

Aus dem Institut für Pathologie, Abteilung Neuropathologie

Direktor: Prof. Dr. A. Pagenstecher



des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg in  
Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg  
GmbH, Standort Marburg

## **„Glioblastoma in a dish“ – Die Etablierung eines Mausmodells für das sekundäre Glioblastom**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Josefine Radke**

aus Berlin

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 14.06.2011  
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Rothmund

Referent: Prof. Dr. Pagenstecher

1. Korreferent: Prof. Dr. Suske

*- Für meine lieben Eltern -*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Primäre Tumoren des zentralen Nervensystems	1
1.2 Glioblastoma multiforme	2
1.2.1 Histologie	2
1.2.2 Molekulargenetik	3
1.3 Tumorprotein 53 (TP53)	5
1.4 EGFR/PTEN/Akt Signalweg	7
1.5 Proto-Onkogen c-Myc	9
1.6 Tumormodelle für das Glioblastoma multiforme	10
1.7 Stammzellmarker	11
1.8 Zielsetzungen der Arbeit	13
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien	14
2.1.1 Zellkultur	14
2.2 Allgemeine Puffer, Lösungen, Kulturmedium	14
2.2.1 Zellkultur	15
2.3 Versuchstiere	16
2.3.1 Tp53 knockout Mauslinie	16
2.4 Ermittlungen des Genotyps der Tiere	16
2.4.1 PK-Verdau	16
2.4.2 DNA-Isolierung	17
2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
2.4.4 DNA Gelelektrophorese	19
2.5 Retrovirale Expressionsvektoren	19
2.5.1 Z-kompetente Bakterien	20
2.5.1.1 Herstellung der Agarplatten	20
2.5.1.2 Transformation	20

## INHALTSVERZEICHNIS

2.5.1.3 Vorkulturen	21
2.5.2 Maxi-Präparation der retroviralen Expressionsvektoren	21
2.6 Zellkulturen	22
2.6.1 Primäre Astrozytenkulturen	22
2.6.2 Phoenix-ECO Zellen (Verpackungszelllinie)	23
2.6.2.1 Einfrieren der Phoenix-ECO Zellen	23
2.6.2.2 Transfektion der Phoenix-ECO Zellen	24
2.6.3 Retrovirale Infektion und Selektion der Astrozyten	25
2.6.3.1 Beobachten der infizierten Astrozyten	27
2.6.3.2 Passagieren der infizierten Astrozyten	27
2.6.3.3 Coverslips/ Fixierung der Astrozyten	27
2.7 Zytochemie	28
2.7.1 Fluoreszenzimmunzytochemie	28
2.7.2 Immunzytochemie	29
2.8 Stereotaxie	30
2.8.1 Vorbereitung der Astrozyten	30
2.8.2 Operation	30
2.9 Gehirnsektionen	32
2.9.1 Kryostatschnitte	32
2.9.1.1 Hämatoxylin-Eosinfärbung (HE-Färbung)	33
2.9.1.2 Immunhistochemie	33
2.10 Versuche mit Plasmid-DNA	34
2.10.1 Primerdesign	34
2.10.2 Linearisierung des pBabe-Puromycin-MycWT-Vektor	35
2.10.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.10.4 SB-Gelelektrophorese	36
2.10.5 Phenol/Chloroform Extraktion	37
2.10.6 Restriktionsverdau	37
2.10.7 TAE- Gelelektrophorese	38
2.10.8 Aufreinigung der Gelfragmente	38
2.10.9 Ligation	38
2.10.10 Transformation Z-kompetenter Bakterien	39

## INHALTSVERZEICHNIS

2.10.11 Mini-Präparation (Mini-Prep) und Restriktionsverdau	39
2.10.12 Maxi-Präparation (Maxi-Prep)	40
2.11 Versuche mit RNA	41
2.11.1 RNA- Isolierung	41
2.11.2 RNase Protection Assay	41
2.11.2.1 Herstellung der radioaktiv markierten Sonden	41
2.11.2.2 Einzelsondentest	42
2.11.2.3 Sondenset	42
2.11.2.4 DNase Verdau	43
2.11.2.5 Phenol/Chloroform-Extraktion und RNA Fällung	43
2.11.2.6 Szintillationsmessung und Ansatz der Working Dilution	44
2.11.2.7 Hybridisierung, RNase Behandlung, Proteinase-K Verdau	45
2.11.2.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>48</b>
3.1 Mausmodell	48
3.2 Genotypisierung	48
3.3 Transfektion der Phoenix-Zellen	49
3.4 Infektion der Tp53 knockout-Astrozyten	50
3.5 Phänotypische Veränderungen der infizierten Tp53-knockout-Astrozyten	51
3.6 GFAP-Expression	54
3.6.1 GFAP-Expression von Bl6- und p53 <sup>KON</sup> -Astrozyten	54
3.6.2 GFAP-Expression infizierter Astrozytenkulturen	55
3.7 Proliferation der Astrozytenkulturen	59
3.7.1 Ki67-Expression	59
3.7.2 Passagen	64
3.7.3 Kulturplatten	65
3.7.4 Zellzahl	66
3.8 Immortalisierung und Apoptose	68
3.9 mRNA-Expression neuronaler und glialer Marker	69
3.9.1 Quantitative Analyse und Auswertung der RPA	72

