumore dieser Gruppe zeigen häufig Merkmale, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, wie etwa eine großzellig/anaplastische Morphologie, Amplifikationen des *MYC* Onkogens, Chromosom 17q Zugewinne und Metastasierung [57]. Auch der Tumor des Patienten und das Tumormodell besitzen diese Gruppe 3 typischen Kennzeichen. So stellte sich der Patient in einem bereits initial zentral disseminierten Stadium vor. Die histologische und molekulargenetische Analyse des Resektats ergab eine anaplastische Morphologie und Amplifikation des *MYC* Onkogens. Das Verhalten des Tumors war derart aggressiv, dass trotz intensiver multimodaler Therapie keine Kontrolle des Tumorstwachstums erreicht werden konnte. Kurz vor dem Tode des Patienten kam es sogar zu einer extrakraniellen Metastasierung in die Pleura beidseits. MB3W1 Zellen rekapitulieren nun die aggressive Biologie des Primärtumors. Die orthotop inokulierten Zellen führten nicht nur zur Formation aggressiver anaplastischer Medulloblastome, die sich durch eine hohe Tumorigenität (100 % Tumorinduktion durch nur 500 Zellen) und ein rapides Wachstum (Versuchsabbruch nach ca. 5 Wochen bei 5×10^4 Zellen) auszeichneten, sondern spiegelte auch die ausgeprägte Invasions- und Metastasierungsneigung des Primärtumors wieder. Gruppe 3 Tumore metastasieren in solch einem hohen Prozentsatz, dass ein hoher Metastasierungsstatus sogar als Surrogatmarker für eine Gruppe 3 Zugehörigkeit diskutiert wird [71]. Gerade die intrinsische Eigenschaft des Medulloblastoms, über die Liquorwege zu disseminieren [5], zählt zu den großen prognostisch relevanten Herausforderungen bei der Therapie dieser Tumore [55, 56]. MB3W1 Zellen reflektierten auch die hohe Metastasierungstendenz des Originaltumors. Bei Versuchsabbruch, wenn die Tumore eine klinisch maximal tolerable Größe erreicht hatten, konnte regelhaft eine Absiedelung der Zellen in den Subarachnoidalraum beobachtet werden (Abb. 17 A u. B). Dieser schien ein geeignetes Milieu zu sein, denn die Zellen

zeigten dort (erkennbar am Ki-67 Index) die gleiche Proliferationsrate wie im Hirngewebe. Die disseminierten Zellen verhielten sich auch infiltrativ und invadierten von der Gehirnoberfläche und den Virchow-Robin Räumen ausgehend wieder in das Hirnparenchym (Abb. 17 C u. D) und setzten so fernab der ursprünglichen Inokulationsstelle solide Metastasen. Versuchstiere, die zu früheren Zeitpunkten (1-2 Wochen nach Inokulation) euthanasiert wurden, zeigten dagegen keine Disseminierung.

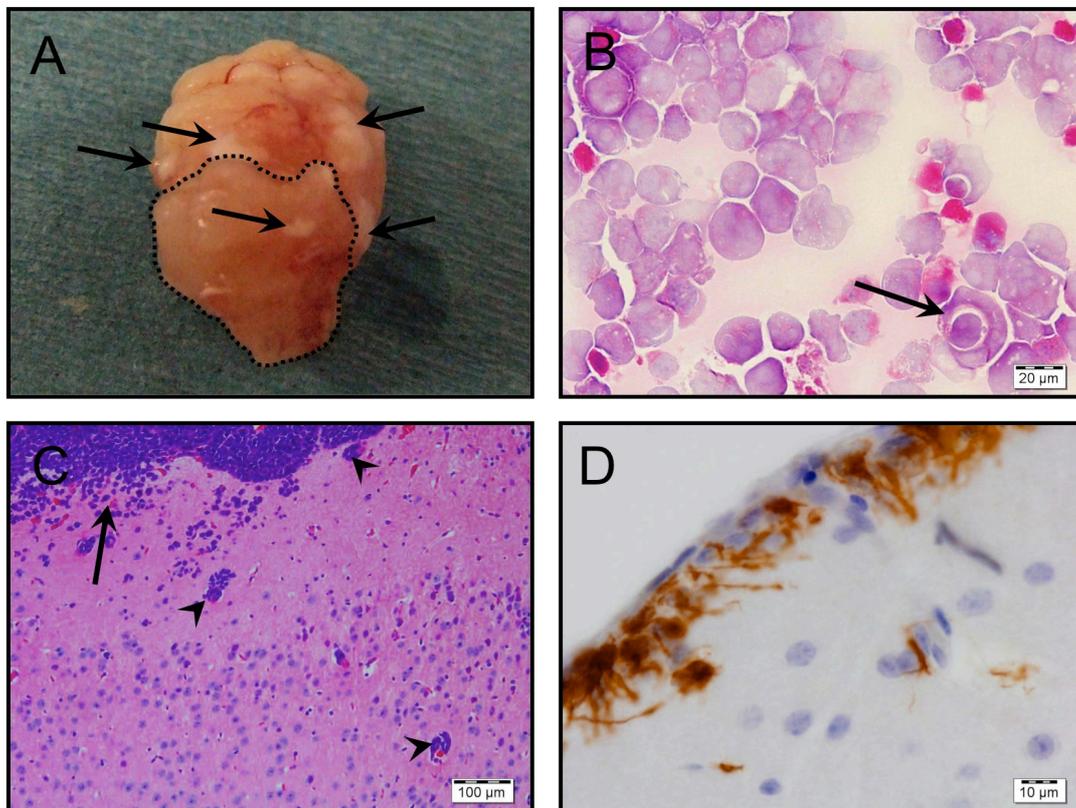


Abb. 17: MB3W1 Zellen rekapitulieren die hohe Metastasierungsneigung des Primärtumors.

(A) Makroskopisch zu erkennender Tumor (gestrichelte Linie) und weißliche meningeotische Auflagerungen (→). (B) HE gefärbtes Zytospinpräparat der meningeotischen Auflagerungen mit massenhaft Tumorzellen und cell wrapping Phänomen (→). (C) Aus dem Subarachnoidalraum (→) und den Virchow-Robin Räumen (▶) invadierende MB3W1 Zellen (HE). (D) MB3W1 Zellfortsätze invadieren aus dem Subarachnoidalraum ins Gehirnparenchym (Vimentinfärbung).

Der derzeitige Goldstandard zur Diagnose eines Gruppe 3 Medulloblastoms ist ein Transkriptionsprofil, das den Tumor zusammen mit anderen Gruppe 3 Tumoren gruppiert [66]. Um MB3W1 Zellen nun sicher in eine der derzeitigen molekularen Subgruppen einordnen zu können, wurden die Zellen (freundlicherweise durch Herrn Dr. Marc Remke, AG Prof. Michael Taylor; University of Toronto) mit Hilfe eines nanoString assays untersucht. Die Expressionsanalyse von 22 validierten Subgruppen-spezifischen Markergenen erlaubt (wie kürzlich beschrieben) eine akkurate Zuordnung zu einer der 4 Subgruppen [81]. Wie erwartet bestätigte sich die Zugehörigkeit zur Gruppe 3. Der assay zeigte eine klare Regulation Gruppe 3 spezifischer Gene in MB3W1 Zellen. Die komparative Analyse früher (<5) und später (>20) in vitro Passagen zeigte nur eine geringe Variation der Genexpression und damit ein stabiles Genexpressionsprofil der Zellen (Abb. 18 A). Da einige Merkmale des Primärtumors (wie Entstehung im Bereich des dorsalen Hirnstammes, Anaplasie, Metastasierung und *MYC* Amplifikation) auch für WNT Medulloblastome beschrieben sind [70], wurde eine für WNT-Medulloblastome charakteristische Aberration des Wnt/ β -Catenin Signalweges zusätzlich noch immunhistochemisch ausgeschlossen (Abb. 18 B), auch wenn der klinische Verlauf des Tumors (vgl. 5-Jahresüberlebensraten von 95 % bei WNT Tumoren [63]) und die Gensignatur der Zellen klar für eine Gruppe 3 Zugehörigkeit argumentierten.

