

**CHARAKTERISIERUNG SPONTANER MURINER
MEDULLOBLASTOME IM HETEROZYGOTEN
PATCHED ^{+/-} - KNOCKOUT - MODELL:**

**Untersuchungen zu Histologie, Zellzyklus, Chemosensibilität
und Promininexpression**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Stefan Pfeifer

aus Bonn

2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. T. Pietsch
- 2. Gutachter: Prof. Dr. med. U. Bode

Tag der Mündlichen Prüfung: 09.11.2009

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. T. Pietsch

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1 EINLEITUNG	8
1.1 Das Medulloblastom	8
1.1.1 Subtypen und Pathogenese	8
1.1.2 Therapie und Prognose	9
1.2 Der Sonic Hedgehog / Patched Signalweg	10
1.2.1 Cyclopamin	11
1.3 Das Patched ^{+/-} Knockout-Mausmodell	11
1.4 Prominin / CD133 als Marker stammzellähnlicher Zellen in Medulloblastomen	12
1.5 Ziel dieser Arbeit	12
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Versuchstiere	14
2.1.1 DNA-Gewinnung aus Schwanzspitzen	14
2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion	14
2.2 Substanzen und Applikationen	15
2.3 Präparierung der Gehirne	15
2.4 Magnetresonanztomographie	16
2.5 Immunhistochemie an Paraffinschnitten der Mausgehirne	16
2.5.1 Apoptose-Färbung	17
2.5.2 Proliferations-Färbung	17
2.5.3 Differenzierungs-Färbung	18
2.5.4 Prominin-Färbung an Gefrierschnitten der Mausgehirne	18

2.6	Zelllinie SJMM4 und Zellkultur	19
2.6.1	Magnetische Zell-Separation	19
2.6.2	Proliferationsassay.....	20
2.6.3	Durchflusszytometrie und Zellzyklusanalyse	20
3	ERGEBNISSE.....	22
3.1	Tumorhäufigkeit und Symptomatik bei den Patched ^{+/-} Mäusen.....	22
3.2	Analyse von Proliferation und Apoptosen der Medullo-blastome von Patched ^{+/-} Mäusen nach Applikation von Cyclopamin oder Etoposid.....	23
3.2.1	Analyse der Differenzierung der Medulloblastome	25
3.3	Diagnostik und Verlauf mittels Magnetresonanztomographie bei Patched ^{+/-} Mäusen	29
3.4	Proliferationsassay mit der murinen Medulloblastomlinie SJMM4 nach magnetischer Zell-Separation.....	31
3.5	Generierung einer neuen Zelllinie aus einem Patched ^{+/-} Maus-Medulloblastom	32
3.6	Darstellung und Zellzyklusanalyse von Prominin-positiven Tumorzellen der Linie SJMM4 mittels Durchflusszytometrie	33
3.6.1	Prominin-Färbung an Gefrierschnitten von Patched ^{+/-} Maus-Medulloblastomen	34
4	DISKUSSION	37
4.1	Mausmodelle mit spontaner Tumorentstehung	37
4.2	Tumorinzidenz bei Patched ^{+/-} Mäusen	38
4.3	Diagnostik und Verlaufsdocumentation mittels Magnetresonanztomographie	38
4.4	Anwendung der Therapeutika	39
4.4.1	Kombination von Zytostatika und Signalweg-spezifischen Substanzen	40
4.5	Bedeutung von Prominin-positiven Zellen in Tumoren.....	41
5	ZUSAMMENFASSUNG	44
	Abbildungsverzeichnis	45

Tabellenverzeichnis.....	45
LITERATUR	45
Danksagung.....	52
Curriculum Vitae.....	53

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ak	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
BSA	Bovine serum albumin
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FOV	Field of view
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
Gli	Glioma-associated oncogene
h	Stunde
Hh	Hedgehog
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIT 91	Hirntumor-Studie
IgG	Immunglobulin G
Konz	Konzentration
LC	Large cell
MACS	Magnetic cell separation
MB	Medulloblastom

min	Minute
MRT	Magnetresonanztomographie
MSSE	Multislice spin echo
NaCl	Natrium-Chlorid
NEX	Numbers of excitation
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
Ptc	Patched Gen
PTCH	Human patched Gen
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Shh	Sonic hedgehog
Smo	Smoothened
TE/ TR	Echozeit / Repititionszeit
Trp	Tropfen
U	Enzymeinheit
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Das Medulloblastom

Medulloblastome sind maligne Tumoren des Kleinhirns, die überwiegend im Kindes- und Jugendalter vorkommen. Der Erkrankungsgipfel liegt um das 5. Lebensjahr. Mit einer Inzidenz von 5,1 Erkrankungen pro 1 Millionen Kinder stellen Medulloblastome 20 bis 25% der kindlichen Hirntumoren. Die Geschlechterverteilung zeigt eine männliche Prädisposition von 1,5:1. Das Medulloblastom ist ein primitiver neuroektodermaler Tumor von höchster Malignität. Die World Health Organization (WHO) teilt die Hirntumore nach ihrer Malignität in Grad I bis IV ein. Das Medulloblastom wird dem Grad IV zugeordnet (Louis et al., 2007). Die embryonalen Zellen können eine beginnende neuronale oder astrozytäre Differenzierung zeigen. Durch das invasive Wachstum und die Nähe zum vierten Ventrikel sind bei 25% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose Tumorzellen im Lumballiquor (Metastasen-Stadium M1) und bei 20 bis 30% solide Metastasen im Zentralnervensystem (zerebral: M2, spinal: M3) nachweisbar (Rutkowski, 2006; Tallen et al., 2007). Leitsymptome der Erkrankung sind Hirndruckzeichen wie Kopfschmerzen und Erbrechen, Kleinhirnsymptome wie Ataxie, Nystagmus und Tremor sowie Hirnnervenparesen.

1.1.1 Subtypen und Pathogenese

Die häufigste Variante mit 70% ist das klassische Medulloblastom. Es besteht aus dicht gepackten, unreifen Zellen ("blauer Rundzelltumor") mit hyperchromatischen Kernen, die sich zu Rosetten formieren können. Es ist zumeist im Kleinhirnwurm lokalisiert (Louis et al., 2007). Die desmoplastische (knotenförmige) Variante, mit einer Häufigkeit von 20%, zeichnet sich durch eine Retikulinfaserbildung um Tumorzellinseln aus. Sie tritt häufiger bei Säuglingen und jungen Erwachsenen auf und ihre Lokalisation sind die Kleinhirnhemisphären. Diese Variante ist mit Mutationen im Tumorsuppressorgen Human patched (PTCH) assoziiert (Pietsch et al., 1997). Mutationen der Keimbahn sind beim Gorlin-Goltz-Syndrom (Basal-Zell-Naevus-Karzinome, Skelettdysplasien, Kieferzysten, autosomal dominante Vererbung) nachweisbar (Hahn et al., 1996). Diese Patienten haben eine stark erhöhte Inzidenz von ca. 3% für die Entstehung eines Medulloblastoms (Evans et al., 1991). Das extrem noduläre Medulloblastom weist eine ausgeprägte neuronale Differenzierung auf und tritt besonders bei Kindern unter drei Jahren auf

(5% der Medulloblastome). Die Patienten haben eine besonders günstige Prognose (Giangaspero et al., 1999). Die großzelligen und anaplastischen Varianten mit einer Häufigkeit von 5% zeichnen sich durch die geringste Differenzierung und hohe zytologische Anaplasien aus und haben zumeist eine ungünstige Prognose (Brown et al., 2000). Amplifikationen vom Onkogen c-myc konnten besonders in diesen Tumoren nachgewiesen werden. Andere prognostisch ungünstige molekulargenetische Veränderungen in Medulloblastomen sind eine niedrige Expression des Neutrophin-3 Rezeptors trkC und eine hohe Expression des Tyrosin-Kinase-Rezeptors erbB-2 (MacDonald et al., 2003). Ein Marker für eine günstige Prognose scheint eine Anreicherung von β -catenin in den Kernen der Tumorzellen zu sein (Ellison et al., 2005). Man vermutet, dass bei den Subtypen unterschiedliche Ursprungszellen existieren. Bei der desmoplastischen Variante sind es wahrscheinlich die Vorläuferzellen aus der externen Körnerzellschicht (Wechsler-Reya und Scott, 1999; Wechsler-Reya und Scott, 2001). Diese Körnerzellen erfahren in der Entwicklung des Kleinhirns eine massive Proliferation, induziert durch den Liganden Sonic Hedgehog, welcher von den Purkinjezellen sezerniert wird (Wallace et al., 1999). Anschließend migrieren sie einwärts, differenzieren aus und bilden die interne Körnerzellschicht. Bei den klassischen Medulloblastomen geht man von multipotenten Vorläuferzellen aus, die die Ventrikel umgeben.

1.1.2 Therapie und Prognose

Die Therapie des Medulloblastoms besteht aus neurochirurgischer Resektion, Bestrahlung des gesamten zentralen Nervensystems und Chemotherapie. Bei Kindern unter 4 Jahren wird versucht, auf eine Bestrahlung zu verzichten. Die Patienten werden in eine Standard- oder Hochrisikogruppe eingeteilt. In die Stratifizierung fließen ein: Alter, Histologie, Vorhandensein von Metastasen oder eines Resttumors, Ansprache auf Chemotherapie und molekulargenetische Untersuchungen (myc oder β -catenin Expression). Insgesamt wurde im Zeitraum von 1990 bis 1999 in Deutschland eine Fünfjahres-Überlebensrate von 55% erreicht (Kaatsch, 2001). In der multizentrischen Hirntumorstudie HIT 91 lag das 3-Jahres progressionsfreie Überleben mit kraniospinaler Bestrahlung und einer Erhaltungskemotherapie für Patienten ohne makroskopische Metastasen bei 79%, für Patienten mit Metastasen (M2/M3) bei 40% (Kortmann et al., 2000). Weiterhin besteht natürlich das Bestreben, die Klassifikation und Therapie durch ein verbessertes Verständnis der Entstehung und des Wachstums der Tumoren zu optimieren und die Spätfolgen zu reduzieren. So hat die Mortalität kindlicher Hirntumoren in den USA zwischen

1973 und 1994 zwar leicht abgenommen, doch ist sie 1998 dreimal so hoch wie die von akuten lymphatischen Leukämien (Bleyer et al., 1999). Verbesserungen wie bei der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) konnten in dieser Zeit bei kindlichen Hirntumoren nicht erreicht werden. Neben der Mortalität sind Nebenwirkungen und Spätfolgen der Therapie und die erreichte Lebensqualität gerade bei einer Erkrankung, die im Kindesalter auftritt, von entscheidender Bedeutung. Langzeitbetrachtungen zeigen, dass Patienten, die ein Medulloblastom überleben, ein hohes Risiko für neurologische, endokrine, neurokognitive und psychosoziale Komplikationen haben (Ribi et al., 2005). Dabei wird angenommen, dass die Bestrahlung, die effektiv ist, aber auch relativ ungezielt, für einen Großteil der Langzeitschäden verantwortlich ist. Die Möglichkeiten der Chemotherapie werden durch verminderte Sensibilität der Tumorzellen und die Bluthirnschranke erschwert. Bei einem Tumor, der früh über den Liquorweg metastasiert und bei dem das umliegende Gewebe maximal geschützt werden muss, ist die chirurgische Resektion sicher immer nur eine von mehreren, kombinierten Therapieformen. Eine große Hoffnung wird mit der Entwicklung von spezifischen Wirkstoffen verbunden, die direkt in wesentliche Tumor-assoziierte Signalwege, so den Sonic Hedgehog / Patched Signalweg eingreifen. Mutationen von Komponenten dieses Signalwegs sind bei 25% der Medulloblastome nachweisbar (Oliver et al., 2005) und können zu einer Induktion wachstumsfördernder Gene führen (Pietsch et al., 1997).

1.2 Der Sonic Hedgehog / Patched Signalweg

Das Morphogen Sonic Hedgehog bindet an den Rezeptor Patched (Ptc), einem 12-transmembranalen Protein. Durch diese Bindung verliert Patched seine inhibierende Wirkung auf Smoothed (Smo), einem 7-transmembranalen, G-Protein-gekoppelten Rezeptor (Stone et al., 1996). Durch eine noch nicht vollständig verstandene, intrazelluläre Signalweiterleitung kommt es zur Translokation bestimmter Gli-Transkriptionsfaktoren in den Kern, wo die Transkription spezifischer Zielgene wie Glioma-associated oncogene 1 (Gli1) und Patched selbst induziert wird. Aufgrund einer hohen Konservierung des Signalwegs während der Evolution findet man große Homologien zwischen dem Vertebraten- und dem Drosophila-System. Bei der Fruchtfliege sind die sezernierten Hedgehog-Proteine an der Entwicklung und Ausbildung von Polarität und Segmentierung beteiligt (Ingham und McMahon, 2001). In Vertebraten ist Sonic Hedgehog (Shh) neben der Genese von Nervenzellen in die Entwicklung von Herz, Lunge, Darm sowie Gefäßen, Muskeln und Knochen involviert.