## INHALTSVERZEICHNIS

3.10 Expression neuronaler Stammzellmarker _____	73
3.11 Stereotaktische Implantation von Tumoren _____	76
3.12 Immunhistochemische Färbung der implantierten Tumoren _____	79
<b>4. Diskussion _____</b>	<b>83</b>
4.1 Eignet sich eine p53 knockout-Mauslinie bzw. primäre p53 knockout-Astrozyten zur Etablierung eines Mausmodells für das sekundäre Glioblastom? _____	83
4.2 Sind Akt und c-Myc potentielle Onkogene zur Induktion von Gliomen? _____	85
4.3 Kann durch die Überexpression der Onkogene eine Entdifferenzierung der Astrozyten erreicht werden? _____	87
4.4 Kann durch die Überexpression der Onkogene Akt und Myc die Expression von Stammzellmarkern hervorgerufen werden? _____	89
4.5 Handelt es sich bei den entstandenen Tumoren um eine Glioblastoma-ähnliche Läsion? _____	93
4.6 Aussichten _____	96
<b>5. Summary _____</b>	<b>97</b>
<b>6. Zusammenfassung _____</b>	<b>99</b>
<b>7. Literaturverzeichnis _____</b>	<b>101</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis _____</b>	<b>113</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis _____</b>	<b>118</b>
<b>10. Danksagung _____</b>	<b>120</b>
<b>11. Verzeichnis akademischer Lehrer _____</b>	<b>121</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Primäre Tumoren des zentralen Nervensystems

Die primären Tumoren des zentralen Nervensystems gehören mit 2-3% zu den seltenen Tumorarten. Im Kindesalter stellen sie jedoch nach den Leukämien die zweithäufigste Tumorerkrankung dar (75). Es handelt sich bei diesen Tumoren um eine sehr heterogene Gruppe gutartiger, sowie bösartiger Neoplasien. Die größte Gruppe bilden die Gliome. Diese werden durch die WHO (World Health Organisation)-Klassifikation histologisch näher eingeordnet und charakterisiert (62). Die Klassifikation beschreibt vor allem die Dignität der Tumoren, wobei benigne (WHO-Grad I) von malignen (WHO-Grad IV) unterschieden werden. Dabei richtet sich die Aufmerksamkeit auf zelluläre Kriterien wie Zell- und Kernatypien, mitotische Aktivität, Gefäßproliferation oder Nekrosen. Die große Gruppe der Gliome wird wiederum unterschieden in astrozytäre, oligodendrogliale und ependymale Tumoren. Ein mit WHO-Grad IV klassifizierter astrozytärer Tumor ist das Glioblastom (Glioblastoma multiforme). Dieser Tumor ist verantwortlich für etwas mehr als 50% aller primären ZNS-Gliome (siehe Abb. 1. 1) und höchst maligne (11).

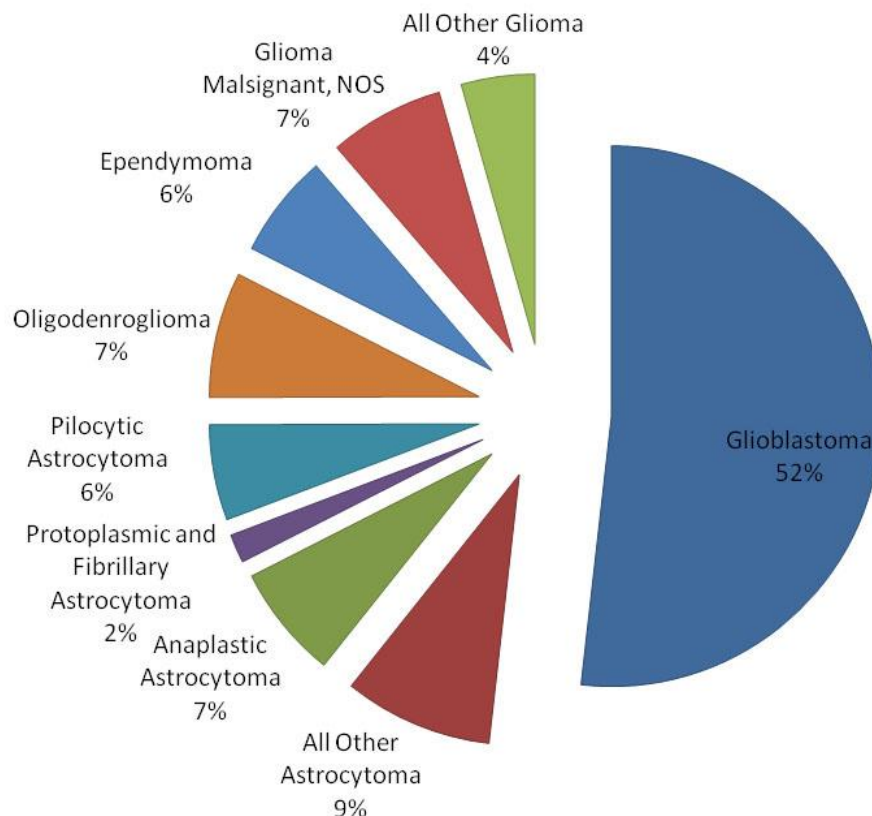


Abb. 1.1: Verteilung histologischer Subtypen primärer ZNS-Gliome (11).