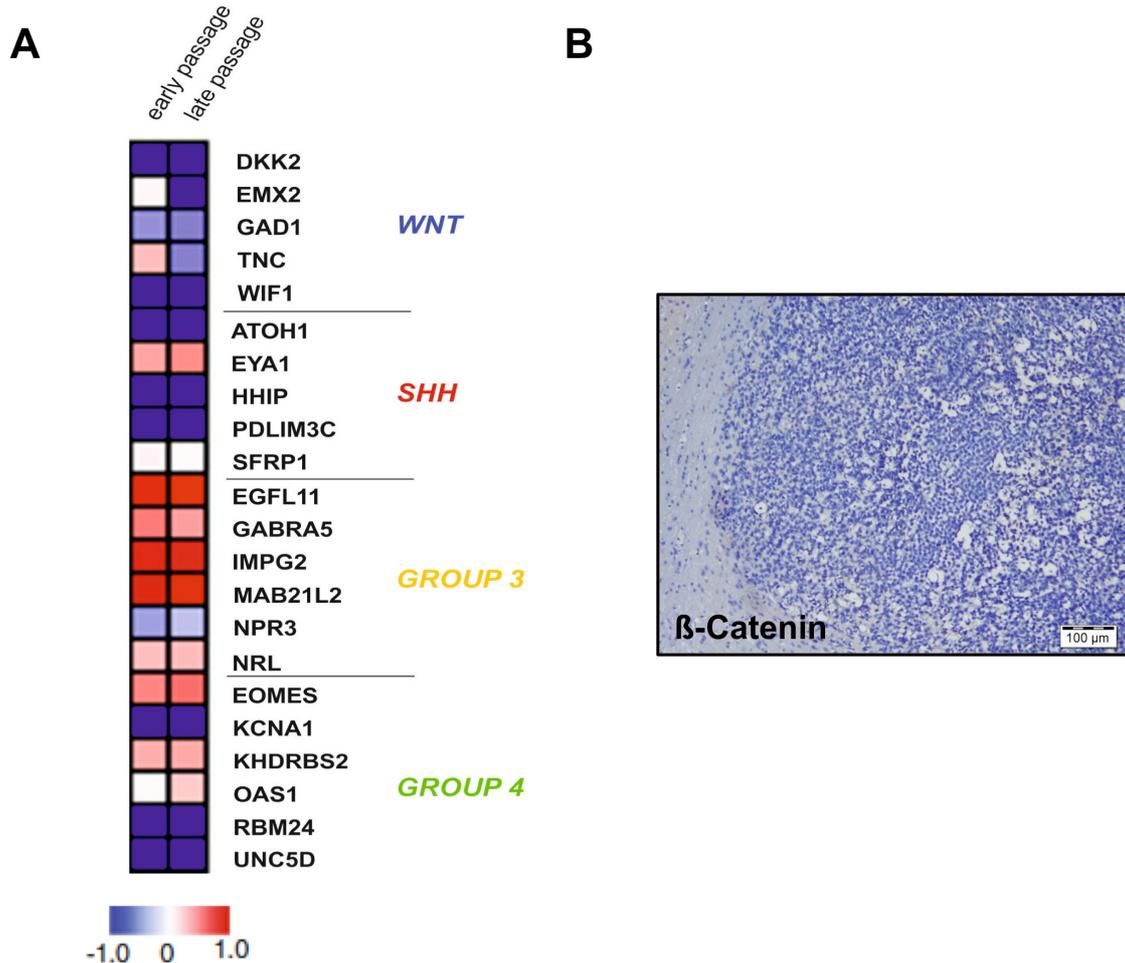


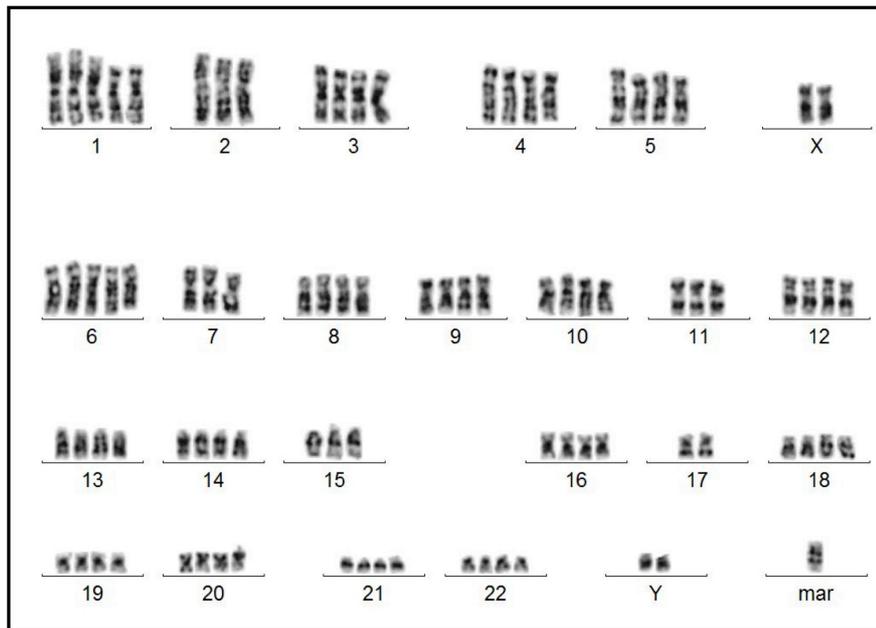
Abb. 18: MB3W1 Zellen zeigen ein Gruppe 3 typisches Expressionsprofil.

(A) Nach RNA Extraktion aus frühen (<5, linke Spalte) und späten (>20, rechte Spalte) MB3W1 in vitro Passagen wurde die Expression von 22 Subgruppen-spezifischen Markergenen mittels nanoString nCounter Technologie untersucht. Der Expressionsstatus wurde durch farbcodierte heatmaps visualisiert (schwächste Expression = dunkelblau, stärkste Expression = dunkelrot). MB3W1 Zellen zeigen hierbei eine stabile Expression validierter Gruppe 3 typischer Markergene (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. med. Marc Remke). (B) WNT Medulloblastome zeigen charakteristischerweise eine nukleäre Akkumulation von β-Catenin [71]. Orthotop inokulierte MB3W1 Zellen hingegen waren, wie zu erwarten, immunhistochemisch β-Catenin negativ.

Nachdem MB3W1 Zellen einer molekularen Subgruppe zugeordnet werden konnten, wurden die Zellen auch noch hinsichtlich genetischer Aberrationen, die typischerweise bei Gruppe 3 Tumoren vorkommen, untersucht. So zeigen Gruppe 3 Medulloblastome im Vergleich zu den übrigen Subgruppen besonders häufig einen genetisch instabilen tetraploiden Chromosomensatz [101] und Chromosom 17q Zugewinne [63]. Um zu überprüfen, ob auch MB3W1 Zellen eine Tetraploidie und Chromosom 17q Zugewinne aufweisen, wurden die

Zellen mittels Karyogramm und Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) untersucht. Die zur FISH Analyse verwendeten Fluoreszenzsonden bestanden aus einer Her2/neu Sonde, die auf Chromosom 17 im Bereich des *ERBB2* Gens (17q11.2-17q12) hybridisiert und einer chromosome enumeration probe (CEP), die am Zentromer von Chromosom 17 (17p11.1-17q11.1) ansetzt. Die zytogenetischen Untersuchungen zeigten, dass MB3W1 Zellen Gruppe 3 typische Genaberrationen tragen. Die angefertigten Karyogramme ergaben einen männlichen tetraploiden Chromosomensatz, der als Zeichen seiner genetischen Instabilität zahlreiche Aberrationen aufwies (Abb. 19 A). Die FISH Analyse der Zellen zeigte nicht nur passend zur Tetraploidie eine Vervielfachung des *ERBB2* Gens, sondern auch eine unbalancierte Vermehrung von Chromosom 17q (Abb. 19 B). Da die Expression von erbB-2 mit einer erhöhten Metastasierungswahrscheinlichkeit und einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein scheint [61, 102-105], wurde im Anschluss überprüft, ob sich die Tetraploidie-bedingte Vervielfältigung des *ERBB2* Gens auch auf Proteinebene niederschlägt. Die immunhistochemische Analyse der Xenotransplantate zeigte jedoch keine Expression des erbB-2 Rezeptors (Abb. 19 B Inlay).