1.2.1 Cyclopamin

Cyclopamin ist ein aus der Pflanze *Veratrum californicum* gewonnenes steroidales Alkaloid. Auf Embryonen von Vertebraten wirkt es teratogen und induziert Zyklopie. Diese Fehlbildungen ähneln Störungen durch Dysregulationen von Sonic Hedgehog (Chiang et al., 1996). Bei Untersuchungen konnte herausgefunden werden, dass Cyclopamin durch Bindung an Smoothed direkt in den Sonic Hedgehog / Patched Signalweg eingreift. Cyclopamin hat eine inhibierende Wirkung auf Smoothed und kann die Signalwegkaskade *in vitro* unterdrücken (Taipale et al., 2000; Chen et al., 2002). Cyclopamin soll durch Veränderungen der Gen-Expression eine Differenzierung der Tumorzellen fördern, dokumentiert durch eine reduzierte Expression von Math1, einem Marker von proliferierenden Zellen der externen Körnerzellschicht (Berman et al., 2002).

1.3 Das Patched ^{+/-} Knockout-Mausmodell

Um die Funktion und Bedeutung des Patched-Gens (Ptc) zu erforschen, wurde von Goodrich und Mitarbeitern ein Mausmodell konstruiert. Durch homologe Rekombination wurden ein Teil des Exon 1 und das gesamte Exon 2 des Ptc-Gens durch lacZ (β -Galaktosidase) und ein Neomycin-Resistenz-Gen ersetzt. Die so generierten heterozygoten Ptc ^{+/-} Knockout-Mäuse wurden entweder mit 129Sv oder mit C57Bl/6 Mäusen gekreuzt. Homozygote Ptc ^{-/-} Mäuse sterben am 9. bis 10. embryonalen Tag mit Defekten des Nervensystem, des Herzens und an anderen Geweben (Goodrich et al., 1997). Die Expression von Ptc und Gli ist in Ptc ^{-/-} Embryonen deutlich erhöht. Die Mehrzahl der heterozygoten Mäuse haben keine eingeschränkte Lebenserwartung. Bei etwa einem Sechstel treten ab einem Alter von 3 Monaten spontan Medulloblastome auf. Der genaue Mechanismus der Tumorgenese in diesen Mäusen ist noch nicht bekannt (Oliver et al., 2005). Bei über der Hälfte der Mäuse sind zwischen 4 und 6 Wochen ektope Zellen an der Oberfläche des Kleinhirns nachweisbar, die als verbleibende Zellen der externen Körnerzellschicht angesehen werden. Diese Zellen könnten ein präneoplastisches Stadium darstellen und sich bei einem Teil der Tiere zu Medulloblastomen entwickeln. Die Histologie der Medulloblastome ähnelt den humanen Tumoren. Es erscheinen kleine Zellen mit chromatindichten Kernen und wenig Zytoplasma, die meist undifferenziert sind. Es konnte eine erhöhte Expression von Ptc und Gli in den Tumoren im Gegensatz zum umliegenden Gewebe nachgewiesen werden, was auf eine gesteigerte Aktivierung des Signalwegs hinweist, die nicht durch eine erhöhte Expression von

Shh vermittelt wird. In den Tumoren und in den präneoplastischen Zellen wurden keine Ptc-Transkripte durch das normale Allel nachgewiesen (Oliver et al., 2005; Berman et al., 2002). Ptc^{+/-} Mäuse entwickeln außerdem Weichteilsarkome und in seltenen Fällen Defekte der hinteren Extremitäten.

Mit diesem Mausmodell können neue Erkenntnisse über die Tumorgenese und neue diagnostische Möglichkeiten gewonnen werden. Potentiell therapeutische Substanzen können in diesem *in vivo*-Modell mit immunsuffizienten Mäusen appliziert und deren Wirkungen analysiert werden.

1.4 Prominin / CD133 als Marker stammzellähnlicher Zellen in Medulloblastomen

Prominin ist ein Protein der Maus, welches dem CD133 des Menschen entspricht. CD133 ist ein glykosyliertes Transmembranprotein mit 5 transmembranen Domänen, welches mit Membran-Cholesterol interagiert und wahrscheinlich eine spezifische Funktion hat. Es wurde ursprünglich als ein Marker für hämatopoetische und neuronale Stammzellen klassifiziert. Prominin-positive, neuronale Stammzellen konnten aus dem postnatalen Cerebellum von Mäusen isoliert werden (Lee et al., 2005). Diese Zellen formten selbst-erneuernde Neurosphären und konnten *in vitro* zu Astrozyten, Oligodendrozyten oder Neuronen differenzieren. CD133-positive Zellen wurden in humanen Medulloblastomen nachgewiesen. Diese Zellen wurden isoliert und zeigten bei Xenograft-Versuchen eine erhöhte Fähigkeit zur Tumorinduktion (Singh et al., 2004).

1.5 Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Studien durchgeführt, um das Ptc^{+/-} Knockout-Mausmodell besser zu charakterisieren und die Anwendung und Eignung von Therapeutika zu prüfen:

- *Untersuchung des Einflusses von Zytostatika und Cyclopamin auf Ptc^{+/-} Maus-Medulloblastome:* Histologische Aufarbeitung der murinen Medulloblastome nach Substanzapplikation von Etoposid oder Cyclopamin mit Darstellung von Proliferation, Apoptose und Differenzierung
- *Begleitende in vitro Versuche und Etablierung neuer Zellkulturmodelle:* Zellkulturversuche anhand der murinen Tumormlinie SJMM4 und Generierung einer neuen

Zelllinie aus einem Ptc^{+/-} Maus-Medulloblastom

- *Analyse der Prominin-positiven Zellfraktion in situ und in vitro*: Darstellung und Zellzyklusanalyse von Prominin-positiven Stammzell-ähnlichen Tumorzellen der Linie SJMM4 mittels FACS und histologischer Nachweis von Prominin-positiven Zellen in Ptc^{+/-} Maus-Medulloblastomen

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Ptc ^{+/-} Mäuse wurden etabliert von der Arbeitsgruppe um Matthew Scott, Stanford University, (Goodrich et al., 1997) und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese Tiere wurden entweder mit C57BL/6 oder 129Sv Inzuchtmäusen gekreuzt. Für diese Arbeit wurden die Ptc ^{+/-} 129Sv Mäuse verwendet. Die Ptc ^{+/-} 129Sv Mäuse wurden zunächst mit genetisch unveränderten 129Sv Tieren und nach Anlauf der Zucht untereinander verpaart. Die Tiere wurden im Alter von 3-5 Wochen abgesetzt, mit Ohrmarken versehen und durch PCR-Amplifikation der aus Schwanzbiopsien extrahierten DNA genotypisiert. Es wurde eine Population von 91 Ptc ^{+/-} Mäusen generiert. Die Tiere wurden in engen Zeitabständen auf neurologische oder phänotypische Auffälligkeiten untersucht. Versuche wurden durch die Bezirksregierung Köln genehmigt (Aktenzeichen 50.203.2-BN 59, 15/05).

2.1.1 DNA-Gewinnung aus Schwanzspitzen

Schwanzspitzen wurden durch einen Lysispuffer unter Zugabe von Proteinase K über Nacht bei 55°C in einem Thermoschüttler verdaut. Pro Schwanzspitze wurde angesetzt in einem Eppendorf-Tube: 0,5ml Lysispuffer (bestehend aus 10mM Tris-HCL pH 8; 0,1M EDTA pH 8; 0,5% SDS) und 25µl Proteinase K (10mg/ml, Roche, Mannheim). Am nächsten Tag wurden die Proben für 10 min bei 13000 U/min (Heraeus Sepatech Biofuge 28RS) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt, die DNA durch Zugabe von 0,5ml Isopropanol gefällt und durch Zentrifugieren sedimentiert. Nach einem Waschvorgang mit 0,5ml 70%igem Ethanol wurde die DNA bei RT getrocknet und schließlich in 0,1ml Aqua ad inject. über Nacht gelöst.

2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion können ausgewählte DNA-Sequenzen exponentiell amplifiziert werden. Dazu werden so genannte Primer, kurze einzelsträngige Oligonukleotide, eingesetzt, die komplementär zu den flankierenden Bereichen der zu untersuchenden DNA-Sequenz sind. Die PCR setzt sich aus folgenden zyklisch wiederkehrenden Schritten zusammen:

Denaturierung (95°C, zunächst 5 min, im Zyklus 30 sek), Primeranlagerung (50°C, 40 sek), Synthese des Doppelstrangs (72°C, 40 sek) und Extension (72°C, 10 min nach dem letzten Zyklus); Anzahl der Zyklen: 35-40. Das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert aus RNA als Matrize eine komplementäre DNA. Die PCR-Produkte wurden zur Auswertung auf 2%ige Agarosegele (80ml) mit 10µl Ethidiumbromid (10mg/ml, Sigma) aufgetragen.

Verwendete Reagenzien: Der PCR-Ansatz wurde auf ein Volumen von 10µl pro Probe bestimmt. Darin waren beinhaltet 1µl DNA-Lösung, 1µl DMSO (Sigma), 1µl dNTP (2pmol/µl, Peqlab, Erlangen), 1µl PCR Puffer (Invitrogen), beide Primer je 0,5µl (10pmol/µl, MWG Biotech, Ebersberg), 0,3µl MgCl₂ (50mM, Invitrogen), 0,05µl Taq-Polymerase (5U/µl, Invitrogen), 4,65µl H₂O. Primer Sequenzen waren Neo F 5'- ATCTCCTGTCATCTCACCTTGC -3' und Neo R 5'- CAAGCTCTTCAGCAATATCACG -3'

2.2 Substanzen und Applikationen

Cyclopamin (Toronto Research Chemicals Inc.) oder Etoposid (Etophos, Bristol-Myers Squibb) wurde den Mäusen verabreicht, nachdem sie mit Symptomen eines Kleinhirntumors auffällig wurden. Etoposid ist ein Zytostatikum, welches bei verschiedenen malignen Erkrankungen eingesetzt wird. In der Therapie des Medulloblastoms wird es bei Patienten der Hochrisikogruppe und bei Kindern unter 4 Jahren verwendet. Es hemmt das Enzym Topoisomerase 2, wodurch ein Ablesen der DNA verhindert und Spaltstellen der DNA stabilisiert werden. Darauf folgt die Induktion der Apoptose. Die Wirkung ist Zellzyklus-abhängig. Etoposid, gelöst in einer physiologischen NaCl-Lösung (10mg/ml), wurde in einer Dosierung von 40µg pro g Mausegewicht einmalig als Bolus in die Schwanzvene injiziert. Die Applikation von Cyclopamin orientierte sich an Thayer et al. (2003). Eine Suspension aus 1,25mg Cyclopamin in 60µl Ethanol und 240µl Triolein wurde täglich subkutan injiziert über 6 (Maus Nr.5) bzw. 5 Tage (Maus Nr.6).

2.3 Präparierung der Gehirne

Nach Entfernung der Kalotte wurden die Gehirne vorsichtig von der Schädelbasis abgelöst und in 4% Formaldehydlösung für einen Tag bei Raumtemperatur fixiert. Tumore konnten makroskopisch identifiziert werden aufgrund ihrer Konsistenz, fehlender Struktur und einer

Größenzunahme des Kleinhirns. Anschließend wurden die Gehirne präpariert und paraffiniert. Alternativ wurde Hirngewebe in flüssigem Stickstoff gefroren.

2.4 Magnetresonanztomographie

Die Untersuchungen wurden zusammen mit Dr. Wiedermann, Arbeitsgruppe für *In-vivo*-NMR, mit einem 7 Tesla Magneten für Kleintierexperimente im Max Planck Institut für neurologische Forschung in Köln durchgeführt. Die Mäuse wurden mit Isofluran narkotisiert, über die Schwanzvene Gadolinium ($94\mu\text{g}$ pro g Mausegewicht, Magnevist) injiziert und zur Platzierung im Magneten auf einer Schiene mit der Spule fixiert. In der Schiene war ein Wasserkreislauf zur Erwärmung installiert. Die Messungen konnten mit verschiedenen Wichtungen und Schnittebenen durchgeführt werden. Hauptsächlich wurden axiale Schnitte mit einer T1 Wichtung durchgeführt (Parameter: MSSE Sequenz, TE/TR= 12,5ms/1000ms, Schichtdicke 0,5mm, NEX 2, FOV 2cm, Matrix 256x256).