## 1.2 Glioblastoma multiforme

Bei dem Glioblastom handelt es sich um einen sehr malignen Tumor mit infauster Prognose. Die Ätiologie dieser Erkrankung ist noch unbekannt und es mangelt an suffizienten Therapien. Die meisten Patienten versterben bereits im ersten Jahr nach Diagnosestellung (18; 76).

Es wird zwischen primären und sekundären Glioblastomen unterschieden. Das primäre Glioblastom entwickelt sich völlig neu (*de novo*). Es gibt weder radiologische, noch histologische Hinweise auf einen vorausgegangenen weniger malignen Tumor (47). Im Gegensatz dazu, entwickelt sich das sekundäre Glioblastom durch Progression eines niedriggradigen oder anaplastischen Astrozytoms. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 45 Jahren (76). Abgesehen von der Epidemiologie, ist auch die Tumorbiologie beider Erkrankungen sehr verschieden. Das Glioblastom ist bevorzugt in den Großhirnhemisphären, insbesondere frontotemporal, lokalisiert. Makroskopisch zeichnen sich diese Tumoren durch eine bunte Schnittfläche aus. Charakteristisch sind gelbliche Nekrosen, Blutungen, grau-weiß aussehendes Tumorgewebe und diffuses infiltrierendes Wachstum. Histologisch können beide Tumorentitäten nicht voneinander unterschieden werden.

### 1.2.1 Histologie

Histologisch handelt es sich um polymorphe, zellreiche, mitotisch sehr aktive Tumoren. Typisch sind mehrkernige Riesenzellen und flächenhafte oder strichförmige Nekrosen, um die sich Tumorzellkerne radiär anordnen. Dieses wird als Palisadenstellung der Kerne bezeichnet und ist in Abb. 1.2. A und B durch Pfeile gekennzeichnet.

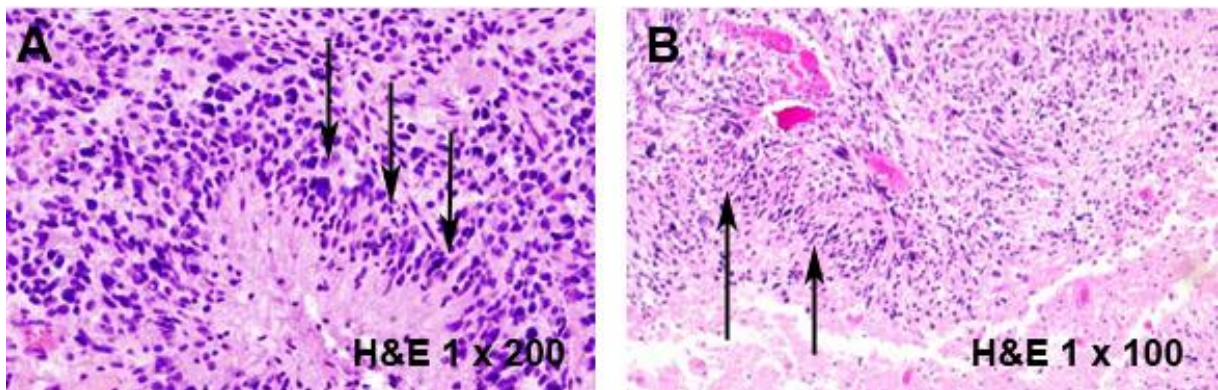


Abb. 1.2. Zellreiche, undifferenzierte Tumoren (Glioblastoma multiforme) (118)

====> Palisadenartige Anordnung der Tumorzellen

Weiterhin charakteristisch sind ausgeprägte Gefäßproliferate (siehe Abb. 1.3 B) sowie polymorphe, chromatinreiche Zellkerne (siehe Abb. 1.3. A)