A



B

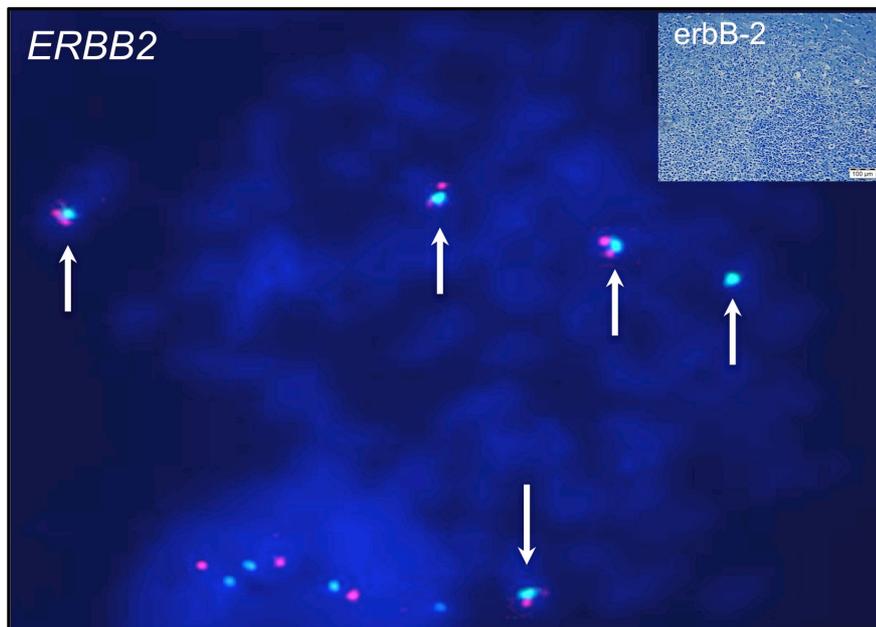


Abb. 19: MB3W1 Zellen zeigen Gruppe 3 typische Genaberrationen.

In SFM kultivierte MB3W1 Zellen wurden durch Colcemid zyklusarretiert und anschließend zytogenetisch analysiert. Zur Karyotypisierung wurden die Chromosomen mittels Giemsa-färbung gebändert. Die FISH erfolgte zur Evaluation von Chromosom 17 mit Hilfe einer rot fluoreszierenden *ERBB2* Sonde (17q11.2-17q12) und einer grün fluoreszierenden chromosome enumeration probe (17p11.1-17q11.1). Die *ERBB2* Expression auf Proteinebene wurde mittels IHC untersucht. **(A)** Männliches Karyogramm mit aberrantem tetraploidem Chromosomensatz. **(B)** FISH: MB3W1 Zellen zeigen eine Verfünffachung der Region 17p11.1-17q11.1 (→, grüne Signale) und damit eine unbalancierte Vermehrung des Chromosoms 17q (bei euploider Chromosomenverdoppelung wären 4 grüne Signale zu erwarten). Trotz Tetraploidie-bedingter Vermehrung des *ERBB2* Gens (8 rote Signale beim Interphasepräparat) zeigen MB3W1 Zellen immunohistochemisch keine erbB-2 Rezeptorexpression in vivo (Inlay).

Amplifikationen des *MYC* Onkogens sowie Alterationen des Tumorsuppressorgens *TP53* sind beim Medulloblastom mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert [51-53, 56-60]. Interessanterweise finden sich *MYC* Amplifikationen fast ausschließlich bei Gruppe 3 Medulloblastomen [63, 66, 71]. Wie Pei et. al in ihrem Gruppe 3 Medulloblastom-Modell zeigen konnten, scheint die Kombination eines aberranten *MYC* und *TP53* Signalweges in der Tumorentstehung ursächlich [72]. *MYC* kann sowohl Proliferation als auch Apoptose induzieren [106]. Da die *MYC* induzierte Apoptose häufig an einen funktionierenden *TP53* Signalweg gekoppelt ist [107], können *TP53* Alterationen den proapoptotischen *MYC* Effekt kompensieren und zu einer gesteigerten Tumorzellproliferation führen [72]. Um zu überprüfen, ob diese Pathomechanismen auch bei MB3W1 Zellen eine Rolle spielen, wurden die beiden Signalwege nochmals genauer untersucht. Die erneute FISH Analyse bestätigte die schon während der Initialdiagnostik im Primärtumor nachgewiesene Amplifikation des *MYC* Onkogens auch in MB3W1 Zellen (Abb. 20 A). Ein Bruch in der das *MYC* Gen tragenden Region 8q24 mit konsekutivem Rearrangement dieses Chromosomenabschnitts konnte nicht festgestellt werden (Abb. 20 B). Die sich anschließende immunhistochemische Untersuchung des *TP53* Signalweges zeigte passenderweise eine Akkumulation des Tumorproteins p53 und damit eine Aberration der *TP53* Funktion (Abb. 20 C). Eine wie von Pei et al. beschriebene kausale Rolle beider Signalwege scheint also auch für MB3W1 Zellen möglich.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse bleibt also festzuhalten, dass MB3W1 Zellen, über die fundamentalen Charakteristika hinausgehend, eine Vielzahl typischer Gruppe 3 Kennzeichen besitzen.

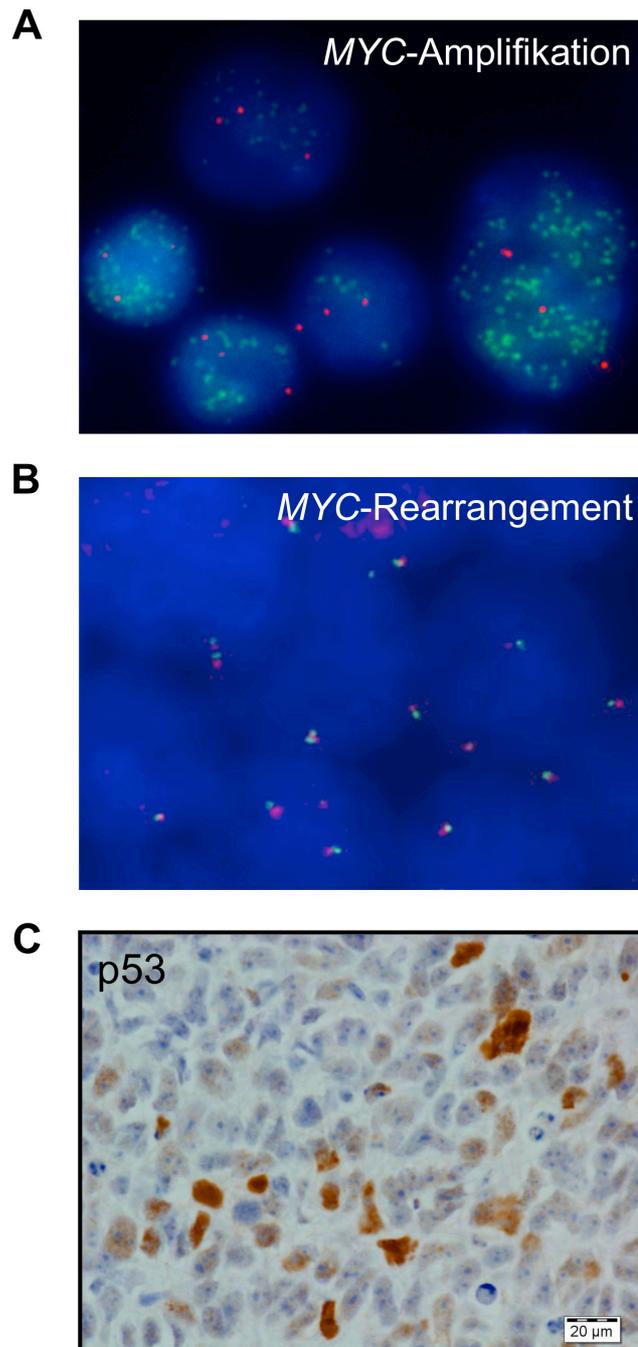


Abb. 20: MB3W1 Zellen tragen sowohl eine Amplifikation des MYC Gens als auch eine Aberration des TP53 Signalweges.

(A) Der MYC Status von MB3W1 Zellen wurde mittels FISH evaluiert. Bei euploidem Chromosomensatz und normalem MYC Befund sollten pro Zelle jeweils zwei CEP 8 Signale (chromosome enumeration probe = rot) und zwei MYC Signale (MYC Sonde = grün) nachzuweisen sein. Während die CEP 8 Sonde eine aneuploide Vermehrung von Chromosom 8 (3 Chromosomen 8 pro Zelle) ergab, zeigte die MYC Sonde eine massive Amplifikation des MYC Onkogens in MB3W1 Zellen (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Marc Remke). (B) Die Region 8q24 wurde mit einer zentromerisch (rote Sonde) und einer telomerisch (grüne Sonde) des MYC Gens ansetzenden FISH Sonde auf Bruchereignisse untersucht. Bei intakter bruchfreier Region 8q24 liegen das rote und das grüne SONDENSIGNAL in engem Kontakt. Ein Bruch der Region mit konsekutivem Rearrangement des MYC Gens konnte bei MB3W1 Zellen somit ausgeschlossen werden. (C) Die Akkumulation des Tumorproteins p53 in MB3W1 Xenotransplantaten ist Surrogat eines gestörten TP53 Signalweges (IHC).