2.5 Immunhistochemie an Paraffinschnitten der Mausgehirne

Immunhistochemische Färbungen wurden nach der Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode durchgeführt. Zuvor wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Es wurde eine Mikrowellen-Vorbehandlung durchgeführt, wobei der Antigen-Demarkierungs-Puffer (s.u.) vorher zum Aufkochen gebracht und während der Behandlung gerade unterhalb des Siedepunktes gehalten wurde. Die endogene Peroxidase wurde durch Inkubation mit 0,3% Wasserstoffperoxid in Methanol für 30 min bei Raumtemperatur (RT) blockiert. Zwischen jedem Arbeitsgang wurden die Schnitte in Aqua dest und PBS gespült. Es folgte die Blockierung der unspezifischen Färbung: Im ersten Schritt wurde eine Lösung aus PBS mit Avidin (4 Tropfen/1ml PBS), 5% fettfreiem Milchpulver und Normalserum (Schwein oder Kaninchen, Konz. 1:100) aufgetragen und für 1 Stunde (h) bei RT inkubiert. Nach Spülen in PBS wurden im zweiten Schritt die endogenen Biotin-Bindungsstellen blockiert durch Inkubation mit einer PBS-Biotin-Lösung (4 Tropfen Biotin/1ml PBS) für 15 min bei RT (siehe Protokoll Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Nach Abgießen dieser Lösung folgte die Inkubation mit dem primären (s.u.) und nach einem weiteren Waschvorgang (PBS, PBS/0,05% Triton-X, PBS) mit dem biotinkonjugierten sekundären Antikörper für 30 min. Anschließend wurde der Waschvorgang wiederholt und eine AB-Komplex-Lösung (DAKO, Hamburg) aufgetragen (Inkubation 30 min bei RT, anschl. Waschvorgang). Schließlich wurde die

Peroxidase-Substrat-Lösung aufgetropft, bestehend aus DAB Lösung (Vector) und Wasserstoffperoxid (Merck). Die Schnitte wurden in Aqua dest gespült, mit Hämatoxylin gegengefärbt und nach einer aufsteigenden Alkoholreihe schließlich über Xylol eingedeckt.

2.5.1 Apoptose-Färbung

Antikörper: Caspase 3, Kaninchen IgG (R+D Systems; Minneapolis, USA)

Der Antikörper reagiert mit der aktivierten Form der Caspase 3. Caspasen sind Proteasen, die in ihrem Zentrum Cystein enthalten und Proteine hinter der Aminosäure Asparginsäure schneiden (Cystein-Aspartasen). Die verschiedenen Signalwege der Apoptose laufen auf der Ebene der Caspasen zusammen. In einer komplexen Kaskade führt eine Aktivierung der zytosolischen Effektor-Caspasen, einschließlich Caspase 3, zur Spaltung von Schlüsselproteinen und zum Zelltod.

Für die Färbung wurde eine Mikrowellen-Vorbehandlung mit EDTA-Puffer 1 mM, pH 8 für 15 min in einer Plastikkuvette durchgeführt, anschließend für 10 min abgekühlt. Der Antikörper ist mit einer Verdünnung von 1:7000 angewandt worden, Inkubation über Nacht bei 4°C. Als Positiv-Kontrollen wurden Tonsillenschnitte verwendet. Als Sekundärantikörper wurde ein Biotin-gekoppelter Schwein-anti-Kaninchen-Immunglobulin Antikörper verwendet (DAKO, E 0353). Als Serum zum Blockieren der unspezifischen Färbung wurde Schwein-Normal-Serum verwendet (DAKO, X 0901).

2.5.2 Proliferations-Färbung

Antikörper: Tec3, Ratte anti Maus-ki67 (Dianova; Hamburg, Deutschland)

Tec3 ist ein Antikörper gegen das Ki67-Protein, welches von Zellen in allen Zellzyklusphasen außer der Ruhephase (G0) exprimiert wird und somit einen Marker für Proliferation darstellt. Das Ki67-Protein befindet sich in den Zellkernen und ist für die Proliferation essentiell. Die genauen Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. Es interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen, ist wahrscheinlich an der Synthese der Ribosomen während der Zellteilung beteiligt und erfüllt eine strukturelle Funktion im Zellkern.

Vor der Färbung des Ki67-Proteins wurde eine Mikrowellen-Vorbehandlung mit 10mM Citratpuffer (pH 6) für 30 min durchgeführt. Die Verdünnung betrug 1:50, Inkubation über Nacht bei 4°C. Als Sekundärantikörper wurde ein Biotin-gekoppelter Kaninchen-anti-Ratte-

Immunglobulin Antikörper verwendet (DAKO, E 0468). Als Normalserum wurde Kaninchen-Serum verwendet (DAKO, X 0902).

2.5.3 Differenzierungs-Färbung

Antikörper: NeuN (Chemicon international; Temecula, USA)

NeuN (neuronal nuclei) ist ein nukleäres Protein, welches bei den meisten neuronalen Zelltypen von Vertebraten nachweisbar ist (Wolf et al., 1996). Es bindet an DNA *in vitro*. Die genaue Funktion von NeuN ist nicht bekannt. NeuN wird als ein Marker neuronaler Differenzierung betrachtet, da es besonders von postmitotischen Neuronen exprimiert wird. Ptc^{+/-} Maus-Medulloblastome können mit NeuN angefärbt werden, wobei eine deutlich abgeschwächte Reaktion im Vergleich zu der internen Körnerzellschicht auf eine geringere Differenzierung hinweist.

Die Mikrowellen-Vorbehandlung der Färbung wurde mit Citratpuffer (pH 6; DAKO) durchgeführt. Die Verdünnung des Antikörpers betrug 1:200. Zur Färbung wurde ein Biotin/Streptavidin/Meerrettichperoxidasesystem (Histostain-Plus, Tecan Genesis RSP 100) eingesetzt.

2.5.4 Prominin-Färbung an Gefrierschnitten der Mausgehirne

Antikörper: Prominin, Ratte IgG-Biotin, 4 Klone: 5A618, MB93G8, 2C513, 4F317 (Miltenyi-Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland)

Prominin ist ein Transmembranprotein, welches dem CD133 des Menschen entspricht. CD133 wird von verschiedenen somatischen, wie z.B. neuronalen oder hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Außerdem konnte CD133 auch in bestimmten Tumoren, wie Medulloblastomen und Glioblastomen, nachgewiesen werden.

Gefrierschnitte wurden bei RT 1h aufgetaut. Zur Fixierung wurde eine Behandlung mit Aceton für 10 min bei RT durchgeführt. Anschließend trockneten die Schnitte für 30 min. Der weitere Ablauf der Färbung entspricht dem Protokoll nach der ABC-Methode ab dem Schritt zum Blockieren der unspezifischen Färbung. Der primäre Antikörper wurde 1:5 verdünnt und über Nacht bei RT inkubiert. Es wurden Biotin-konjugierte primäre Antikörper verwendet, wodurch die Inkubation mit einem Sekundäntikörper ersetzt wurde.

2.6 Zelllinie SJMM4 und Zellkultur

Die Linie SJMM4 wurde von James I. Morgan am St. Jude Children`s Hospital in Memphis aus einem Tumor einer 3 Monate alten, weiblichen Ptc^{+/-} Maus generiert (Li et al., 2003). Es wurde eine Expression von glialen und neuronalen Markern, wie GFAP, Neurofilament, nicht-spezifische Enolase und Synaptophysin nachgewiesen. Die Zellen wachsen ausschließlich adhären und wurden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Als Medium diente DMEM (Invitrogen) mit 10% fötalem Kälberserum (Invitrogen) und 2% L-Glutamin (Invitrogen). Bei zu starker Besiedelung wurden die Zellen mittels Trypsinbehandlung abgelöst, ausgedünnt und wieder ausgesät.

2.6.1 Magnetische Zell-Separation (MACS)

MACS ist eine Methode, um Zellen mit bestimmten Oberflächenstrukturen aus einem Zellgemisch zu separieren. Dazu werden Microbeads verwendet, welche aus Magnetpartikeln bestehen, die an Antikörper gebunden sind. Bei Durchfluss durch eine spezielle Säule, die von einem starken Magneten umgeben ist, werden mit Microbeads markierte Zellen zurückgehalten, während nicht markierte Zellen die Säule passieren.

Versuche wurden durchgeführt mit einem OctoMACS-System (Miltenyi) und den Microbeads Anti-Prominin MB93G8 von Miltenyi-Biotec anhand des Protokolls des CD133 Cell Isolation Kit (Miltenyi). Als Vorbereitung wurden die Zellen expandiert, mit Accutase (PAA, Cölbe) abgelöst und in einen angesetzten Puffer überführt, welcher aus PBS mit 0,5% BSA und 2 mM EDTA besteht. Die Zellzahl wurde bestimmt, nachdem die Zellsuspension, um Klumpen zu verhindern, durch einen Präseparations-Filter gegeben wurde. Die Zellen wurden mit 900 U/ min (Heraeus Sepatech Biofuge 28RS) für 5 min zentrifugiert und in 0,4ml Puffer resuspendiert. Anschließend folgte die magnetische Markierung durch Inkubation mit 0,1ml Prominin-Microbeads für 30 min bei 4-8°C. Nach einmaligem Waschen mit MACS-Puffer und Zentrifugieren wurde das Pellet in 0,5ml Puffer resuspendiert. Eine Large Cell (LC)-Säule wurde im Magneten befestigt und mit 0,5ml Puffer äquilibriert. Danach wurde direkt die Zellsuspension auf die Säule pipettiert. Der Durchlauf und eine nachfolgende Spülung von 4 x 0,5ml Puffer wurden aufgefangen (negative Fraktion). Durch Entnahme der Säule aus dem magnetischen Feld und mit 1ml Puffer wurde die Prominin-positive Fraktion mit Hilfe des Stempels eluiert. Die

positive Fraktion wurde erneut auf eine neue, vorgespülte Säule gegeben und der Durchlauf als negative Fraktion aufgefangen. Zellfraktionen wurden anschließend für eine Woche kultiviert.

2.6.2 Proliferationsassay

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens unter Cyclopamin und Etoposid wurden die Zellen der Linie SJMM4 zuerst in 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät. Die 36 Randlöcher enthielten steriles Aqua dest. Die 60 übrigen Vertiefungen wurden mit den Proben und Kontrollen beschickt. Als Kulturmedium wurde durchgängig das unter 2.6 zur Kulturhaltung erwähnte Medium benutzt. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt (einschließlich Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau), um in jedes Loch 0,1ml Medium mit ca. 1000 Zellen geben zu können. Es folgte die Zugabe der beiden Substanzen (Konzentrationen siehe 3.4). Cyclopamin wurde, in 1µl Ethanol gelöst, zugegeben. Etoposid wurde, in 3,5µl aqua ad injectabilia gelöst, zugegeben. Jede Probe wurde 5-fach angesetzt. Anschließend wurden die Platten im Brutschrank kultiviert. Nach 36 h wurde 12µl ^3H -Thymidin (3 µCi/ml; GE Healthcare, München) pro Kammer hinzugegeben und die Zellen für weitere 12 h im Brutschrank gelagert. In dieser Zeit wurde das Tritium-markierte Thymidin in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut. Nach diesen insgesamt 48 h wurde der Versuch durch Einfrieren der Platten beendet. Zur Auswertung der Platten wurden die DNA der aufgetauten Zellsuspensionen mit einem Mikrotiter-Erntegerät (Packard Filtermate 196, Perkin Elmer Life Sciences, Zarentem, Belgium) geborgen und durch ein Szintillationszählgerät (Topcount NXT, Packard) die Radioaktivität als Maß für die Proliferationstätigkeit der Zellen gemessen. Aus den 5 Proben pro Substanzkonzentration wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Anschließend wurden die Quotienten aus jeweiligem Probenwert und der Kontrolle ermittelt.

2.6.3 Durchflusszytometrie (FACS) und Zellzyklusanalyse

Bei der Durchflusszytometrie werden bestimmte Oberflächenmoleküle mit Antikörpergebundenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um Zellpopulationen zu charakterisieren. Dabei trägt der gegen das Oberflächenmolekül gerichtete Antikörper entweder bereits den Farbstoff (direkte Immunofluoreszenz) oder er wird durch einen zweiten Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper gebunden und damit sichtbar gemacht (indirekte Immunofluoreszenz). Durch die Verwendung zweier in verschiedener Wellenlänge fluoreszierender Farbstoffe ist die gleichzeitige Analyse verschiedener Parameter möglich. Im Durchflusszytometer werden die

Zellen einzeln an einer Lichtquelle zur Anregung der Farbstoffe vorbeigeführt und die entstehenden Emissionen über Photodetektoren erfasst. Bei der Verwendung zweier verschiedener Farbstoffe wird die gemischte Emission durch optische Filtersysteme in die den einzelnen Farbstoffen entsprechenden Wellenlängenbereiche aufgespalten. Die Analyse des Zellzyklus erfolgte durch Quantifizierung des DNA-Gehalts. Der Zellzyklus ist in die Mitose-Phase (Kernteilung) und Interphase (Zwischenphase) gegliedert. Die Interphase wird in G1-, S- und G2-Phase aufgeteilt. In der G1-Phase finden ein Wachstum der Zelle und eine Ergänzung der Zellbestandteile statt. Die folgende Synthese-Phase (S-Phase) ist durch die Reduplikation der DNA gekennzeichnet. In der G2-Phase wird die Mitose-Phase (M-Phase) vorbereitet. Als G0-Phase wird ein Verbleiben in der G1-Phase bezeichnet. Zellen in G0/1-Phasen weisen einen einfachen DNA-Gehalt auf, Zellen in der G2-Phase den doppelten und Zellen in der S-Phase werden dazwischen detektiert. Diese Messungen wurden im Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie der Universität Bonn an einem LSR2 flow cytometer (BD Biosciences) durchgeführt.