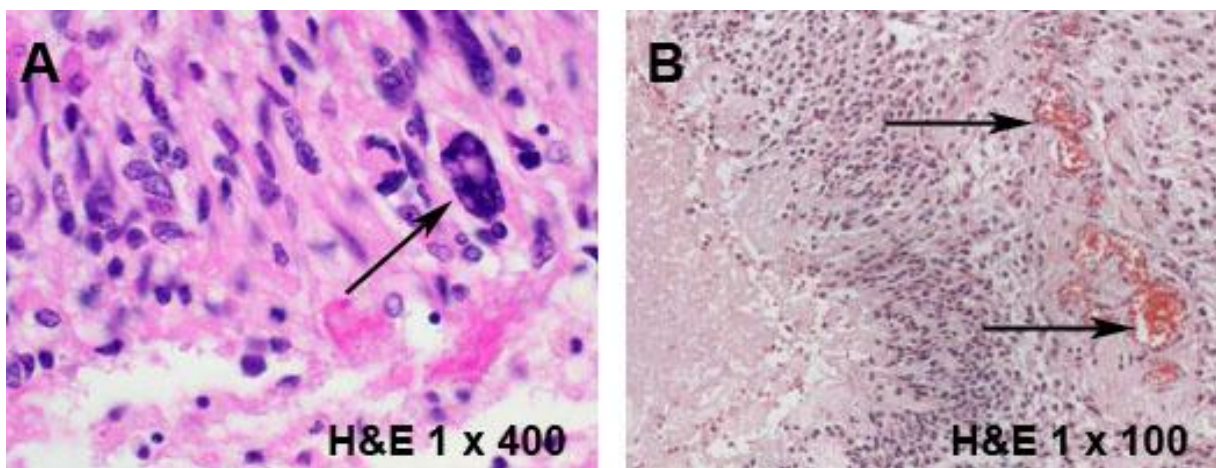


Abb. 1.3. Glioblastoma multiforme (Histologische Präparate) (118)

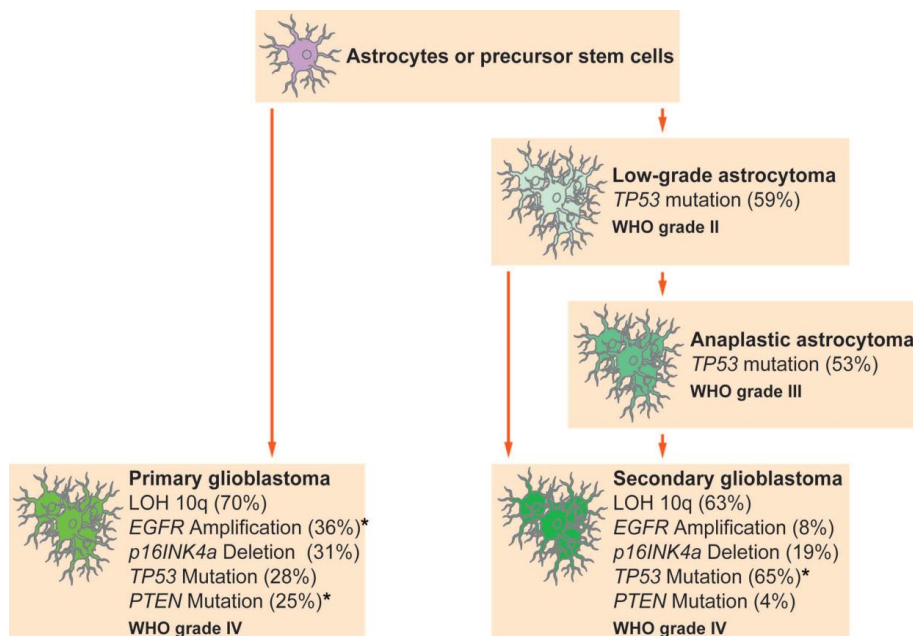
A : ====> chromatinreicher Zellkern  
B : ====> Gefäßproliferationen

### 1.2.2 Molekulargenetik

Primäre und sekundäre Glioblastome zeichnen sich durch unterschiedliche Verteilungsmuster genetischer Alterationen aus, die zytogenetisch durch strukturelle Chromosomenaberrationen sowie Veränderungen des Karyotyps charakterisiert sind. Der Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 10 ist eine der häufigsten genetischen Aberrationen des Glioblastoms (34; 74). Während primäre Glioblastome häufig einen völligen Verlust eines Chromosoms aufweisen, handelt es sich beim sekundären

Glioblastom eher um einen Verlust von Teilen des langen Arms (q) des Chromosoms 10 (29). Weitere für das primäre Glioblastom typische genetische Aberrationen sind die Amplifikation des CDK4 (56), sowie des EGF-Rezeptors (58; 90; 101) und die Überexpression der Gene MDM2 (85) und MDM4. Charakteristisch sind auch homozygote Deletionen der Gene CDKN2A, p16<sup>INK4a</sup> (7; 99) und RB1, sowie Mutationen des PTEN-Gens (50). Mutationen dieses Gens werden beim sekundären Glioblastom nur selten beobachtet (47). Sekundäre Glioblastome zeichnen sich vor allem durch Mutationen des TP53-Gens aus (32; 51; 115). Ebenfalls gehäuft treten auf: Allelverluste der Chromosomen 13q (76), 19q (70) und 22q (72), sowie Promotorhypermethylierungen der Gene RB1 (71), O6-MGMT (25) und TIMP-3 (72). Sekundäre und primäre Glioblastome zeigen also verschiedene genetische Veränderungen. Die funktionellen und molekularen Verluste, sowie Mutationen betreffen jedoch die gleichen intrazellulären Signalwege. Es handelt sich dabei besonders um den TP53/MDM2/p14arf-, p16INK4a/RB1-, und den EGFR/PTEN/Akt/mTOR- Signalweg (88).