3.5. Diskussion

Die Klassifikation des Medulloblastoms ist seit einigen Jahren einem außerordentlichen Wandel unterworfen. Nach der Herauslösung des Medulloblastoms aus dem PNET-Konzept und der Anerkennung als eigenständige Tumorentität in der WHO Klassifikation 2000, folgte 2007 die Festlegung der derzeit anerkannten histomorphologischen Varianten [68]. Neue Genexpressionsstudien haben nun vier molekulare Hauptgruppen (WNT, SHH, Gruppe 3 und Gruppe 4) identifiziert, die sich sowohl in ihren klinischen als auch histopathologischen Eigenschaften unterscheiden [66]. Über Gruppe 3 Medulloblastome, die mit Abstand die schlechteste klinische Prognose besitzen, ist derzeit wenig bekannt, nicht zuletzt deshalb, weil ein signifikanter Mangel an geeigneten Tumormodellen besteht. Aktuell existieren lediglich zwei syngene Mausmodelle, die diesen Subtyp rekapitulieren. Beide beruhen auf einer genetisch manipulierten Myc Überexpression in cerebellären Stamm-/Precursorzellen, die in Kombination mit einer p53 Blockade zur Formation großzellig/anaplastischer Medulloblastome führt [72, 73].

Das MB3W1 Medulloblastom-Modell ist ein valides (unmanipuliertes) Gruppe 3 Xenograftmodell

Das im Zuge dieser Arbeit etablierte orthotope Xenograftmodell komplementiert die beiden derzeitigen Gruppe 3 Modelle, da es ohne zusätzliche genetische Manipulation zu äußerst aggressiven humanen Gruppe 3 Medulloblastomen führt. Die einzige Modifikation der Zellen (die lentivirale Transduktion mit eGFP und FLuc) diente dem besseren in vivo „Monitoring“, war optional und veränderte auch das biologische Verhalten der Zellen nicht. Das MB3W1 Medulloblastom-Modell rekapituliert nicht nur die fundamentalen histologischen, biologischen und genetischen Kennzeichen von Gruppe 3 Medulloblastomen, sondern zeigt auch darüber hinaus wichtige Eigenschaften,

die bei dieser Subgruppe häufig zu finden sind. So zeigen beispielsweise, wie bei Gruppe 3 Tumoren häufig [66], auch MB3W1 Zellen in vivo eine ausgeprägte anaplastische Morphologie. Die Amplifikation des *MYC* Onkogens, die beinahe auf Gruppe 3 Tumore beschränkt ist [66], und das genetische Profil ordnen MB3W1 Zellen klar in Subgruppe 3 ein. Das Genexpressionsmuster, welches mittels nanoString assay evaluiert wurde, gruppiert die Zelllinie eindeutig mit anderen Mitgliedern dieser Subgruppe, was als Goldstandard für die Identifizierung eines Gruppe 3 Medulloblastoms angesehen wird [66]. Zusätzlich zeigen MB3W1 Zellen weitere subgruppenspezifische genetische Merkmale, wie einen instabilen tetraploiden Chromosomensatz [101] und Chromosom 17q Zugewinne [63]. Die immunhistochemisch nachgewiesene Alteration der *TP53* Funktion könnte für eine kausale Verbindung der *MYC* und *TP53* Signalwege sprechen. Detaillierte Untersuchungen beider Signaltransduktionswege müssen noch klären, ob die von Pei et al. künstlich gekoppelten aberranten *MYC* und *TP53* Wege [72], auch bei MB3W1 Zellen für die Tumorentstehung ursächlich sind. Während die Abstammung von WNT und SHH Medulloblastomen bekannt ist [66], bleibt die Frage nach der Ursprungszelle, die zu einem Gruppe 3 Medulloblastom führt, vorerst kontrovers. Offensichtlich können Zellen verschiedener Hirnkompartimente zu einem Gruppe 3 Medulloblastom führen. Während bei Pei et al. cerebelläre CD133⁺ Zellen der weißen Substanz als Ursprungszellen fungierten [72], verwendeten Kawauchi et al. in ihrem Modell granule neuron precursors [73]. Im Fall von MB3W1 Zellen spricht die Lokalisation des Primärtumors dafür, dass Zellen des dorsalen Hirnstamms Ursprung des Tumors waren. Um dies zu validieren, sind jedoch weitere Untersuchungen wie etwa komparative Genexpressions- und Signaltransduktionsanalysen nötig. Neben diesen fundamentalen Gruppe 3 Kennzeichen, ist die wohl wichtigste Eigenschaft des Modells jedoch, dass es das aggressive und disseminierende Verhalten, welches humane Gruppe 3 Medulloblastome auszeichnet [71], biologisch rekapituliert. In vivo zeigen MB3W1 Zellen nicht nur ein extrem rapides Wachstum, auch die Inokulation von nur 500 Zellen war ausreichend, um bei 100 % der Versuchstiere Tumore zu induzieren, was die hohe Tumorigenität

der Zellen unterstreicht. Wie vor allem für Gruppe 3 Tumore typisch [66], besitzen MB3W1 Zellen eine hohe Neigung, über die Liquorwege zu metastasieren. Am Versuchsende konnten regelhaft subarachnoidale Absiedelungen von MB3W1 Zellen beobachtet werden. Inwieweit sich das Modell auch zur Erforschung von Metastasierungsmechanismen eignet, ist ohne weitere Studien derzeit noch nicht abschließend zu beurteilen, da eine Kontamination des Liquorraumes bei der Tumorzellinjektion Technik-bedingt zwar äußerst unwahrscheinlich ist, jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden kann. Für eine nichtartifizielle Metastasierung sprechen, dass diese zum einen immer nur gegen Ende der Versuche, wenn die Tumore eine gewisse Größe erreicht hatten, auftrat und zum anderen im GL261-FLuc Modell, bei dem die Zellen unter den gleichen Kautelen inokuliert wurden, nicht zu beobachten war. Auf jeden Fall muss jedoch die Neigung der Zellen, aus dem Liquorraum erneut ins Hirnparenchym zu invadieren, als intrinsische Eigenschaft angesehen werden, was das Modell schon jetzt äußerst attraktiv macht.

MB3W1 Zellen besitzen zahlreiche Tumorstammzell-eigenschaften

Trifft für das MB3W1 Modell die Tumorstammzellhypothese zu? Zahlreiche Aspekte sprechen dafür, MB3W1 Zellen als Tumorstammzellen anzusehen: Neben funktionellen Eigenschaften wie einer hohen ALDH Expression [91, 92], der Formation von Neurosphären und einer exponentiellen Langzeitproliferation in vitro [86, 88, 89], besitzen MB3W1 Zellen charakteristischerweise auch eine äußerst hohe Tumorigenität bei Inokulation in immuninkompetente NOD/SCID Mäuse (100 % Tumorraten bei Injektion von nur 500 Zellen). Die induzierten Tumore rekapitulieren exakt die histopathologischen Eigenschaften des Primärtumors, wie für Tumorstammzellen typisch [87]. Die Tatsache, dass MB3W1 Zellen in vivo eine multilineäre Differenzierung zeigen, ist als weiteres Stammzellkennzeichen zu werten [88]. Die Expression der Oberflächenmarker CD15 [82-85] und CD133 [86, 87] ist ebenfalls suggestiv für

Tumorstammzelleigenschaften. Welcher Marker Tumorstammzellen korrekt definiert, wird derzeit kontrovers diskutiert [78, 82-87, 90, 108-111]. CD133 alleine scheint im Falle von MB3W1 Zellen kein essentieller Surrogatmarker zu sein. Die tumorigenen Eigenschaften zeigten sich unabhängig vom CD133 Status der Zellen und auch die ALDH Aktivität korrelierte nicht mit der Expression von CD133. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die zeigen, dass auch CD133⁻ Zellen Tumorstammzelleigenschaften besitzen können [83, 112]. Die Identifikation eines geeigneten Tumorstammzellmarkers wird noch weitere Versuche benötigen und bleibt vorerst unbeantwortet.

Conclusio

Das im Zuge dieser Arbeit etablierte Medulloblastom-Modell ist ein valides Gruppe 3 Medulloblastom-Modell mit Tumorstammzelleigenschaften. Es stellt ein neues, gut reproduzierbares und genetisch unmanipuliertes Xenograftmodell dar, das die gleichzeitige Untersuchung von Tumorstammzell- und Gruppe 3-Eigenschaften in nur einem Ansatz erlaubt. Vor allem vor dem Hintergrund des außergewöhnlichen klinischen Verlaufs des Primärtumors (Rezidiv mit extrakranieller Metastasierung) ist es ein extrem wertvolles Werkzeug zur Erforschung dieses aggressiven Subtyps. In Zukunft wird es hoffentlich helfen, neue effektivere und weniger toxische Therapiestrategien zu entwickeln.