SJMM4 Zellen wurden expandiert, mit Versene (Invitrogen) abgelöst und in PBS resuspendiert. Es wurden drei Proben in FACS-Röhrchen angesetzt mit je ca. 0,5 Mio Zellen: 1. primärer und sekundärer Antikörper, 2. nur sekundärer Antikörper, 3. kein Antikörper (Autofluoreszenz). Nach Zentrifugieren mit 1200 U/min (Heraeus Sepatech Biofuge 28RS) für 5 min und dem Dekantieren des Überstands erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, Prominin MB93G8-Biotin, für 15 min auf Eis in einer Verdünnung von 1:5 in 50µl PBS. Anschließend wurden ein Waschvorgang mit 2ml PBS durchgeführt, die Proben zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Der sekundäre Antikörper, Streptavidin Alexa 488, wurde auf die Proben gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert in einer Verdünnung von 1:500, ebenfalls in einem Volumen von 50µl PBS. Zur Anfärbung des DNA-Gehalts wurde jede Probe in 0,5ml PBS resuspendiert und mit Zugabe von 0,5ml 4%igem Paraformaldehyd (PFA) und Inkubation über 10 min auf Eis fixiert. Nach Zugabe von 1ml PBS, Zentrifugieren und Dekantieren des Überstands fand eine Behandlung mit 0,5ml 0,5%igem TritonX für 5 min auf Eis unter gelegentlichem Schütteln statt, um die Permeabilität der Zellen zu gewährleisten. Wieder folgten ein Waschvorgang und die abschließende Inkubation mit 50µl RNase (2mg/ml), zur Degradierung der in den Zellen enthaltenen RNA und 0,5ml Hoechst 33258 DNA-Farbstoff (1,2µg/ml) für 30 min bei RT. Die Proben konnten nun gemessen und mit der Weasel Software ausgewertet werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Tumorhäufigkeit und Symptomatik bei den Ptc ^{+/-} Mäusen

Von 91 Ptc ^{+/-} Mäusen entwickelten 14 spontan Medulloblastome (15%), 4 Hämangiome und 5 Rhabdomyosarkome (siehe Abb. 1). Die übrigen Mäuse blieben symptomlos.

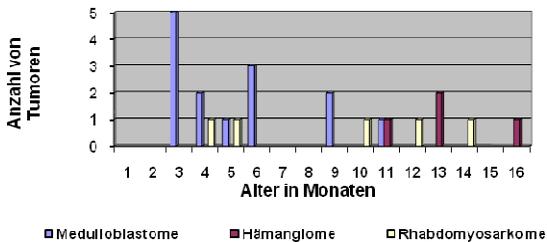


Abbildung 1. Altersabhängigkeit der Tumorentstehung

Medulloblastome traten in einem Alter zwischen 3 und 11 Monaten auf, mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen 3 und 6 Monaten. Bei einer 2 Monate alten Maus wurde die Vorstufe eines Medulloblastoms in Form von ektopen Zellen beobachtet. Die meisten Mäuse zeigten als erste Symptomatik eine Auswölbung des Schädels im Bereich des Hinterkopfes (siehe Abb. 2). Andere erste Symptome waren ein ungepflegtes Fell oder Inaktivität. Der Krankheitsverlauf war rapide progredient. Im Fortschreiten kam es bei fast allen Tieren zu Ataxie, Inaktivität bis zu Lethargie, Futterverweigerung und Gewichtsabnahme. Die Überlebenszeit variierte ohne Interventionen zwischen 6 und 20 Tagen (Mittelwert 11 Tage) nach Auftreten erster Symptome. Mäuse wurden bei schwerer Symptomatik in Narkose getötet.

Die Hämangiome traten alle bei älteren Tieren auf, waren intraabdominell lokalisiert und mit Dünndarmschlingen verwachsen. Ihre Ausdehnung war langsam progredient bis zu einer Größe von im Durchmesser 4 cm. Die Tumore waren an Umfang und Form des Rumpfes der Mäuse diagnostizierbar. Die Tiere waren in ihrem Verhalten nicht auffällig. Ein Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbter Schnitt ist in Abbildung 7 dargestellt.

Rhabdomyosarkome traten in einem Alter zwischen 4 und 14 Monaten auf. Vier waren proximal, an der hinteren Extremität lokalisiert und eins am Rücken lateral der Wirbelsäule (siehe Abb. 2). Die Tumore waren hart und derb zu tasten und zeigten ein progredientes Wachstum. Die Mäuse waren in ihrer Motorik eingeschränkt und wurden getötet. Ein HE-gefärbter Schnitt ist in Abbildung 7 dargestellt.

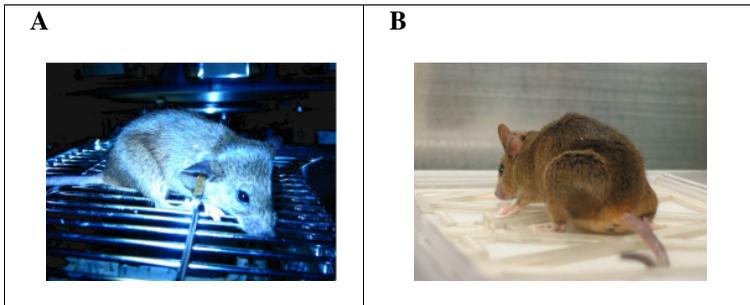


Abbildung 2. Photos von Mäusen mit Medulloblastom und Rhabdomyosarkom

A: Maus 1 mit Medulloblastom und starker Vorwölbung des Schädelknochens

B: Maus mit Rhabdomyosarkom an der hinteren Extremität

3.2 Analyse von Proliferation und Apoptosen der Medulloblastome von $Ptc^{+/-}$ Mäusen nach Applikation von Cyclopamin oder Etoposid

Um die Wirkung bestimmter Substanzen auf murine Medulloblastome zu analysieren, wurden nach Ablauf des Versuchs Färbungen für Proliferation und Apoptosen an Tumorschnitten durchgeführt. Bei insgesamt 6 Mäusen wurde eine Substanz appliziert. Es erhielten 2 Tiere Cyclopamin und 4 Tiere Etoposid, nachdem Symptome eines Kleinhirntumors sichtbar waren. Die Zeitpunkte der Applikationen nach Beginn einer Symptomatik waren nicht einheitlich. Bei Maus 5 wurde vorher eine Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt. Die Überlebenszeiten der Cyclopamin-behandelten Mäuse lagen bei 8 und 17 Tagen nach Auftreten von Symptomen. Bei den Etoposid-behandelten Mäusen waren es 13 Tage bei Maus 3, 16 und 4

Tage bei den Mäusen 2 und 4. Maus 1 wurde nach der MRT an Tag 13 getötet. Die Dauer der Exposition, als Zeit von Beginn der Behandlung bis zum Tod der Tiere und der histologischen Untersuchung, war bei den Cyclopamin-behandelten Mäusen 9 und 6 Tage und variierte bei den Etoposid-behandelten Mäusen zwischen 2 und 11 Tagen. Behandlung und Verlauf sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Maus	Alter	Behandlung und	Proliferation	Apoptosen	Verlauf
m/w	*	Zeitpunkt	(Tec 3)	(Caspase 3)	
1 w	6	Etoposid, d 11	++	+++	d 13 nach MRT getötet
2 w	6,5	Etoposid, d 14	++	++	d 16 getötet
3 w	6	Etoposid, d 2	+	++	d 13 getötet
4 m	5	Etoposid, d 1	+++	+	d 4 getötet
5 m	3,5	Cyclop., d 7	+++	+	d 17 nach MRT getötet
6 w	11	Cyclop., d 2	+++	++	d 8 gestorben
7 m	9	Keine	++	+	d 13 nach MRT getötet
8 m	1,5	Keine	+++	+	getötet, keine Symptomatik
9 w	3,75	Keine	+	++	d 10 getötet
10 w	3,25	Keine	+++	++	d 3 nach MRT getötet

* Alter in Monaten bei erster Symptomatik; d 0 (Tag 0)= Beginn der Symptomatik. Definition: Proliferation: + = bis 10%, ++ = 10% bis 50%, +++ = über 50%. Apoptose: + = 10%, ++ = 10% bis 30%, +++ = über 30%.

Tabelle 1. Histologische Analyse von Proliferation und Apoptose an Gehirnschnitten der Mäuse nach Applikation von Etoposid oder Cyclopamin

Bei Maus 3, welche der Substanz am längsten exponiert war, war eine Verminderung der Proliferation nachweisbar. Zudem war die Größe des Tumors, wie in Abbildung 3 zu sehen, vergleichbar gering. Eine Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen konnte bei Maus 1

nachgewiesen werden. Die Tumore der beiden übrigen Etoposid-behandelten Mäuse zeigten keine Steigerung von Apoptosen oder eine Verminderung der Proliferation. Solche Veränderungen sind ebenfalls nicht nachweisbar bei den Cyclopamin-behandelten Mäusen. Bilder der Färbungen sind in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt. Bei Maus 5 ist eine relativ lange Überlebenszeit von 17 Tagen zu erwähnen. Ein histologisch untypisches Bild eines Medulloblastoms wurde bei Maus 9 beobachtet, bei dem die Tumorzellen lockerer gepackt waren mit größeren Zellzwischenräumen.

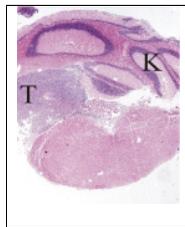


Abbildung 3. HE-gefärbter Paraffinschnitt des Gehirns von Maus 3.

T: Tumor, K: Kleinhirn

3.2.1 Analyse der Differenzierung der Medulloblastome

Bei allen Paraffinschnitten ist eine abgeschwächte Anfärbung für NeuN der Medulloblastome im Vergleich zu der internen Körnerzellschicht sichtbar. Auch bei der Cyclopamin-behandelten Maus konnte keine deutlich erhöhte Intensität als Zeichen für eine verstärkte Differenzierung der Tumorzellen nachgewiesen werden. Die Färbungen sind in Abbildung 6 dargestellt.

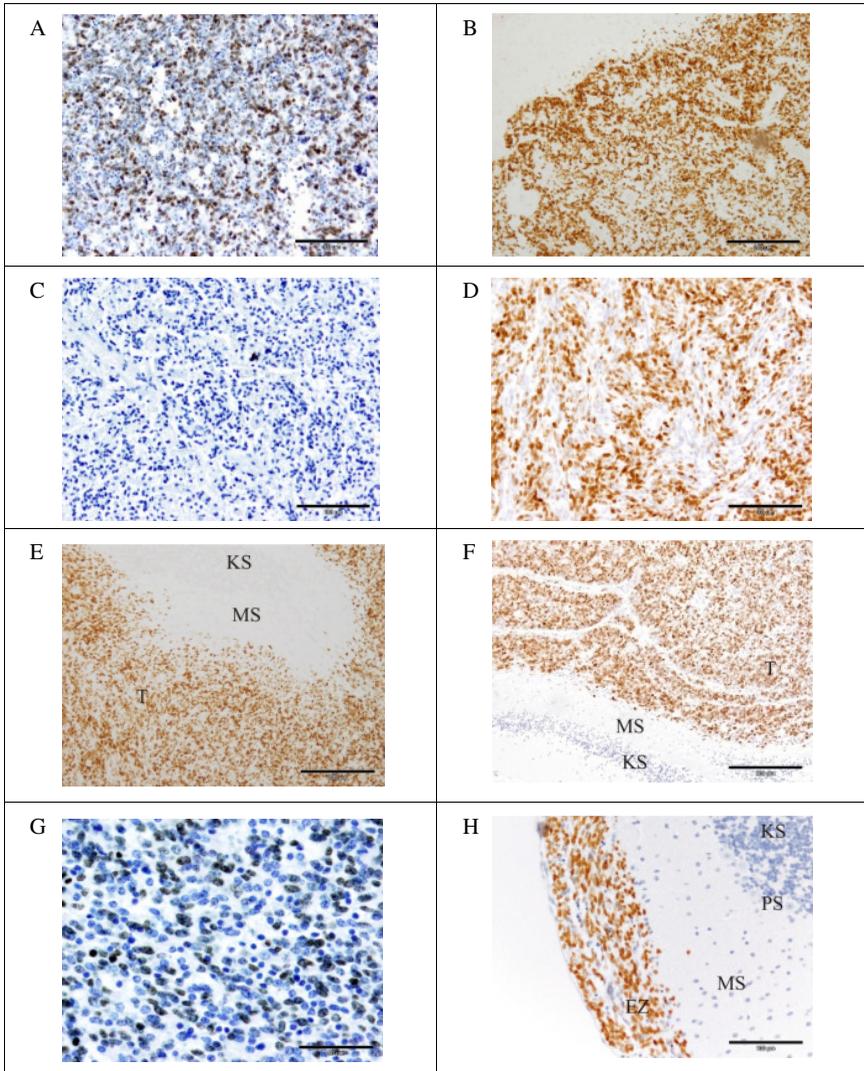


Abbildung 4. Proliferationsfärbung an Kleinhirnschnitten (Tec3). Bilder A-H entsprechen den Mäusen 1-8, siehe Tabelle 1. Bilder A-D,G zeigen ausschließlich Tumorgewebe. KS: Körnerzellschicht, PS: Purkinjezellschicht, MS: Molekularschicht, T: Tumor, EZ: Ektope Zellen. Maßbalken in Bild A,C,D,H: 0,1mm; B,E,F: 0,2mm; G: 0,05mm.