Diese, in der Onkologie auch bei anderen Tumoren bekannten Signalwege, spielen eine essentielle Rolle bei der Zellzykluskontrolle, Proliferation und Migration. Glioblastom-typische Mutationen werden zusammenfassend in Abb. 1.4. dargestellt (76).



**Abb. 1.4. Schematische Darstellung der genetischen Veränderungen bei der Entstehung des primären und sekundären Glioblastoms.**

(modifiziert nach P. Kleihues und W.K. Cavanee, 2000 (76))

Wie in der Abbildung ersichtlich, ist der Ursprung beider Entitäten noch ungeklärt. Es ist ungewiss, ob differenzierte Astrozyten oder Vorläuferzellen, sogenannte Glioma stem cells (GSCs), für die Entstehung des Glioblastoms verantwortlich sind. Das Konzept der Tumorstammzellen ist in anderen Disziplinen schon länger Gegenstand der Forschung. Mit der Entdeckung von GSCs und der Genese des Glioblastoms beschäftigt sich die Wissenschaft jedoch erst seit kurzer Zeit (27; 36; 81). So scheint es sich bei diesen Stammzellen um eine kleine Fraktion multipotenter Tumorzellen zu handeln, die zur Selbsterneuerung, asymmetrischer Teilung und Ausreifung zu differenzierten Zellen befähigt sind (19; 83).

Ob diese Zellen aus neuronalen Progenitoren oder aus entdifferenzierten Astrozyten entstehen, bleibt zu klären. Auch ihre Funktion ist nicht vollkommen bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass diese Zellen im Gehirn migrieren und somit eine vollständige Resektion des Tumors unmöglich machen. Es gilt noch herauszufinden, ob GSCs im Mittelpunkt zukünftiger Therapien stehen, um Migration vom Primärfokus oder Wachstum eines Sekundärfokus zu verhindern (76).

### 1.3 Tumorprotein 53 (TP53)

Der TP53/MDM2/p14ARF- Signalweg spielt eine Schlüsselrolle in der Genese des sekundären Glioblastoms. Durch aktivierte Onkogene (z.B. Myc, Ras) oder genotoxischen Stress kommt es zu einer Induktion des zellulären Proteins p14(19)<sup>ARF</sup> (schematisch dargestellt in Abb. 1.5.). Dieses Protein bindet an den Komplex aus MDM2 (murin double minute Onkogen) und p53 und verhindert die MDM2-vermittelte Degradation von p53 (84; 98).

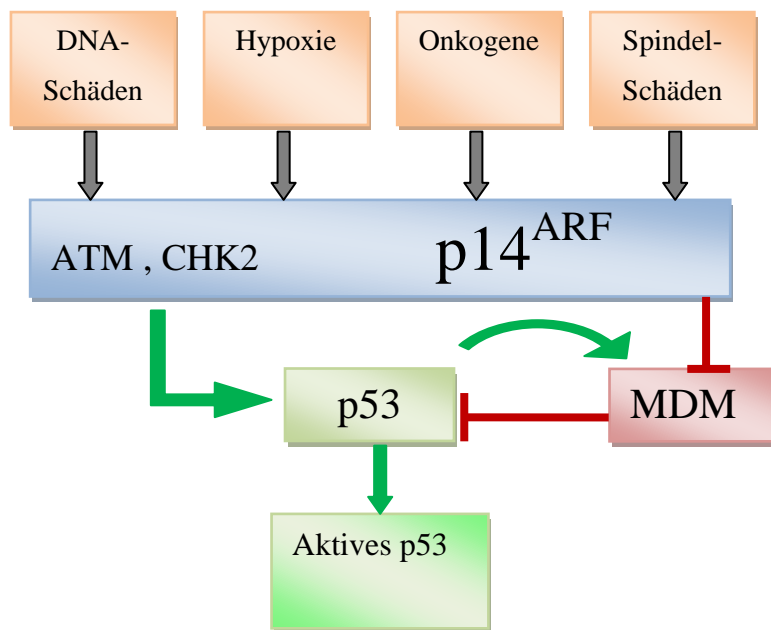
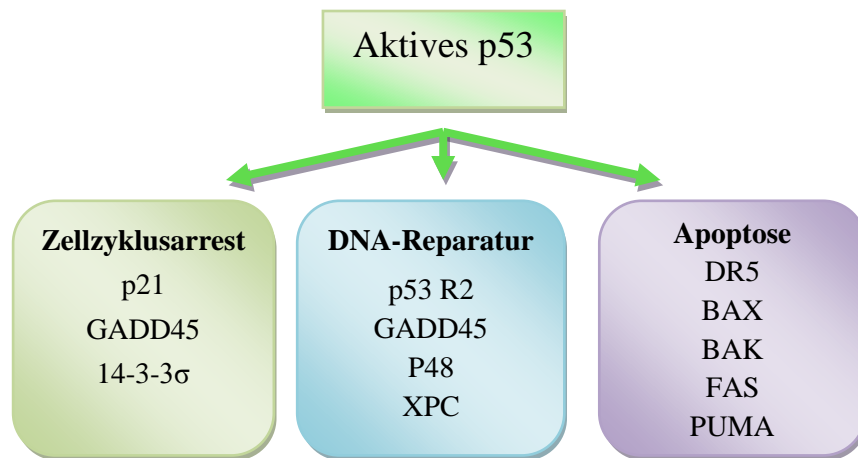