3.6. Anhang

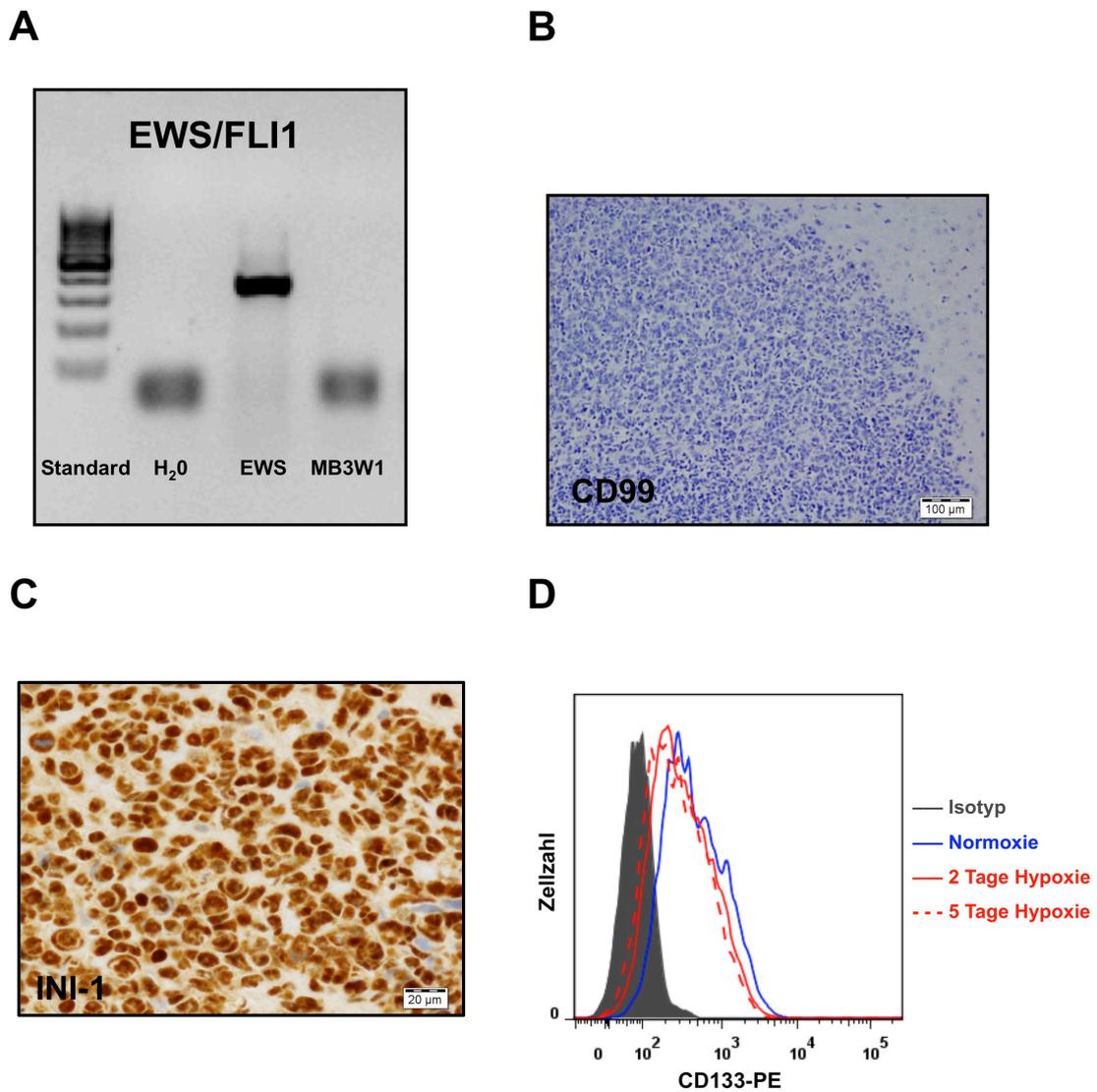
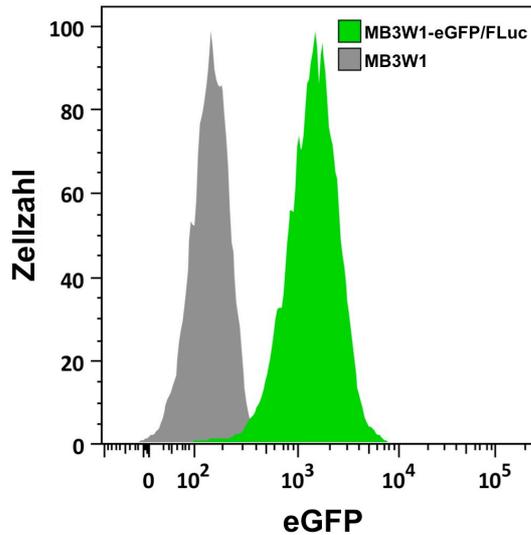
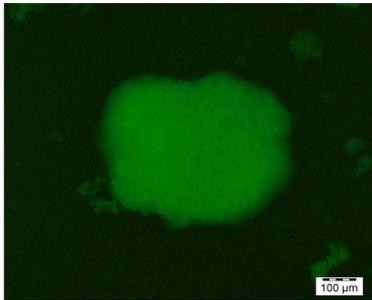


Abb. 21: Differentialdiagnostische Abgrenzung und CD133 Expression unter Hypoxie.

(A) Mittels PCR wurde das Vorliegen eines für pNET charakteristischen EWS/FLI1 Fusionsproduktes in MB3W1 Zellen ausgeschlossen. Als Kontrollen wurden Wasser und ein Ewing Sarkom (EWS) mit bekannter Aberration mitgeführt. (B) Bei fehlender CD99 Expression konnte MB3W1 Zellen auch immunhistochemisch gegen einen pNET abgegrenzt werden. (C) Eine erhaltene INI-1 Expression in MB3W1 Zellen schloss das Vorliegen eines ATRT immunhistochemisch aus. (D) Um einen Einfluss der Sauerstoffspannung auf die CD133 Expression auszuschließen, wurden MB3W1 Zellen *in vitro* auch unter hypoxischen Bedingungen (2 % O₂) kultiviert. Die durchflusszytometrische Analyse ergab eine vom Sauerstoffgehalt unabhängige CD133 Expression der Zellen *in vitro*.

A



B

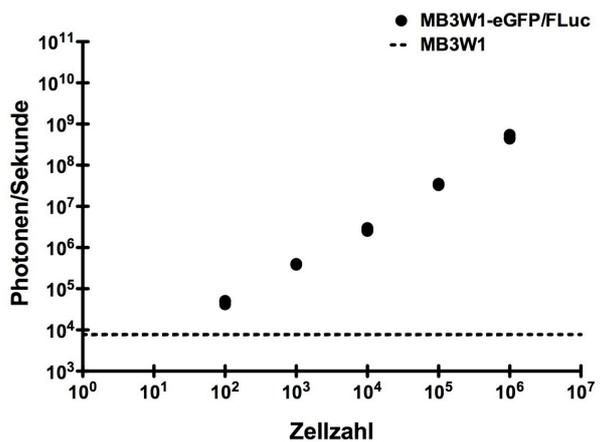
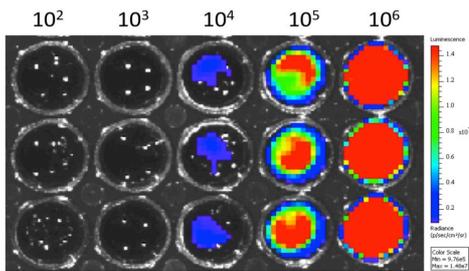


Abb. 22: Transduzierte MB3W1 Zellen (MB3W1-eGFP/FLuc) exprimieren eGFP und FLuc.

MB3W1 Zellen wurden mit einem für eGFP und FLuc codierenden Vector lentiviral transduziert und vor ihrer Verwendung zweimal nach ihrer eGFP Expression mittels FACS „aufgereinigt“. **(A)** Die Analyse der transduzierten und aufgereinigten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie (linkes Bild) und Durchflusszytometrie (rechtes Bild) zeigt eine eindeutige Expression von eGFP. **(B)** Zur Evaluation der FLuc Expression nach Transduktion und Aufreinigung wurden verschiedene Konzentrationsstufen (10^2 - 10^6) der Zellen mittels Verdünnungsreihe hergestellt. 2 min nach Hinzugabe von D-Luciferin wurden die einzelnen Konzentrationsstufen triplikatweise mittels BLI vermessen. Die regressionsanalytisch ($R^2=0,99$; $n=15$) interpolierte Photonemission einer einzelnen Zelle betrug durchschnittlich 483 Photonen/Sekunde. Zur Festlegung des Hintergrundsignals wurden untransduzierte MB3W1 Zellen mitgeführt.