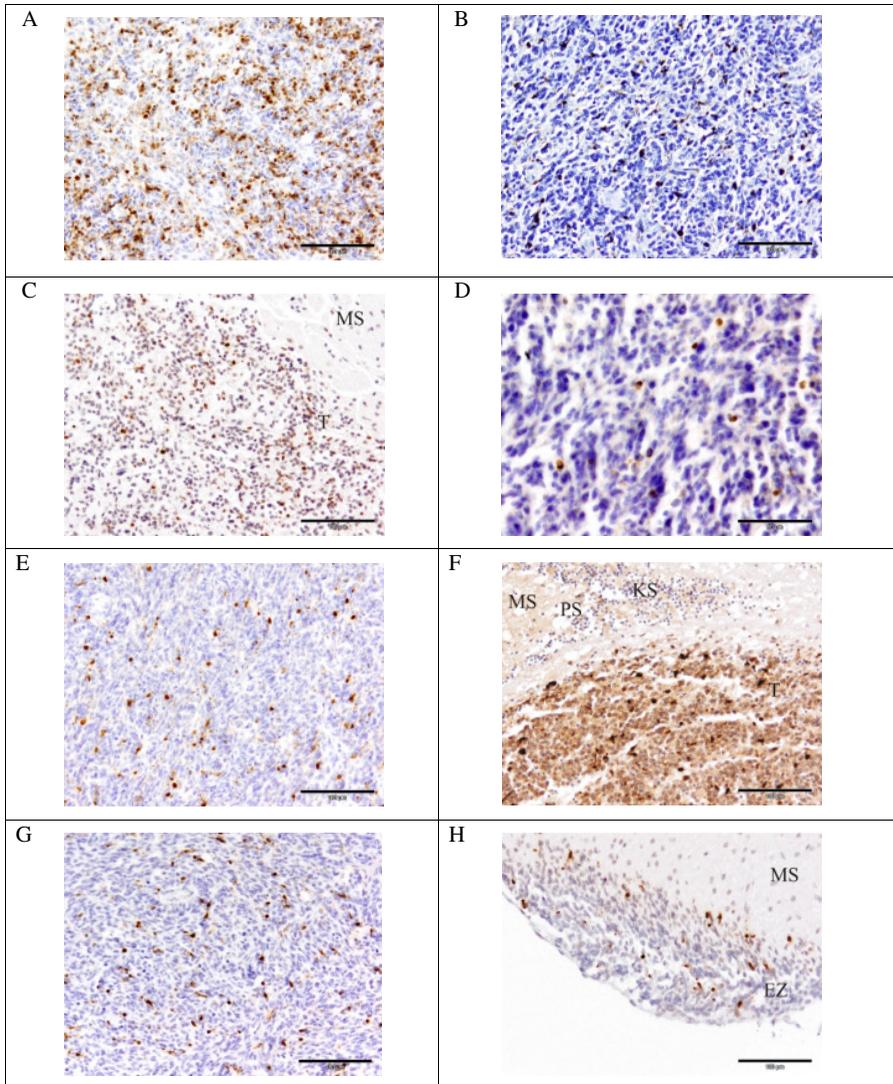


Abbildung 5. Apoptosefärbung an Kleinhirnschnitten (Caspase 3, aktiviert). Bilder A-H entsprechen den Mäusen 1-8, siehe Tabelle 1. Bilder A,B,D,E,G zeigen ausschließlich Tumorgewebe. KS: Körnerzellschicht, PS: Purkinjezellschicht, MS: Molekularschicht, T: Tumor, EZ: Ektople Zellen. Maßbalken in Bild A-C,E-H: 0,1mm; D: 0,05mm.

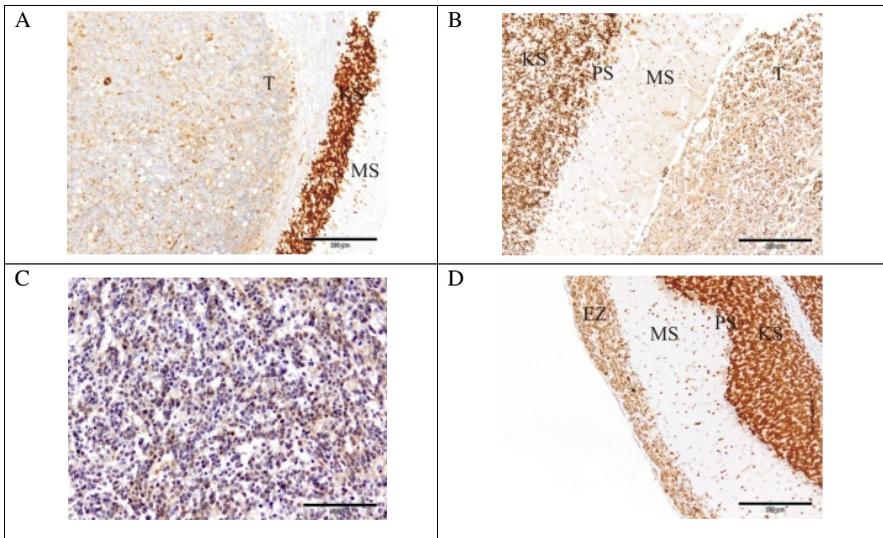


Abbildung 6. Differenzierungsfärbung an Kleinhirnschnitten (NeuN). Bild A zeigt Maus 1, B entspricht Maus 3, C entspricht Maus 6 und D entspricht Maus 8, siehe Tabelle 1. C zeigt ausschließlich Tumorgewebe. KS: Körnerzellschicht, PS: Purkinjellschicht, MS: Molekularschicht, T: Tumor, EZ: Ektopen Zellen. Maßbalken in Bild A,B,D: 0,2mm; C: 0,1mm.

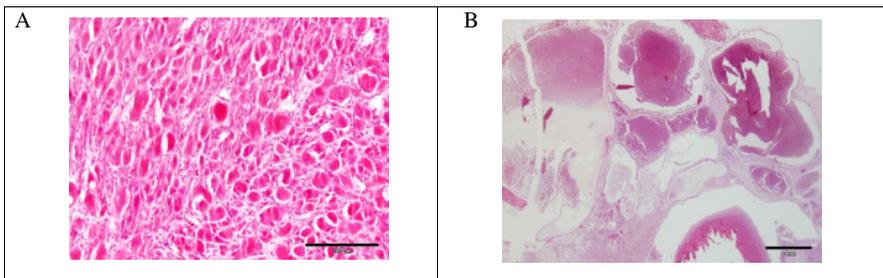


Abbildung 7. A: HE gefärbter Schnitt eines Rhabdomyosarkoms
B: HE gefärbter Schnitt eines Hämangioms.
Maßbalken in A: 0,2mm; B: 1mm.

3.3 Diagnostik und Verlauf mittels Magnetresonanztomographie bei Patched ^{+/-} Mäusen

MRT-Untersuchungen wurden durchgeführt, um zu beurteilen, ob sie als diagnostisches Instrument und zur genauen Befunderhebung geeignet sind. Tumor und Kleinhirngewebe sind gut abgrenzbar. Die Ausdehnung und Beschaffenheit der Tumore sind beurteilbar. Die Struktur der Kleinhirnrinde konnte gut dargestellt werden. Die Untersuchungen wurden von den Mäusen toleriert. Eine Verlaufsdokumentation durch wiederholte Messungen war möglich. Die Mäuse wurden nach den Messungen nach Bonn zurücktransportiert und unter Narkose getötet, um die Aufnahmen mit den histologischen Schnitten zu vergleichen (Maus 5 nach 2. MRT getötet). Einen Vergleich der MRT-Aufnahmen mit den histologischen HE-Schnitten ist in Abbildung 8 dargestellt. Bei Maus 5 ist eine leichte Größenzunahme des Tumors nach Applikation von Cyclopamin innerhalb von 10 Tagen zu erkennen.

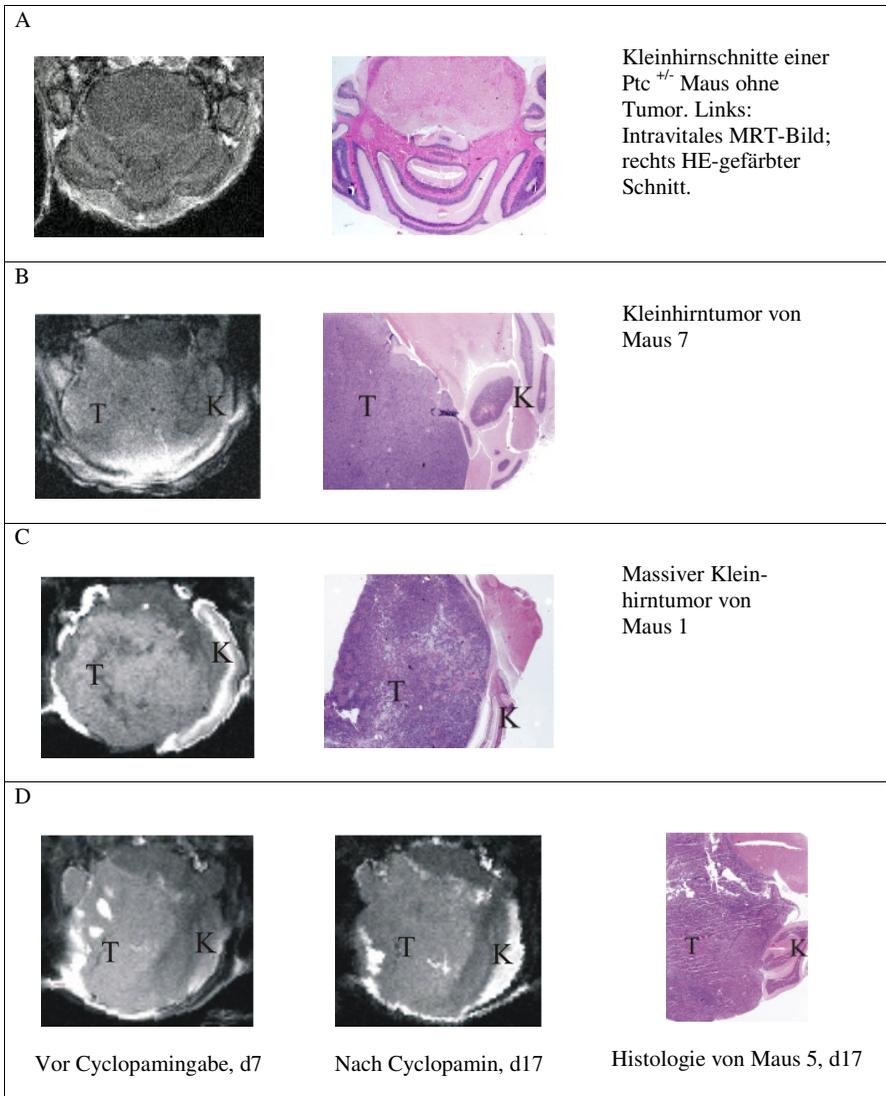


Abbildung 8. MRT-Bilder im Vergleich zu HE-gefärbten Kleinhirnschnitten. Links: Intravitales MRT-Bild; rechts HE-gefärbter Schnitt. K: Kleinhirn, T: Tumor.

3.4 Proliferationsassay mit der murinen Medulloblastomlinie SJMM4 nach magnetischer Zell-Separation

Ergänzend zu den *in-vivo*-Applikationen wurden Versuche an der etablierten Zelllinie SJMM4 durchgeführt, welche aus einem Ptc ^{+/+} Maus-Medulloblastom generiert wurde, um die Wirkung und mögliche Interaktion beider Substanzen weitergehend zu charakterisieren. Der Oberflächenmarker Prominin, welcher dem humanen CD133 entspricht, wurde in die Untersuchungen miteinbezogen, um Erkenntnisse über das Verhalten dieser Stammzell-ähnlichen Fraktion zu erhalten. Cyclopamin und Etoposid wurden sowohl einzeln als auch in Kombination verwendet. Zunächst wurde die Linie SJMM4 auf ca. 18 Mio Zellen expandiert. Daraufhin folgte die magnetische Zell-Separation in Prominin-positive und -negative Zellen. Es wurden ca. 50.000 Zellen als Prominin-positive Fraktion eluiert. Beide Fraktionen wurden anschließend für eine Woche inkubiert und dann der Proliferationsassay mit Tritium-Thymidin durchgeführt. Messungen sind in Abbildung 9 dargestellt.