Abb. 1.5. Aktivierung von p53 via p14(19)<sup>ARF</sup>

In vielen sekundären Glioblastomen können inaktivierende p53-Mutationen nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um eine frühe genetische Aberration, die bereits in vielen niedriggradigen Astrozytomen detektierbar ist (110). Meist sind die Kodons 248 und 273 betroffen (76). Die frühe Mutation des TP53-Gens scheint eine bedeutende Rolle in der tumorigenen Entwicklung des sekundären Glioblastoms zu spielen. Dieses wird bei näherer Beleuchtung der Funktion des TP53-Gens verständlich. Es handelt sich um einen Tumorsuppressor, der durch zellulären Stress, wie DNA-Schäden oder Hyperproliferation aktiviert wird (106). Aktiviertes p53 reguliert die Expression vieler Zielgene, die für DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest, Antiangiogenese sowie Apoptose verantwortlich sind (91). Es wird eine Reparatur der geschädigten Zelle bzw. DNA ermöglicht. Ist die Schädigung zu groß und eine Reparatur nicht mehr möglich, induziert p53 unter anderem Komponenten des intrinsischen Apoptosewegs (BAX, BAK (107)) oder bindet an die Promotoren zelltodfördernder Zielgene, wie CD95/FAS (23) (extrinsischer Apoptoseweg). Dieses ist schematisch in Abb. 1.6. dargestellt.



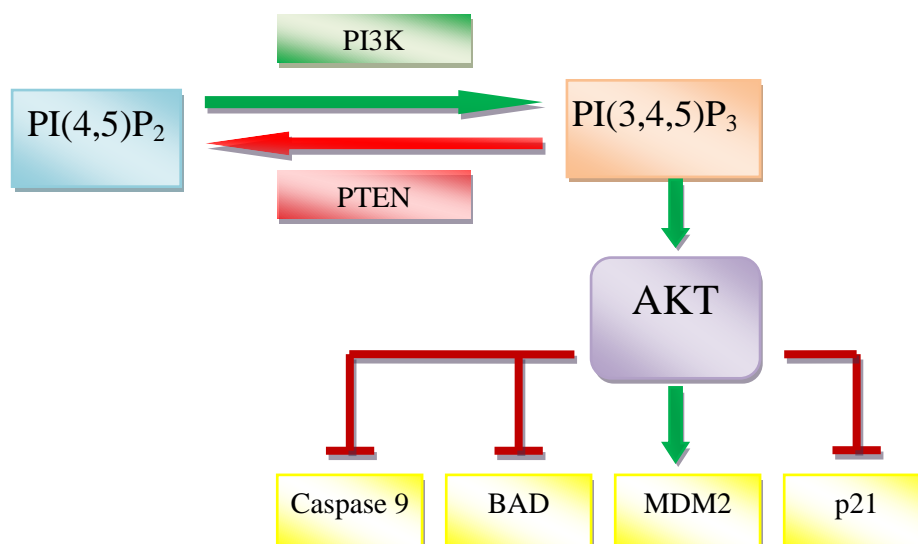
**Abb. 1.6. Zielgene von aktiviertem p53**

Aus einer beeinträchtigten Funktion des p53 folgen ungehemmte Proliferation, genetische Instabilität und eine Aktivierung bzw. Deregulierung bestimmter Onkogene (65). Dieses führt unabhängig von physiologischen Stimuli wiederum zur Proliferation und zum Überleben der Zelle und ermöglicht die Akkumulation von Sekundärmutationen, eine tumorogene Entartung (37) und somit eine maligne Progression niedriggradiger Astrozytome (73). Eine auch diesen Signalweg betreffende Veränderung, ist die Methylierung bzw. Inaktivierung des p14ARF, wie sie in einigen sekundären Glioblastomen beobachtet wird (33). In manchen primären Glioblastomen wird eine Amplifikation des MDM2-Gens beobachtet. Dieses führt neben einer Akkumulation bzw. Überexpression des MDM2 zu einer unverhältnismäßigen Inhibition des p53 (89).