4. Zusammenfassung

Gehirntumore stellen die zweithäufigste Tumorart im Kindesalter dar. Trotz zahlreicher medizinischer Fortschritte verstirbt auch heute noch ca. 1/3 der Betroffenen und die Überlebenden leiden häufig unter geistigen und körperlichen Langzeitfolgen [1, 2]. Zwei Entitäten, die auch heute noch zu den großen Herausforderungen der pädiatrischen Onkologie zählen, sind das Glioblastom und das Medulloblastom. Um beide Tumorarten weiter erforschen und neue Therapiekonzepte entwickeln zu können, wurden im Zuge dieser Arbeit zwei orthotope Mausmodelle etabliert: ein syngenes Glioblastom- und ein xenogenes Medulloblastom-Modell:

GL261-FLuc Glioblastom-Modell

Das Glioblastom ist ein seltener Tumor im Kindesalter. Die extrem schlechte Prognose macht neue Behandlungsstrategien jedoch dringend erforderlich [6, 7]. Immuntherapien könnten hier ein rationaler Ansatz sein [21]. Durch orthotope Inokulation lentiviral transduzierter GL261-FLuc Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit das syngene GL261 Modell etabliert und hinsichtlich seiner biomorphologischen und immunologischen Eigenschaften evaluiert: Ähnlich wie humane Glioblastome zeigen GL261-FLuc Zellen in vivo ein aggressives Wachstum, welches von einer schnellen Proliferation und deutlichen Invasionsneigung geprägt ist. Histologisch bestehen GL261-FLuc Tumore aus astrozytär differenzierten Zellen, die neben typischen Nekrosen auch eine starke, funktionell pathologische Vaskularisierung zeigen. Interessanterweise offenbarte das in vivo BLI nach orthotoper Inokulation eine Phase der „Tumoradaptation“ (Tag 6-14), die immunologischer Natur zu sein scheint. Die Tatsache, dass das Tumorwachstum wie beim Menschen in einer prinzipiell immunkompetenten Umgebung stattfindet und dass GL261-FLuc Zellen eine konstitutionelle und durch IFN γ stimulierbare MHC Klasse I

Expression aufweisen, qualifiziert das Modell für immuntherapeutische Untersuchungen. Insgesamt handelt es sich nicht nur um ein gut voraussag- und reproduzierbares Modell, das die immunologischen und biomorphologischen Kennzeichen des humanen Vorbildes suffizient rekapituliert, sondern es liefert auch dank der Möglichkeit, das Zellwachstum mittels BLI zu verfolgen, interessante Einblicke in das in vivo Verhalten der Zellen.

MB3W1 Medulloblastom-Modell

Das Medulloblastom ist der häufigste maligne Gehirntumor des Kindesalters [1] und kann, wie neue Genexpressionsstudien zeigen, in verschiedene molekulare Subgruppen unterteilt werden [66]. Für Gruppe 3 Medulloblastome, die mit Abstand die schlechteste klinische Prognose besitzen, gibt es aktuell nur limitierte Daten, unter anderem auch deshalb, weil kaum geeignete Mausmodelle existieren. Der außergewöhnliche Fall eines zweijährigen Jungen, der an einem äußerst aggressiven anaplastischen Medulloblastom verstorben war, führte zur Etablierung des zweiten Hirntumormodells. Mit Zellen dieses Tumors (MB3W1 Zellen), die nach extrakranieller Metastasierung aus malignen Pleuraergüssen isoliert werden konnten, wurde ein orthotopes Xenograftmodell etabliert. Erstaunlicherweise ließen die Zellen sowohl Tumorstammzell- als auch Gruppe 3-Charakteristika erkennen: In vitro wachsen MB3W1 Zellen wie für Stammzellen typisch in Form von Neurosphären und zeigen neben der Fähigkeit zur exponentiellen Langzeitproliferation auch eine hohe ALDH Aktivität. Die Expression typischer Oberflächenmarker wie CD15 und CD133 ist ebenfalls suggestiv für Tumorstammzeleigenschaften. Die hohe Tumorigenität von MB3W1 Zellen in immuninkompetenten Mäusen (bereits 500 Zellen führten zu 100 % Tumorraten) ist neben der Tatsache, dass die induzierten Tumore exakt die histopathologischen Eigenschaften des Primärtumors rekapitulierten und eine multilineäre Differenzierung zeigten, als weiteres Stammzellkennzeichen zu werten. Ergänzend zum genetischen Profil (MYC Amplifikation, Gruppe 3 spezifisches Genexpressionsmuster, Tetraploidie, 17q Zugewinne), das MB3W1 Zellen klar als Gruppe 3 Medulloblastom identifiziert, spiegeln

MB3W1 Zellen auch das aggressive und disseminierende Verhalten, welches Gruppe 3 Tumore auszeichnet, wider. Die Xenotransplantate zeigten nicht nur ein rapides invasives Wachstum in vivo, sondern es konnte interessanterweise auch am Versuchsende regelhaft eine Metastasierung der Zellen in den zerebrospinalen Liquor beobachtet werden. Das im Zuge dieser Arbeit etablierte Xenograftmodell komplementiert die beiden einzigen derzeit veröffentlichten syngenesischen Gruppe 3 Modelle, da es im Gegensatz zu diesen ohne zusätzliche genetische Manipulation auskommt. Die einzige Modifikation der Zellen (die lentivirale Transduktion mit eGFP und FLuc) diente dem besseren in vivo „Monitoring“, war optional und veränderte auch das biologische Verhalten der Zellen nicht. Insgesamt ist es ein einfaches und gut reproduzierbares Tumormodell, das die gleichzeitige Erforschung von Tumorstammzell- und Gruppe 3-Eigenschaften erlaubt. Vor allem vor dem Hintergrund des außergewöhnlichen klinischen Verlaufs des Primärtumors ist es ein extrem wertvolles Werkzeug, das in Zukunft hoffentlich dazu beitragen wird, neue gezielte Therapiestrategien für die Behandlung solcher aggressiver Tumore entwickeln zu können.

5. Literaturverzeichnis

1. Rickert CH, Paulus W. Epidemiology of central nervous system tumors in childhood and adolescence based on the new WHO classification. *Childs Nerv Syst.* 2001;17:503-511.
2. Peris-Bonet R, Martínez-García C, Lacour B et al. Childhood central nervous system tumours—incidence and survival in Europe (1978–1997): report from Automated Childhood Cancer Information System project. *European Journal of Cancer.* 2006;42:2064-2080.
3. Kaatsch P. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer treatment reviews.* 2010;36:277-285.
4. Anderson DM, Rennie KM, Ziegler RS, Neglia JP, Robison LR, Gurney JG. Medical and neurocognitive late effects among survivors of childhood central nervous system tumors. *Cancer.* 2001;92:2709-2719.
5. Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W. WHO classification of tumours of the central nervous system. Lyon: IARC Press; 2007:309.
6. Kaatsch P, Rickert CH, Kuhl J, Schuz J, Michaelis J. Population-based epidemiologic data on brain tumors in German children. *Cancer.* 2001;92:3155-3164.
7. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol.* 2012;14 Suppl 5:v1-49.
8. Pfister S, Witt O. Pediatric gliomas. *Gliomas.* Springer; 2009. p. 67-81.
9. Broniscer A, Gajjar A. Supratentorial high-grade astrocytoma and diffuse brainstem glioma: two challenges for the pediatric oncologist. *Oncologist.* 2004;9:197-206.
10. Sturm D, Bender S, Jones DT et al. Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer.* 2014;14:92-107.