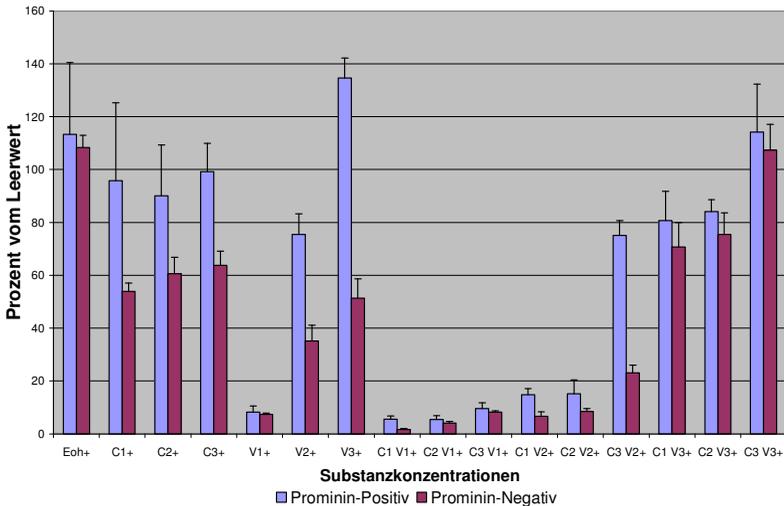


Abbildung 9. Veränderung der Proliferation der Zelllinie SJMM 4 durch Cyclopamin und Etoposid nach magnetischer Zellseparation.

Folgende Substanzkonzentrationen wurden verwendet:

C1: Cyclopamin 1 = 10 μ g/100 μ l	V1: Etoposid 1 = 0,7 μ g/100 μ l
C2: Cyclopamin 2 = 1 μ g/100 μ l	V2: Etoposid 2 = 0,07 μ g/100 μ l
C3: Cyclopamin 3 = 0,1 μ g/100 μ l	V3: Etoposid 3 = 0,007 μ g/100 μ l

(Eoh: 1 μ l Ethanol auf 100 μ l Nährmedium als Kontrolle der Cyclopaminproben, welche in 1 μ l Ethanol gelöst waren.)

Sowohl Cyclopamin als auch Etoposid konnten die Proliferation in Abhängigkeit von der Konzentration hemmen (Ausnahme Prominin-positive Fraktion C1). Die Kombination der Substanzen führte bei C1+V1, C2+V1, C1+V2 und C2+V2 zu einer Wirkungsverstärkung. Die Proliferation wurde bei der Prominin-negativen Fraktion bei allen Substanzkonzentrationen stärker gesenkt als bei der positiven. Der Unterschied der Proliferationshemmung war größer bei der Behandlung mit Etoposid (bei den Einzelsubstanzen C1 bis C3 betrug der Unterschied im Mittel 35,6%, bei V1 bis V3 im Mittel 41,5%). Bei der Kombination der geringsten Etoposid-Konzentration mit Cyclopamin war der Unterschied am geringsten. Probe-Proliferationsassays mit primären Tumorzellen lieferten keine verwertbaren Ergebnisse.

3.5 Generierung einer neuen Zelllinie aus einem Ptc ^{+/-} Maus-Medulloblastom

Zur Generierung einer neuen Medulloblastom-Zelllinie wurde eine symptomatische, weibliche Ptc ^{+/-} Maus narkotisiert und dekapitiert. Nach steriler Präparierung des Gehirns wurde das Kleinhirn in eine Schale mit DMEM-Nährmedium gegeben. Der Tumor wurde präpariert, in eine weitere Schale überführt und mit Hilfe eines Skalpells in möglichst kleine Zellklumpen zerteilt. Diese Suspension wurde unter Zugabe von Penicillin/Streptomycin in einer Kulturflasche inkubiert. D2855 ist eine adhärent wachsende Linie, die im Unterschied zu SJMM4 auch neuronale Fortsätze ausbildet (siehe Abbildung 10). Als Medium verwenden wir Neuro Cult NS-A Basal Medium (Stemcell Technologies Inc), ergänzt durch NSA Proliferation Supplements (Stemcell Technologies Inc). Zusätzlich werden EGF (Roche) in einer Konzentration von

25ng/ml und bFGF (Roche) mit 20ng/ml verwendet. Die Passagierung erfolgt ohne Zugabe von Trypsin. Die bisher erreichte Passagenzahl liegt über 100.

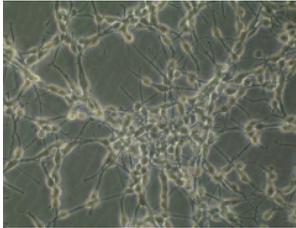


Abbildung 10. Bild der Zelllinie D2855 (Phasenkontrast)

3.6 Darstellung und Zellzyklusanalyse von Prominin-positiven Tumorzellen der Linie SJMM4 mittels Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte untersucht werden, ob die Fraktionen der Prominin-positiven und negativen Zellen unterschiedlich häufig den Zellzyklus durchlaufen. Hierzu wurden Färbungen des DNA-Gehalts der Zellen durchgeführt.

Der Anteil der Prominin-positiven Fraktion der Zelllinie SJMM4 war 16,8%. Von diesen Zellen befanden sich 46,6% in G0/G1-Phasen, bzw. 53,4% in S/G2/M-Phasen. Bei den Prominin-negativen Zellen waren es 67,1% in G0/G1 und 32,9% in S/G2/M-Phasen. Die Zellen der Prominin-positiven Fraktion der Linie SJMM4 waren häufiger in den S/G2/M-Phasen des Zellzyklus anzutreffen als die der negativen Fraktion. Wiederholte Versuche bestätigten die Ergebnisse. Die Färbungen sind in Abbildung 11 dargestellt.

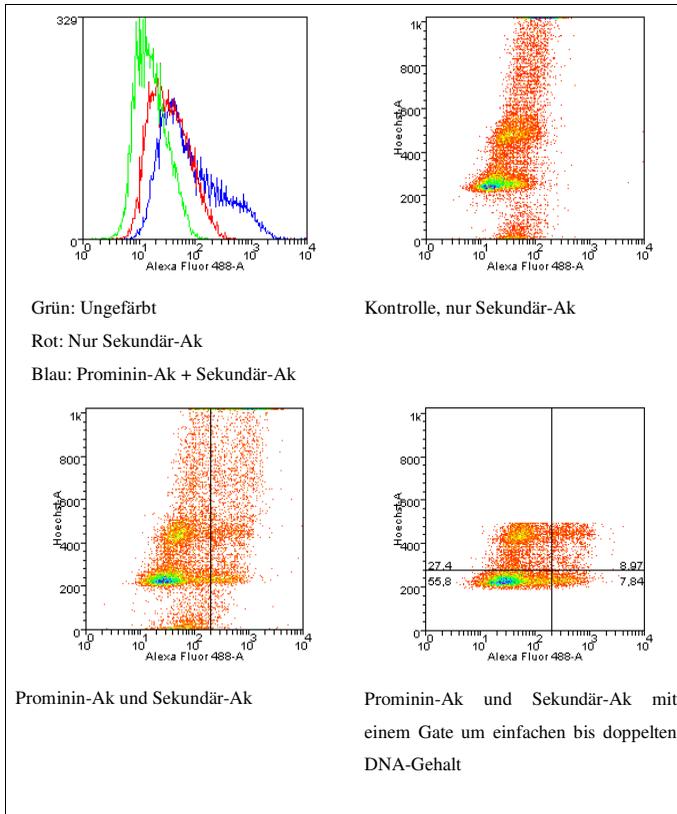


Abbildung 11. Darstellung von Prominin-positiven Zellen (X-Achse) der Linie SJMM4 und DNA-Gehalt (Y-Achse) mittels FACS

3.6.1 Prominin-Färbung an Gefrierschnitten von $Ptc^{+/-}$ Maus-Medulloblastomen

Wir führten diese Färbung durch, um Prominin-positive Stammzell-ähnliche Zellen in $Ptc^{+/-}$ Tumoren nachzuweisen und mögliche Effekte durch die applizierten Substanzen zu untersuchen. Die Prominin-Färbung wurde an Gefrierschnitten durchgeführt, da die Antikörper nicht Paraffin-gängig sind. Bei allen gezeigten Schnitten sind Zellen vereinzelt angefärbt. Bei der Cyclopamin-

behandelten Maus 6 war die Häufigkeit am geringsten. Gefäßendothel zeigte teilweise eine schwach ausgeprägte unspezifische Anfärbung (Bilder siehe Abb. 12).

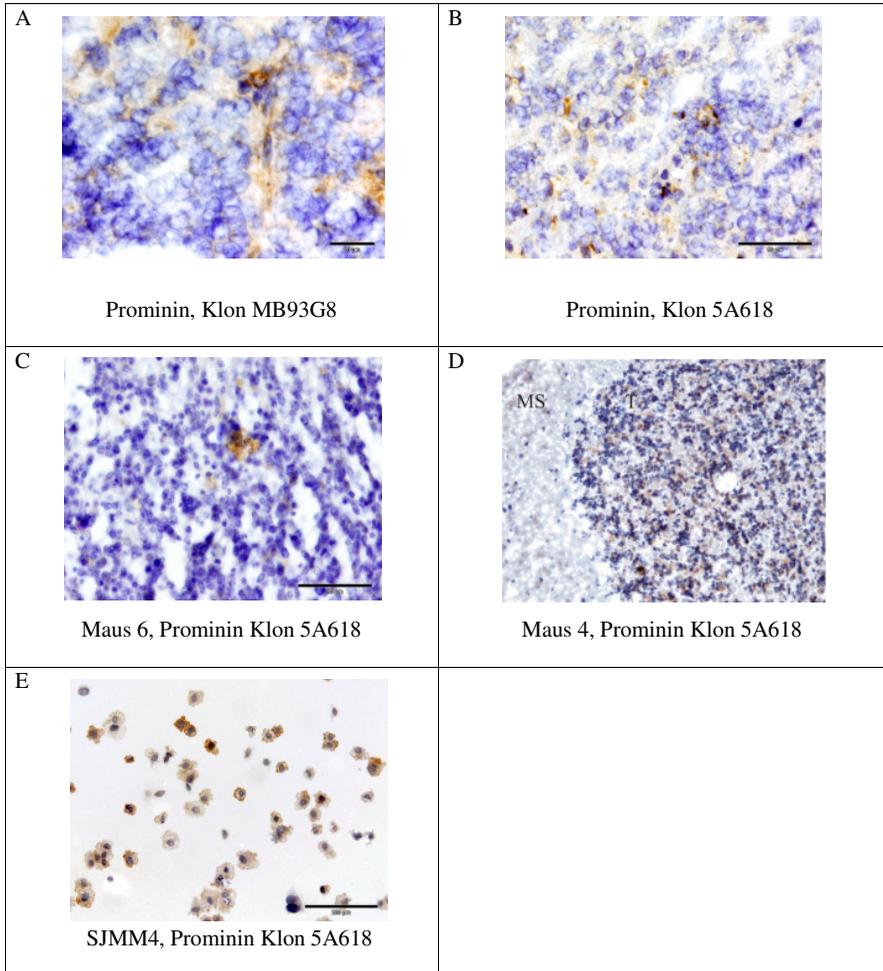


Abbildung 12. Promininfärbung an Gefrierschnitten und einem Zytospin. A und B: Prominin Färbungen eines Medulloblastoms einer unbehandelten Pte +/- Maus. C und D: Mäuse siehe Tabelle 1. E: Zytospin der Linie SJMM4. MS: Molekularschicht, T: Tumor. Bilder A,B,C zeigen ausschließlich Tumorgewebe. Maßbalken Bild A: 0,02mm; B, C: 0,05mm; D, E: 0,2mm

4 DISKUSSION

4.1 Mausmodelle mit spontaner Tumorentstehung

Mausmodelle bieten die Möglichkeit, bösartige humane Tumore darzustellen. Dabei werden essentielle Tumor-Host Interaktionen berücksichtigt. Diese Modelle werden gebraucht, um die Toxizität und die antineoplastische Wirkung von Substanzen *in vivo* zu analysieren. Mausmodelle können eingeteilt werden in Xenograft-Modelle und in Modelle mit spontaner Tumorentstehung bei genetisch veränderten Mäusen.

Bei Xenograft-Modellen sind Aussagen über die Effekte von Substanzen durch experimentell induzierte Artefakte eingeschränkt. So sind die verwendeten Zellen oder Zelllinien oft durch Kultur- oder Isolationsbedingungen verändert oder ihnen fehlt ein natives Tumorstroma. Die immunsupprimierten oder -kompromittierten Mäuse zeigen keine antineoplastische Immunreaktion, wodurch falsch positive Ergebnisse auftreten können.