#### 1.4 EGFR/PTEN/Akt Signalweg

Auch dieser Signalweg spielt eine essentielle Rolle in der Entwicklung des Glioblastoms. Wie bereits erwähnt, kann in vielen primären Glioblastomen eine Amplifikation des EGFR (epidermal growth factor receptor) nachgewiesen werden. Aber auch PTEN (Phosphatase and Tensin homologe) ist häufig von Mutationen betroffen. Der Signalweg wird z.B. durch Wachstumsfaktoren stimuliert. Indem bestimmte Faktoren an die extrazelluläre Domäne des EGFR (epidermal growth factor

receptor) binden, werden Phosphoinositol-3-Kinasen (PI3K) aktiviert. Diese wiederum phosphorylieren Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>), welches eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) spielt. Aktiviertes Akt stimuliert über Phosphorylierung weitere Mediatoren, die für Proliferation und Wachstum, sowie Antiapoptose und Angiogenese verantwortlich sind (114). Antiapoptotisch wirkt Akt z.B. über die Inaktivierung des pro-apoptotischen Proteins BAD (Bcl-2-Antagonist of cell death) (48) und der Caspase-9 (10) (siehe Abb. 1.7). Durch Inaktivierung von p21 (CDK-Inhibitor 1) nimmt Akt direkt Einfluss auf den p21-vermittelten Zellzyklusarrest. Des Weiteren verstärkt eine Akt-vermittelte Phosphorylierung von MDM2 die Degradation des Proteins p53 (117). In Anbetracht der antiapoptotischen Wirkung handelt es sich bei Akt um ein potentielles Onkogen.



**Abb. 1.7. Wichtige Zielgene von aktiviertem Akt (PKB).**  
Diese haben Einfluss auf Proliferation, Wachstum und Apoptose.

Ein Antagonist des Onkogens Akt stellt der Tumorsuppressor PTEN (phosphatase and tensin homolog) dar. PTEN katalysiert die Hydrolyse von verschiedenen Phosphorsäureestern und hemmt durch Dephosphorylierung des PIP<sub>3</sub> den PI3K/Akt-Signalweg (100). Auch andere, die Zellteilung und Zellmigration fördernde Signalwege (z.B. MAP-Kinase-Signalweg), werden durch PTEN gehemmt. In Anbetracht der Funktionen des Tumorsuppressors ist es nachvollziehbar, dass in primären sowie sekundären Glioblastomen PTEN-Mutationen nachgewiesen werden können (52).

## 1.5 Proto-Onkogen c-Myc

Bei c-Myc handelt es sich um ein gut bekanntes Proto-Onkogen. Als Helix-loop-helix-Transkriptionsfaktor reguliert es die Transkription bzw. Expression vieler Gene durch Rekrutierung von Histon-Acetyltransferasen. Durch Mutation des c-Myc-Gens kann es zu einer konstitutiven Expression des Proteins kommen. Zielgene, die an zellulären Stoffwechselprozessen und einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt sind, werden folglich verstärkt exprimiert. Da c-Myc besonders die Expression von Schlüsselgenen beeinflusst, die für den Progress des Zellzyklus verantwortlich sind, besitzt das Protein großes onkogenes Potential (22). So aktiviert c-Myc u.a. Cyclin E, welches mit Hilfe von CDK2 (cyclin-dependent kinase 2) für den Übergang von G1- zu S-Phase verantwortlich ist (93). Außerdem reprimiert c-Myc die Expression von p21<sup>CIP1</sup>, ein durch p53 induzierter Inaktivator des CyclinE/CDK2-Komplexes (14). Zusätzlich hemmt c-Myc den Cyclin/CDK-Inhibitor p15<sup>INK4b</sup>, der den CyclinD/CDK4-Komplex inaktiviert (109). Es kommt unabhängig von externen Stimuli, wie Wachstumsfaktoren, zum Eintritt in die S-Phase (Synthesephase). Eine erhöhte Zellproliferation bzw. Zellteilung setzt eine gesteigerte Proteinbiosynthese voraus. Diese wird durch die c-Myc-vermittelte Aktivierung von Translations-Initiatoren, wie eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) und eIF2 $\alpha$ , erreicht (94). Ein Verlust der G1-Kontrolle ist eine Voraussetzung für unabhängiges Zellwachstum und maligne Progression. Durch unkontrollierte Proliferation wird eine Differenzierung der Zelle verhindert. Lassman et al. zeigten, dass auch kultivierte, c-Myc-überexprimierende Astrozyten, einen undifferenzierten Phänotyp aufweisen (57). Eine Deregulierung von c-Myc ist in einer Vielzahl von verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem dem Glioblastom, nachweisbar. Bereits in niedriggradigen und anaplastischen Astrozytomen, nicht aber in normalem Hirngewebe (24), kommt es zu einer Überexpression des Onkogens (79). Es ist vorstellbar, dass die Überexpression von c-Myc maßgeblich in die Pathogenese niedriggradiger Astrozytome involviert ist (43), da c-Myc durch seine universale Einflussnahme auf Zellzyklus, Zellwachstum, Angiogenese und Differenzierung den Weg für eine tumorigene Entstehung ebnet (116).