11. Sung T, Miller DC, Hayes RL, Alonso M, Yee H, Newcomb EW. Preferential inactivation of the p53 tumor suppressor pathway and lack of EGFR amplification distinguish de novo high grade pediatric astrocytomas from de novo adult astrocytomas. *Brain Pathol.* 2000;10:249-259.
12. Pollack IF, Finkelstein SD, Burnham J et al. Age and TP53 mutation frequency in childhood malignant gliomas: results in a multi-institutional cohort. *Cancer Res.* 2001;61:7404-7407.
13. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007;170:1445-1453.
14. Pollack IF, Finkelstein SD, Woods J et al. Expression of p53 and prognosis in children with malignant gliomas. *New England Journal of Medicine.* 2002;346:420-427.
15. Pollack IF, Hamilton RL, James CD et al. Rarity of PTEN deletions and EGFR amplification in malignant gliomas of childhood: results from the Children's Cancer Group 945 cohort. *J Neurosurg.* 2006;105:418-424.
16. Antonelli M, Massimino M, Morra I et al. Expression of pERK and pAKT in pediatric high grade astrocytomas: Correlation with YKL40 and prognostic significance. *Neuropathology.* 2012;32:133-138.
17. Pollack IF, Hamilton RL, Burger PC et al. Akt activation is a common event in pediatric malignant gliomas and a potential adverse prognostic marker: a report from the Children's Oncology Group. *J Neurooncol.* 2010;99:155-163.
18. Gadner H, Gaedike G, Niemeyer C, Ritter J. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie.* Heidelberg: Springer; 2006:1228.
19. Atkins RJ, Ng W, Stylli SS, Hovens CM, Kaye AH. Repair mechanisms help glioblastoma resist treatment. *J Clin Neurosci.* 2014
20. Duffner PK, Horowitz ME, Krischer JP et al. Postoperative chemotherapy and delayed radiation in children less than three years of age with malignant brain tumors. *N Engl J Med.* 1993;328:1725-1731.
21. Rosenberg SA. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer- what clinicians need to know. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8:577-585.

22. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V et al. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol.* 2002;168:4772-4780.
23. Wischhusen J, Friese MA, Mittelbronn M, Meyermann R, Weller M. HLA-E protects glioma cells from NKG2D-mediated immune responses in vitro: implications for immune escape in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64:523-528.
24. Fecci PE, Mitchell DA, Whitesides JF et al. Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res.* 2006;66:3294-3302.
25. Heimberger AB, Abou-Ghazal M, Reina-Ortiz C et al. Incidence and prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in human gliomas. *Clin Cancer Res.* 2008;14:5166-5172.
26. Schneider T, Sailer M, Ansorge S, Firsching R, Reinhold D. Increased concentrations of transforming growth factor beta1 and beta2 in the plasma of patients with glioblastoma. *J Neurooncol.* 2006;79:61-65.
27. Maes W, Deroose C, Reumers V et al. In vivo bioluminescence imaging in an experimental mouse model for dendritic cell based immunotherapy against malignant glioma. *J Neurooncol.* 2009;91:127-139.
28. Maes W, Van Gool SW. Experimental immunotherapy for malignant glioma: lessons from two decades of research in the GL261 model. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 2011;60:153-160.
29. Maes W, Rosas GG, Verbrinnen B et al. DC vaccination with anti-CD25 treatment leads to long-term immunity against experimental glioma. *Neuro Oncol.* 2009;11:529-542.
30. Ardon H, De Vleeschouwer S, Van Calenbergh F et al. Adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for children with malignant brain tumours. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;54:519-525.
31. De Vleeschouwer S, Fieuws S, Rutkowski S et al. Postoperative adjuvant dendritic cell-based immunotherapy in patients with relapsed glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res.* 2008;14:3098-3104.

32. Schlegel PG, Eyrich M, Kramm C, van Gool S. Tumor vaccination for high-grade glioma. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55:1437.
33. Newcomb EW, Zagzag D. The murine GL261 glioma experimental model to assess novel brain tumor treatments. *CNS Cancer*. Springer; 2009. p. 227-241.
34. Zagzag D, Salnikow K, Chiriboga L et al. Downregulation of major histocompatibility complex antigens in invading glioma cells: stealth invasion of the brain. *Lab Invest*. 2005;85:328-341.
35. Yang I, Kremen TJ, Giovannone AJ et al. Modulation of major histocompatibility complex class I molecules and major histocompatibility complex-bound immunogenic peptides induced by interferon- α and interferon- γ treatment of human glioblastoma multiforme. *Journal of neurosurgery*. 2004;100:310-319.
36. Burger PC, Scheithauer BW. *Tumors of the Central Nervous System*. Washington DC: American Registry of Pathology; 2007:596.
37. MacDonald TJ, Aguilera D, Kramm CM. Treatment of high-grade glioma in children and adolescents. *Neuro Oncol*. 2011;13:1049-1058.
38. Grauer OM, Wesseling P, Adema GJ. Immunotherapy of diffuse gliomas: biological background, current status and future developments. *Brain Pathol*. 2009;19:674-693.
39. Petkova SB, Yuan R, Tsaih SW, Schott W, Roopenian DC, Paigen B. Genetic influence on immune phenotype revealed strain-specific variations in peripheral blood lineages. *Physiol Genomics*. 2008;34:304-314.
40. Zagzag D, Amirnovin R, Greco MA et al. Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis. *Lab Invest*. 2000;80:837-849.
41. Lapidot T, Fajerman Y, Kollet O. Immune-deficient SCID and NOD/SCID mice models as functional assays for studying normal and malignant human hematopoiesis. *J Mol Med (Berl)*. 1997;75:664-673.

42. De Vleeschouwer S, Van Gool SW, Van Calenbergh F. Immunotherapy for malignant gliomas: emphasis on strategies of active specific immunotherapy using autologous dendritic cells. *Childs Nerv Syst.* 2005;21:7-18.
43. Smith KE, Fritzell S, Badn W et al. Cure of established GL261 mouse gliomas after combined immunotherapy with GM-CSF and IFN γ is mediated by both CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T-cells. *Int J Cancer.* 2009;124:630-637.
44. Szatmári T, Lumniczky K, Désaknai S et al. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer science.* 2006;97:546-553.
45. Zhang JG, Kruse CA, Driggers L et al. Tumor antigen precursor protein profiles of adult and pediatric brain tumors identify potential targets for immunotherapy. *Journal of neuro-oncology.* 2008;88:65-76.
46. Insug O, Blaszczyk-Thurin M, Shen CT, Ertl HCJ. A DNA vaccine expressing tyrosinase-related protein-2 induces T-cell-mediated protection against mouse glioblastoma. *Cancer gene therapy.* 2003;10:678-688.
47. Prins RM, Odesa SK, Liao LM. Immunotherapeutic targeting of shared melanoma-associated antigens in a murine glioma model. *Cancer Res.* 2003;63:8487-8491.
48. Kaatsch P, Spix C. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2012 (1980-2012). Mainz: Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz; 2013
49. Massimino M, Giangaspero F, Garre ML et al. Childhood medulloblastoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011;79:65-83.
50. Pizer BL, Clifford SC. The potential impact of tumour biology on improved clinical practice for medulloblastoma: progress towards biologically driven clinical trials. *Br J Neurosurg.* 2009;23:364-375.
51. Eberhart CG, Kratz J, Wang Y et al. Histopathological and molecular prognostic markers in medulloblastoma: c-myc, N-myc, TrkC, and anaplasia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63:441-449.

52. von Hoff K, Hartmann W, von Bueren AO et al. Large cell/anaplastic medulloblastoma: outcome according to myc status, histopathological, and clinical risk factors. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54:369-376.
53. Ellison DW, Kocak M, Dalton J et al. Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables. *J Clin Oncol*. 2011;29:1400-1407.
54. Massimino M, Antonelli M, Gandola L et al. Histological variants of medulloblastoma are the most powerful clinical prognostic indicators. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60:210-216.
55. Zeltzer PM, Boyett JM, Finlay JL et al. Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 1999;17:832-845.
56. Grotzer MA, von Hoff K, von Bueren AO et al. Which clinical and biological tumor markers proved predictive in the prospective multicenter trial HIT'91-implications for investigating childhood medulloblastoma. *Klin Padiatr*. 2007;219:312-317.
57. Pfister S, Remke M, Benner A et al. Outcome prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN loci. *J Clin Oncol*. 2009;27:1627-1636.
58. Ryan SL, Schwalbe EC, Cole M et al. MYC family amplification and clinical risk-factors interact to predict an extremely poor prognosis in childhood medulloblastoma. *Acta Neuropathol*. 2012;123:501-513.
59. Ray A, Ho M, Ma J et al. A clinicobiological model predicting survival in medulloblastoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:7613-7620.
60. Tabori U, Baskin B, Shago M et al. Universal poor survival in children with medulloblastoma harboring somatic TP53 mutations. *J Clin Oncol*. 2010;28:1345-1350.
61. Gilbertson RJ, Pearson AD, Perry RH, Jaros E, Kelly PJ. Prognostic significance of the c-erbB-2 oncogene product in childhood medulloblastoma. *Br J Cancer*. 1995;71:473-477.