Die Modelle mit spontaner Tumorentstehung bieten hingegen die Erscheinung von Tumor-initiiierenden Läsionen, eine bestehende Immunkompetenz und ein Tumorwachstum an der entsprechenden Lokalisation. Dies bezieht für die therapeutische Anwendung von Substanzen bei einem Hirntumor-Modell die Berücksichtigung der Bluthirnschranke mit ein. Die Nutzung dieser Modelle wird kompliziert durch eine geringere Reproduzierbarkeit, eine geringere Tumor-Manifestation und eine verlängerte Latenzzeit (Fomchenko et al., 2006). So benötigt ein Experiment, bezogen auf das Ptc^{+/-} Mausmodell, an 50 Hirntumoren eine Mauszucht von ca. 300 Tieren (Inzidenz siehe 4.2). Erforderlich sind deshalb geeignete intravitale diagnostische Verfahren. Dennoch repräsentiert dieses Modell den klinischen Verlauf einer Tumorerkrankung, die durch Symptome und Bildgebung diagnostiziert und anschließend behandelt wird. Die genetisch veränderten Mäuse repräsentieren eher humane Tumor-Prädispositionssyndrome als eine sporadische Tumorentstehung durch Mutation einer einzelnen Zelle oder einer kleinen Population von Zellen.

Durch Knockout-Mausmodelle kann die Bedeutung bestimmter genetischer Veränderungen von humanen Tumoren analysiert werden. Nachdem Mutationen des Patched-Gens in einem Teil von Medulloblastomen nachgewiesen werden konnten, wurde ein Mausmodell generiert, bei welchem den Tieren ein Allel des Patched-Gens fehlt. Ein homozygoter Verlust von Patched resultiert in

embryonaler Letalität. Heterozygote Patched-knockout Mäuse überleben und entwickeln spontan Kleinhirntumore, was darauf hindeutet, dass Patched als ein Tumorsuppressorgen fungiert. Diese Tumore ähneln in ihrer Lokalisation und Histologie den humanen Medulloblastomen und erzeugen bei den Mäusen vergleichbare Symptome wie Ataxie oder Hirndruckzeichen. Eine Bildgebung kann die genaue Ausdehnung des Prozesses dokumentieren und eine therapeutische Substanzapplikation kann durchgeführt werden.

4.2 Tumorinzidenz bei Ptc ^{+/-} Mäusen

Durch Cynthia Wetmore et al. (2000) wurden die Häufigkeiten der Tumore bei Ptc ^{+/-} Mäusen mit einem 129Sv Hintergrund mit 12% für Medulloblastome und 4% für Weichteilsarkome veröffentlicht, welche gut mit den beobachteten Häufigkeiten korrelieren (15% Medulloblastome, 5% Weichteilsarkome). Für Ptc ^{+/-} Mäuse des Stammes C57Bl/6 wurde eine Inzidenz von 14% für Medulloblastome beschrieben. Der Häufigkeitsgipfel der Medulloblastome, der mit einem Alter von 16 bis 24 Wochen beschrieben wurde, lag bei den hier untersuchten Mäusen zwischen 12 und 16 Wochen. Hämangiome wurden in Zusammenhang mit Ptc ^{+/-} Mäusen bislang nicht beschrieben. Eine Verbindung von Medulloblastomen mit intrabdominellen Hämangiomen findet sich beim "rubber bleb nevus" Syndrom, einem sehr seltenen Syndrom, bei dem venöse Gefäßfehlbildungen, zumeist am Dünndarm lokalisiert, auftreten. Diese Fehlbildungen können zu schweren gastrointestinalen Blutungen führen. Es tritt meist sporadisch auf, kann aber auch autosomal dominant vererbt werden. Die Pathogenese ist nicht bekannt.

4.3 Diagnostik und Verlaufsdokumentation mittels Magnetresonanztomographie

Um die Ausdehnung und Lokalisation der Medulloblastome zu erfassen, wurden MRT-Untersuchungen durchgeführt. In Einklang mit Nelson et al. (2003), welche bei 13 Ptc ^{+/-} Mäusen mit Medulloblastomen MRT-Untersuchungen durchgeführt haben, tolerieren die Tiere selbst in symptomatischen und fortgeschrittenen Krankheitsstadien die Anästhesie und die Durchführung der Messungen. Außerdem ist, wie von uns gezeigt, eine Verlaufsdokumentation durch wiederholte Messungen möglich. Es können Aussagen über die Wirkung von applizierten Substanzen anhand der Größenentwicklung und der Veränderung der Konsistenz der Tumore gemacht werden. Wir konnten bei Maus 5 eine leichte Größenzunahme des Tumors nach

Applikation von Cyclopamin innerhalb von 10 Tagen feststellen. Die angefertigten MRT-Bilder zeigten eine hohe Übereinstimmung mit den histologischen Schnitten.

4.4 Anwendung der Therapeutika

Als Substanzen verwendeten wir das Zytostatikum Etoposid und das in den Shh-Patched Signalweg eingreifende Cyclopamin. Bei 2 von den 4 Etoposid-behandelten Mäusen konnte histologisch eine antineoplastische Wirkung nachgewiesen werden. Cyclopamin hemmt das Wachstum von Shh-Ptch Signalweg-abhängigen Tumorzellen *in vitro*, von subkutanen Xenograft-Tumoren und von präkanzerösen Läsionen bei Ptc ^{+/+} Mäusen. Sanchez et al. (2005) behandelte Ptc ^{+/+}, p53 ^{-/-} Mäuse, welche durch den zusätzlichen Verlust von p53 eine Tumorfrequenz von fast 100% aufweisen (Wetmore et al., 2001), täglich über einen Monat mit Cyclopamin. Es wurde ein bestimmter Behandlungszeitpunkt gewählt, zu welchem die Tiere noch keine Symptome zeigten. Die Gruppe berichtet über eine Abnahme der Proliferation, eine Reduktion des Tumolvolumens und eine nicht veränderte Anzahl von Apoptosen. Weiterhin ist über die Wirkung von Cyclopamin bei manifesten, ausgeprägten Tumoren wenig bekannt. So berichtet Ecker et al. (2008), dass eine Behandlung mit Cyclopamin das Hedgehog-Signal in Rhabdomyosarkomen teilweise hemmt, aber zu keiner Tumorregression führt. Dies lässt vermuten, dass es weitere Faktoren gibt, die die antiproliferativen Effekte von Cyclopamin bei manifesten Tumoren *in vivo* hemmen. Wir konnten nach subkutanen Gaben von Cyclopamin bei zwei Ptc ^{+/+} Mäusen mit Medulloblastomen keine Veränderungen der Tumorgöße, der Anzahl von Apoptosen oder proliferierenden Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Mäusen feststellen. Eine verstärkte Differenzierung der Tumorzellen durch Cyclopamin konnte mittels NeuN-Färbung nicht nachgewiesen werden. Aussagen über unerwünschte Wirkungen bei den durchgeführten Applikationen mit Etoposid oder Cyclopamin sind aufgrund des rapiden Krankheitsverlaufs und den schweren Symptomen nicht zu treffen. Sanchez et al. (2005) beobachteten keine toxischen Effekte bei der angewandten Dosierung von Cyclopamin, obwohl Hedgehog-Signale in vielen Organsystemen beteiligt sind. Unerwünschte Effekte von Cyclopamin müssen sicherlich noch genauer untersucht werden. Bei weiteren Versuchen könnte auch eine Kombination von Zytostatikum und Signalweg-spezifischen Substanzen appliziert werden. Mögliche Synergismen könnten die Erfolge der Therapien verbessern und die Nebenwirkungen der einzelnen Substanzen mindern.

4.4.1 Kombination von Zytostatika und Signalweg-spezifischen Substanzen

Dieses konnten wir *in vitro* anhand der murinen Medulloblastom-Zelllinie SJMM4 durchführen. Es ist bekannt und konnte von uns bestätigt werden, dass sowohl Cyclopamin als auch Etoposid die Proliferation von Tumorzellen *in vitro* hemmen (Taipale et al., 2000). Bei der Kombination der Substanzen stellten wir bei einigen Konzentrationen eine Verstärkung der antiproliferativen Wirkung fest. Shafae et al. (2006) untersuchten die Wirkung von Kombinationen mit Cyclopamin auf Hedgehog-exprimierende Pankreas-Karzinom-Zellen. Eine Kombination mit dem Mitosegift Paclitaxel oder Bestrahlung führte zu einer Steigerung der zytotoxischen Effekte. Bei einer Kombination mit Cisplatin oder dem Anitmetabolit Gemcitabin konnte dies nicht gezeigt werden. Nach *in vivo* Versuchen an einem Pankreas-Karzinom Modell wurde von Ischenko et al. (2008) formuliert, dass Cyclopamin die Resistenz von Tumorzellen gegenüber 5-Fluoruracil (Antimetabolit) verringern kann. Die Arbeitsgruppe berichtet zudem, dass der Anteil der CD133-positiven Zellen bei den resistenten Zelllinien höher ist als bei den Parentalzelllinien, was darauf hindeutet, dass beide Fraktionen eine unterschiedliche Sensibilität auf antiproliferative Substanzen haben.

4.5 Bedeutung von Prominin-positiven Zellen in Tumoren

Mit dem Nachweis des CD133-Proteins auf Zellen in Hirntumoren stellte sich die Frage nach der Funktion und den Eigenschaften dieser Zellpopulation. "Tumorstammzellen" konnten bei einer Vielzahl von Tumoren identifiziert werden, darunter Pankreaskarzinome, Prostatakarzinome, Melanome, Brustkrebs, Lungenkrebs, gastrointestinale Tumore und Hirntumore (Medulloblastome, Glioblastome). Untersuchungen zeigten, dass CD133-positive Zellen, isoliert aus humanen Hirntumoren, eine erhöhte Fähigkeit zur Tumorinduktion haben (Singh et al., 2003). Durch das Injizieren von CD133-positiven, humanen Hirntumorzellen in Gehirne von immundefizienten Mäusen konnten Tumore produziert werden, die den Phänotyp des Ursprungstumors abbildeten. Dahingegen konnten CD133-negative Zellen keinen Tumor erzeugen (Singh et al., 2004). Unsere Versuche legen die Vermutung nahe, dass die Proliferation der Prominin-negativen Zellen der Linie SJMM4 durch Etoposid oder Cyclopamin stärker gehemmt wird als die der Prominin-positiven Fraktion. Der Unterschied der Proliferationshemmung zwischen der positiven und negativen Fraktion war größer bei der Behandlung mit Etoposid (bei den Einzelsubstanzen C1 bis C3 betrug der Unterschied im Mittel 35,6%, bei V1 bis V3 im Mittel 41,5%). Diese Aussagen sind als Vermutungen zu werten, da keine Überprüfung der Effizienz der magnetischen Separation und keine Kontrolle nach einwöchiger Inkubation durchgeführt wurde. Blazek et al. (2007) berichten von *in vitro* Versuchen an Daoy-Zellen (humane Medulloblastom-Zelllinie), dass sich aus der CD133-positiven Fraktion nach 18 Tagen das ursprüngliche Verhältnis der Populationen zuvor bildet, während die CD133-negative Fraktion negativ bleibt. Anhand von Glioblastomzellen konnten Liu et al. (2006) bei der CD133-positiven Fraktion eine erhöhte Chemotherapieresistenz (einschließlich Etoposid) nachweisen, wahrscheinlich verursacht durch erhöhte Expression von BCRP1, MGMT und Apoptose-hemmenden Faktoren. Außerdem wurde gezeigt, dass die Expression von CD133 bei rezidierten Glioblastomen höher war als zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Liu et al., 2006).

Wir untersuchten anhand der Zelllinie SJMM4 die beiden Prominin-Fraktionen auf die Verteilung in Zellzyklusphasen. Der Anteil der Prominin-positiven Zellen in den S/G2/M-Phasen war höher als der der negativen Zellen. Dies ist überraschend, da Stammzellen sich meist in der G0-Phase befinden. Damit steht die vermutete, erhöhte Chemotherapieresistenz nicht in Zusammenhang mit einem selteneren Eintreten in den Zellzyklus. Bei Daoy-

Medulloblastomzellen wurde von gleichen Anteilen in den Zellzyklusphasen berichtet (Blazek et al., 2007). Über die Wirkung von Cyclopamin auf die Stammzell-ähnliche Fraktion von Hedgehog-Signal abhängigen Gliomzellen wird vermutet, dass ihr Wachstum gehemmt werden kann. Eine Bildung von Neurosphären konnte unterdrückt werden (Bar et al., 2007; Clement et al., 2007). Für die Entwicklung einer Therapie, die auch oder besonders auf Stammzell-ähnliche Tumorzellen abzielt, wird es wichtig sein, weitere Faktoren zu identifizieren, die die Expression von CD133 beeinflussen. Interessanterweise konnte durch eine *in-vivo* Passage mit Glioblastomzellen die Expression von CD133 hochreguliert werden (Wang et al., 2008). Auch durch Hypoxie konnte anhand von Daoy-Zellen die Expression von CD133 gesteigert werden (Blazek et al., 2007). Außerdem müssen zusätzliche Marker gefunden werden, um Tumorzellen mit unterschiedlichen Eigenschaften auch innerhalb der CD133-positiven Fraktion zu identifizieren.