62. Thompson MC, Fuller C, Hogg TL et al. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol.* 2006;24:1924-1931.
63. Kool M, Korshunov A, Remke M et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol.* 2012;123:473-484.
64. Cho YJ, Tsherniak A, Tamayo P et al. Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J Clin Oncol.* 2011;29:1424-1430.
65. Northcott PA, Korshunov A, Witt H et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol.* 2011;29:1408-1414.
66. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol.* 2012;123:465-472.
67. Schuller U, Heine VM, Mao J et al. Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell.* 2008;14:123-134.
68. Gilbertson RJ, Ellison DW. The origins of medulloblastoma subtypes. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:341-365.
69. Yang ZJ, Ellis T, Markant SL et al. Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell.* 2008;14:135-145.
70. Gibson P, Tong Y, Robinson G et al. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature.* 2010;468:1095-1099.
71. Northcott PA, Korshunov A, Pfister SM, Taylor MD. The clinical implications of medulloblastoma subgroups. *Nat Rev Neurol.* 2012;8:340-351.
72. Pei Y, Moore CE, Wang J et al. An animal model of MYC-driven medulloblastoma. *Cancer Cell.* 2012;21:155-167.

73. Kawauchi D, Robinson G, Uziel T et al. A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma. *Cancer Cell*. 2012;21:168-180.
74. Eberhart CG. Three down and one to go: modeling medulloblastoma subgroups. *Cancer Cell*. 2012;21:137-138.
75. Wang J, Wechsler-Reya RJ. The role of stem cells and progenitors in the genesis of medulloblastoma. *Exp Neurol*. 2012
76. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:425-436.
77. Garvalov BK, Acker T. Cancer stem cells: a new framework for the design of tumor therapies. *J Mol Med (Berl)*. 2011;89:95-107.
78. Manoranjan B, Venugopal C, McFarlane N et al. Medulloblastoma stem cells: modeling tumor heterogeneity. *Cancer Lett*. 2013;338:23-31.
79. Thalheimer A, Korb D, Bonicke L et al. Noninvasive visualization of tumor growth in a human colorectal liver metastases xenograft model using bioluminescence in vivo imaging. *J Surg Res*. 2013
80. Dockhorn-Dworniczak B, Schafer KL, Dantcheva R et al. Detection of EWS-/FLI-1 gene fusion transcripts by RT-PCR as a tool in the diagnosis of tumors of the Ewing sarcoma group. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1994;78:214-219.
81. Northcott PA, Shih DJ, Remke M et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol*. 2012;123:615-626.
82. Mao XG, Zhang X, Xue XY et al. Brain Tumor Stem-Like Cells Identified by Neural Stem Cell Marker CD15. *Transl Oncol*. 2009;2:247-257.
83. Read TA, Fogarty MP, Markant SL et al. Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma. *Cancer Cell*. 2009;15:135-147.
84. Son MJ, Woolard K, Nam D-H, Lee J, Fine HA. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell stem cell*. 2009;4:440-452.

85. Ward RJ, Lee L, Graham K et al. Multipotent CD15+ cancer stem cells in patched-1-deficient mouse medulloblastoma. *Cancer Res.* 2009;69:4682-4690.
86. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63:5821-5828.
87. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004;432:396-401.
88. Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol.* 1996;175:1-13.
89. Galli R, Binda E, Orfanelli U et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004;64:7011-7021.
90. Campos B, Herold-Mende CC. Insight into the complex regulation of CD133 in glioma. *Int J Cancer.* 2011;128:501-510.
91. Alison MR, Guppy NJ, Lim SM, Nicholson LJ. Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? *J Pathol.* 2010;222:335-344.
92. Rasper M, Schafer A, Piontek G et al. Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. *Neuro Oncol.* 2010;12:1024-1033.
93. Uchida N, Buck DW, He D et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:14720-14725.
94. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 1990;60:585-595.
95. Schwechheimer K, Wiedenmann B, Franke WW. Synaptophysin: a reliable marker for medulloblastomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1987;411:53-59.
96. Katsetos CD, Legido A, Perentes E, Mork SJ. Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J Child Neurol.* 2003;18:851-66; discussion 867.

97. Ligon KL, Alberta JA, Kho AT et al. The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63:499-509.
98. Jakovcevski I, Zecevic N. Olig transcription factors are expressed in oligodendrocyte and neuronal cells in human fetal CNS. *J Neurosci.* 2005;25:10064-10073.
99. Schnitzer J, Franke WW, Schachner M. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol.* 1981;90:435-447.
100. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 2000;25:1439-1451.
101. Jones DT, Jager N, Kool M et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature.* 2012;488:100-105.
102. Herms JW, Behnke J, Bergmann M et al. Potential prognostic value of C-erbB-2 expression in medulloblastomas in very young children. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1997;19:510-515.
103. Gilbertson RJ, Perry RH, Kelly PJ, Pearson AD, Lunec J. Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma. *Cancer Res.* 1997;57:3272-3280.
104. Gilbertson RJ, Clifford SC, MacMeekin W et al. Expression of the ErbB-neuregulin signaling network during human cerebellar development: implications for the biology of medulloblastoma. *Cancer Res.* 1998;58:3932-3941.
105. Gilbertson R, Wickramasinghe C, Hernan R et al. Clinical and molecular stratification of disease risk in medulloblastoma. *Br J Cancer.* 2001;85:705-712.
106. Pelengaris S, Rudolph B, Littlewood T. Action of Myc in vivo - proliferation and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* 2000;10:100-105.
107. Hermeking H, Eick D. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science.* 1994;265:2091-2093.
108. Eberhart CG. In search of the medulloblast: neural stem cells and embryonal brain tumors. *Neurosurg Clin N Am.* 2007;18:59-69, viii-ix.

109. Friedman GK, Gillespie GY. Cancer Stem Cells and Pediatric Solid Tumors. *Cancers (Basel)*. 2011;3:298-318.
110. Patru C, Romao L, Varlet P et al. CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. *BMC Cancer*. 2010;10:66.
111. Shipitsin M, Polyak K. The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab Invest*. 2008;88:459-463.
112. Beier D, Hau P, Proescholdt M et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*. 2007;67:4010-4015.

Danksagung

Ich danke allen, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel für die Überlassung des Themas sowie seine freundliche und fördernde Betreuung mit zahlreichen guten Ratschlägen und Ideen.

Auch danke ich den Arbeitsgruppen Wölfl, Beilhack, Monoranu, Eyrich, Vince, Van Gool, Rosenwald, Taylor und Remke, die mich mit Rat und Tat unterstützt haben.

Zu guter Letzt möchte ich auch vor allem meiner Frau Susanne danken. Nicht nur für ihr Verständnis und ihre Geduld, sondern auch für ihre tierärztliche Expertise und Hilfe bei den zahlreichen Eingriffen und Untersuchungen zu später Stunde und am Wochenende.

Lebenslauf

1983	Geburt in Mellrichstadt (Deutschland)
2003	Allgemeine Hochschulreife
2003-2004	Zivildienst
2005-2011	Studium der Humanmedizin, Medizinische Universität Graz
2009-2010	Studienassistent, Institut für Pathophysiologie und Immunologie, Medizinische Universität Graz
2011	Leistungsstipendium, Medizinische Universität Graz
2011	Sponsion zum Dr.med.univ. unter den 10 Jahrgangsbesten
2011	Approbation als Arzt in Bayern
2010-2012	Promotionsarbeit, Kinderklinik und Poliklinik, Universität Würzburg
seit 2012	Assistenzarzt, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universität Würzburg
2017	Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

Wissenschaftliche Arbeiten

2016

Dietl S, Schwinn S, Dietl S et al. MB3W1 is an orthotopic xenograft model for anaplastic medulloblastoma displaying cancer stem cell- and Group 3-properties. BMC Cancer. 2016;16:115 (Originalarbeit)

2013

Dietl S, Wöfl M, Beilhack A et al. Intracranial xenografting of extraneural disseminated anaplastic medulloblastoma in immunocompromised mice and subsequent in vivo bioluminescence imaging. 2nd Annual Pediatric Neuro-Oncology Basic and Translational Research Conference. Fort Lauderdale; FL May 16–17, 2013 (Poster)

2011

In vitro Expression von ADAM-, ADAMTS- und ADAMTSL-Vertretern in trophoblastären Carcinomlinien; Institut für Pathophysiologie und Immunologie, Medizinische Universität Graz, bei Univ. Ass. Mag. Dr. Nassim Ghaffari-Tabrizi und Univ. Prof. Dr. Anton Sadjak (Diplomarbeit)

Dietl S, Fuchs R, Allard N et al. Expression pattern of ADAM and ADAMTS families in human choriocarcinoma cell lines. 3rd ÖGMBT Annual Meeting. Salzburg; AU Oct 28-30, 2011 (Poster)