In dieser Arbeit konnten wir Methoden und Anwendungen aufzeigen, die es ermöglichen, das Ptc^{+/-} Maus-Modell für therapeutische Substanzapplikationen zu nutzen. Es konnten die Wirkungen sowohl von dem Zytostatikum Etoposid als auch von dem in den Shh-Ptch Signalweg eingreifenden Cyclopamin auf manifeste, ausgeprägte Medulloblastome analysiert werden. Durch Magnet-Resonanz-Bildgebung konnte eine nicht invasive und genaue Verlaufsdokumentation ermöglicht werden. Ergänzend wurden Zellkulturversuche durchgeführt, die zukünftig auch an einer neu generierten Maus-Medulloblastomlinie stattfinden können. Proliferin- bzw. CD133-positve Tumorzellen konnten *in vivo* und *in vitro* identifiziert werden und bieten neue experimentelle Ansätze, um zytotoxische Wirkungen zu analysieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Medulloblastome sind die häufigsten malignen Hirntumore bei Kindern. Trotz einer Kombination aus operativer, Bestrahlungs- und Chemotherapie kann nur bei 50-70% der Patienten ein ereignisfreies Überleben über 5 Jahre erzielt werden. Die aktuelle Therapie verursacht bei einem großen Teil der Patienten schwere Langzeitschäden. Angesichts dieser Situation ist es dringend erforderlich, neue Therapieoptionen zu erforschen. Dabei wird eine große Hoffnung mit der Entwicklung von Medikamenten verbunden, die spezifisch auf essentielle molekulare Prozesse der Tumore einwirken. Die Identifikation und Charakterisierung von Tumorstammzellen haben eine enorme Bedeutung für das Verstehen der Tumorgenese und Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien. Ptc ^{+/-} Mäuse entwickeln spontan Medulloblastome und stellen ein immunkompetentes Tiermodell für präklinische Charakterisierung von Substanzen dar.

In dieser Arbeit wurden Methoden evaluiert, die es ermöglichen, die Wirkung von Substanzen auf Medulloblastome *in vivo* mit dem Ptc ^{+/-} knockout Maus-Modell zu analysieren. Eine genaue Verlaufsdokumentation konnte durch die intravitale Magnetresonanztomographie ermöglicht werden. Wir führten an Maus-Medulloblastomen histologische Färbungen zur Darstellung von Proliferation, Apoptose, Differenzierung und dem Stammzellmarker Prominin durch. Ergänzend wurden *in vitro* Versuche an einer murinen Ptc ^{+/-} Medulloblastomlinie durchgeführt. Es konnten darüber hinaus erste Erkenntnisse über das Signalweg-spezifisch wirkende Cyclopamin gewonnen werden. Wir konnten allerdings bei Applikation von Cyclopamin allein keine Verringerung des Wachstums oder eine verstärkte Differenzierung bei manifester Tumorerkrankung feststellen. Unsere Zellkulturversuche erbrachten bei der Kombination von Cyclopamin und Etoposid bei einigen Konzentrationen eine Wirkungsverstärkung. In Zukunft muss auch die Kombination von Cyclopamin und Chemotherapeutika *in vivo* analysiert werden, um mögliche Synergien zu bestätigen. Wir konnten Prominin-positive Zellen an histologischen Schnitten von Ptc ^{+/-} Tumoren und innerhalb der Zelllinie SJMM4 darstellen. Die Zellzyklusanalyse zeigte, dass Prominin-positive Zellen der Linie SJMM4 häufiger als negative im Zellzyklus anzutreffen sind. Signalweg-spezifische Wirkstoffe stellen eine wichtige Perspektive für zukünftige Therapieoptionen dar.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Altersabhängigkeit der Tumorentstehung	22
Abbildung 2. Photos von Mäusen mit Medulloblastom und Rhabdomyosarkom	23
Abbildung 3. HE-gefärbter Paraffinschnitt des Gehirns von Maus 3.	25
Abbildung 4. Proliferationsfärbung an Kleinhirnschnitten (Tec3)	26
Abbildung 5. Apoptosefärbung an Kleinhirnschnitten (Caspase 3, aktiviert).....	27
Abbildung 6. Differenzierungsfärbung an Kleinhirnschnitten (NeuN).....	28
Abbildung 7. Schnitte eines Rhabdomyosarkoms und eines Hämangioms	28
Abbildung 8. MRT-Bilder im Vergleich zu HE-gefärbten Kleinhirnschnitten	30
Abbildung 9. Veränderung der Proliferation der Zelllinie SJMM 4 durch Cyclopamin und Etoposid nach magnetischer Zellseparation.	31
Abbildung 10. Bild der Zelllinie D2855.....	33
Abbildung 11. Darstellung von Prominin-positiven Zellen der Linie SJMM4 und DNA-Gehalt mittels FACS.....	34
Abbildung 12. Promininfärbung an Gefrierschnitten.....	36

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. Histologische Analyse von Proliferation und Apoptose an Gehirn- schnitten der Mäuse nach Applikation von Etoposid oder Cyclopamin.....	24
--	----

LITERATUR

Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, Piccirillo S, Vescovi AL, DiMeco F, Olivi A, Eberhart CG. Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells* 2007; 25: 2524-2533

Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM, Beachy PA. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 2002; 30: 1559-1561

Blazek ER, Foutch JL, Maki G. Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 67: 1-5

Bleyer WA. Epidemiologic impact of children with brain tumors. *Childs Nerv Syst.* 1999; 15: 758-763

Brown HG, Kepner JL, Perlman EJ, Friedman HS, Strother DR, Duffner PK, Kun LE, Goldthwaite PT, Burger PC. Large cell/anaplastic medulloblastomas: a Pediatric Oncology Group Study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 857-865

Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* 2002; 16: 2743-2748

Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking sonic hedgehog gene function. *Nature* 1996; 383: 407-413

Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A. Hedgehog-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal and tumorigenicity. *Curr Biol* 2007; 17: 165-172

Ecke I, Rosenberger A, Obenauer S, Dullin C, Aberger F, Kimmina S, Schweyer S, Hahn H. Cyclopamine treatment of full-blown *Hh/Ptch*-associated RMS partially inhibits Hh/Ptch signaling, but not tumor growth. *Mol Carcinog* 2008; 47: 361-372

Ellison DW, Onilude OE, Lindsey JC, Lusher ME, Weston CL, Taylor RE, Pearson AD, Clifford SC. Beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: The united kingdom children's cancer study group brain tumour committee. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 7951-7957

Evans DG, Farndon PA, Burnell LD, Gattamaneni HR, Birch JM. The incidence of gorlin syndrome in 173 consecutive cases of medulloblastoma. *Br J Cancer* 1991; 64: 959-961

Fomchenko EI, Holland EC. Mousemodels of braintumors and their applications in preclinical trials. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5288-5297

Giangaspero F, Perilongo G, Fondelli MP, Brisigotti M, Carollo C, Burnelli R, Burger PC, Garre ML. Medulloblastoma with extensive nodularity: a variant with favorable prognosis. *J Neurosurg* 1999; 91: 971-977

Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 1997; 277: 1109-1113

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B,

Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B, Bale AE. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996; 85: 841-851

Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001; 15: 3059-3087

Ischenko I, Seeliger H, Camaj P, Buske C, Jauch KW, Bruns CJ. Tumor stem cell targeted therapy with Rapamycin and Cyclopamine reverts chemoresistance towards 5-Fluorouracil in human pancreatic carcinoma cells. *Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, Springer Berlin Heidelberg, 2008*

Kaatsch P, Rickert CH, Kühl J, Schüz J, Michaelis J. Population-based epidemiologic data on brain tumors in German children. *Cancer*. 2001; 92: 3155-3164

Kortmann RD, Kühl J, Timmermann B, Mittler U, Urban C, Budach V, Richter E, Willich N, Flentje M, Berthold F, Slave I, Wolff J, Meisner C, Wiestler O, Sörensen N, Warmuth-Metz M, Bamberg M. Postoperative neoadjuvant chemotherapy before radiotherapy as compared to immediate radiotherapy followed by maintenance chemotherapy in the treatment of medulloblastoma in childhood: results of the german prospective randomized trial HIT '91. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46: 269-279

Lee A, Kessler JD, Read TA, Kaiser C, Corbeil D, Huttner WB, Johnson JE, Wechsler-Reya RJ. Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci* 2005; 8: 723-729

Li L, Connelly MC, Wetmore C, Curran T, Morgan JI. Mouse embryos cloned from brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63: 2733-2736

Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, John S Yu JS. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133⁺ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006; 5: 62

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO classification of tumors of the central nervous system. IARC Press, Lyon, 2007

MacDonald TJ, Rood BR, Santi MR, Vezina G, Bingaman K, Cogen PH, Packer RJ. Advances in the diagnosis, molecular genetics, and treatment of pediatric embryonal CNS tumors. *The Oncologist* 2003; 8: 174–186

Nelson AL, Algon SA, Munasinghe J, Graves O, Goumnerova L, Burstein D, Pomeroy SL, Kim JYH. Magnetic resonance imaging of patched heterozygous and xenografted mouse brain tumors. *J Neurooncol* 2003; 62: 259-267

Oliver TG, Read TA, Kessler JD, Mehmeti A, Wells JF, Huynh TTT, Lin SM, Wechsler-Reya RJ. Loss of *patched* and disruption of granule cell development in a pre-neoplastic stage of medulloblastoma. *Development* 2005; 132: 2425-2439

Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn J, Sorensen N, Berthold F, Henk B, Schmandt N, Wolf HK, von Deimling A, Wainwright B, Chenevix-Trench G, Wiestler OD, Wicking C. Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of *Drosophila patched*. *Cancer Res* 1997; 57: 2085-2088

Ribi K, Rely C, Landolt MA, Alber FD, Boltshauser E, Grotzer MA. Outcome of medulloblastoma in children: lon-term complications and quality of live. *Neuropediatrics* 2005; 36: 357-365

Rutkowski S. AWMF online, 2006. Medulloblastom im Kindes- und Jugendalter. Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie. <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/025-009.htm> (Zugriffsdatum 31.05.2009)

Sanchez P, Ruiz i Altaba A. In vivo inhibition of endogenous brain tumors through systemic interference of Hedgehog signaling in mice. *Mech Dev* 2005; 122: 223-230

Shafae Z, Schmidt H, Du W, Posner M, Weichselbaum R. Cyclopamine increases the cytotoxic effects of paclitaxel and radiation but not cisplatin and gemcitabine in Hedgehog expressing pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58: 765-770

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63: 5821-5828

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401

Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, Scott MP, Pennica D, Goddard A, Phillips H, Noll M, Hooper JE, de Sauvage F, Rosenthal A. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for sonic hedgehog. *Nature* 1996; 384: 129-134

Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP, Beachy PA. Effects of oncogenic mutations in smoothed and patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 2000; 406: 1005-1009

Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of smoothed. *Nature* 2002; 418: 892-896

Tallen G, Yiallourous M, Rutkowski S. Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2007. Medulloblastom und supratentorieller primitiv neuroektodermaler Tumor. http://www.kinderkrebsinfo.de/e9031/e10566/e16325/index_ger.html
(Zugriffsdatum: 31.05.2009)

Thayer SP, Pasca di Magliano M, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernández-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003; 425: 851-856

Wallace VA. Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* 1999; 9: 445-448

Wang J, Sakariassen P, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Bøe SO, Svendsen A, Prestegarden L, Røslund G, Thorsen F, Stuhr L, Molven A, Bjerkvig R, Enger P. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 2008; 122: 761-768

Wechsler-Reya RJ. Analysis of gene expression in the normal and malignant cerebellum. *Recent Prog Horm Res* 2003; 58: 227-248

Wechsler-Reya RJ, Scott MP. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 1999; 22: 103-114

Wechsler-Reya RJ, Scott MP. The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24, 385-428

Wetmore C, Eberhart DE, Curran T. The normal *patched* allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line mutation of *patched1*. *Cancer Research* 2000; 60: 2239–2246

Wetmore C, Eberhart DE, Curran T. Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for *patched*. *Cancer Res* 2001; 61: 513-516

Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Bluhmke I. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 1167-1171

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Pietsch bedanken für die Möglichkeit und Betreuung meiner Dissertation. Prof. Dr. Bode möchte ich danken für Rat und Unterstützung auch außerhalb meiner Dissertation. Den Mitarbeitern der Neuropathologie möchte ich danken, im Besonderen Frau Denkhaus, Frau Milde und Dr. Hartmann. Für die Betreuung und Versorgung der Tierzucht gebührt Herrn Wilke und Mitarbeitern großer Dank. Im Max Planck Institut für neurologische Forschung in Köln wurde freundlicherweise die Durchführung der MRT-Untersuchungen von Dr. Wiedermann und Dr. Hoehn ermöglicht. Die FACS Experimente wurden durch Herrn Endl und Herrn Wurst (Institut für Molekulare Medizin und Immunologie der Universitätsklinik Bonn) ermöglicht. Der Firma Miltenyi Biotec möchte ich für die Bereitstellung der Prominin-Antikörper danken. Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen Geschwistern Martin und Anna bedanken.