## 1.6 Tumormodelle für das Glioblastoma multiforme

Um den Zusammenhang zwischen identifizierten genetischen Aberrationen und Tumorgenese zu verstehen, werden Tumormodelle benötigt. Diese sind wichtige Instrumente, um die Biologie des Glioblastoms besser zu verstehen. Aspekte wie Neovaskularisation, Invasion, Migration und Metastasierung lassen sich in der Zellkultur nicht hinreichend erforschen. Vor allem aber geht es um die Entwicklung von Therapiestrategien (17). Um ein realistisches Tumormodell für das Glioblastom zu entwickeln, gab es in der Vergangenheit sehr verschiedene Ansätze, wie die Transplantation von Xeno- und Allografts (49; 53). Dieses Modell basiert auf der Injektion von humanen oder murinen Glioblastom-Zelllinien in Flanke oder Hirn von Nacktmäusen. Die Tiere entwickeln große Tumoren, die histologisch wenig Ähnlichkeit mit humanen Glioblastomen aufweisen (116). Eine weitere Strategie ist die Rekapitulation genetischer Aberrationen von Glioblastomzellen durch die Inaktivierung oder Veränderung bestimmter Gene in somatischen Zellen oder der Keimbahn (31). Effekte von Onkogenen und Tumorsuppressoren, sowie deren Kooperation können so erforscht werden. Eine weitere Möglichkeit somatische Zellen genetisch zu modifizieren, ist die Verwendung retroviraler Vektoren, wie MMLV oder ALV (42; 116). Während MMLV- (moloney murine leukemia virus) Vektoren viele Zellen infizieren können, infiziert das ALV-System nur Zellen, die einen speziellen RCAS-Rezeptor (tv-a) exprimieren (26; 116). Um dieses System zu nutzen, muss jedoch zunächst eine transgene Mauslinie hergestellt werden, die den RCAS-Rezeptor (tv-a) promotorspezifisch (z.B. GFAP-Promotor, Nestin-Promotor) exprimiert. Durch einen solchen RCAS-TVA-abhängigen Gentransfer und eine resultierende Überexpression einer Kombination aus konstitutiv aktivem K-Ras und Akt in neuronalen Progenitoren konnte eine Glioblastomformation beobachtet werden, die histologisch Ähnlichkeit mit humanen Glioblastomen aufweist (41). Dieses gelang mit differenzierten Astrozyten nur durch eine zusätzliche Überexpression von c-Myc (57). Die genannten Modelle sind nützlich, um das Glioblastom und wichtige Signalwege des Tumors kennen- und verstehen zu lernen. Jedoch spiegeln sie die Realität des Tumorgeschehens kaum wider. Das infiltrative Wachstum des Tumors, welches eine komplette Resektion unmöglich macht sowie die Gewebeinvasion und maligne Progression konnten in keinem der Modelle vollständig nachempfunden werden. Während die Genexpression und Mutation

bestimmter Onkogene und Tumorsuppressoren gut verstanden ist, fehlen Kenntnisse über die Herkunft des GSCs und die Gründe für Chemo- und Radioresistenz.

### 1.7 Stammzellmarker

Das zentrale Element neuerer Theorien bezüglich der Krebsentstehung ist die Tumorstammzelle oder auch Tumor-initiiierende Zelle. Diese Zellen können in Tumoren nachgewiesen werden und besitzen spezifische Eigenschaften einer Stammzelle, wie z.B. Differenzierung und Selbsterneuerung (15). Auch in Glioblastomen konnten Krebsstammzellen entdeckt werden. Im Gegensatz zu anderen Stammzelltypen konnten neuronale Stammzellen nicht durch einen spezifischen Zellmarker definiert werden, da ein solcher bisher nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Somit wurden in der Literatur bereits einige Proteine als mögliche Stammzellmarker beschrieben: Musashi-1 (38) (RNA-binding protein), Nestin (82) (Typ IV Intermediärfilament), CD133 (97) (Oberflächenantigen) und Olig2 (60) (Oligodendrocyte transcription factor 2). Bei Nestin handelt es sich um ein Intermediärfilament, welches in frühen Stadien der Entwicklung exprimiert wird. Es wird im Verlauf durch andere Intermediärfilamente ersetzt. Die in der Literatur als potentielle Stammzellmarker für das Glioblastoma multiforme beschriebenen Proteine, sind in Tabelle 1.1 kurz dargestellt.

Marker	Eigenschaften	Physiologische Expression	Pathologische Expression
<b>CD133</b>	auch AC 133 genannt, 97 kDa Glykoprotein, 5 Transmembrandomänen, Zelloberflächenmarker	immature Blutzellen, neurale/embryonale Stammzellne, fetale Leber, niedrige Expression in Pankreas und Niere	mature Blutzellen (Leukämie), Hirntumoren (Glioblastoma multiforme)
<b>Olig2</b>	Oligodendrocyte Transkriptionsfaktor 2, Helix-loop-Helix-Transkriptionsfaktor	Oligodendrozyten, oligodendrozytäre Vorläuferzellen	diffuse Gliome Oligodendrogliome, Astrozytome, Glioblastoma multiforme und gemischte Gliome

<b>Nestin</b>	Typ IV Intermediärfilament	neurale Präkursoren der supraventrikulären Zone, frühe Stadien der Neuro- und Gliogenese, regenerierender Muskel	gliale Narbe nach ZNS-Verletzung, Entdifferenzierung von Zellen
<b>Musashi 1</b>	RNA-Bindungsprotein Sehr konserviert (bereits Vorkommen bei Drosophila), Regulation der Zellteilung von ektodermalen Präkursoren	ektodermalen Präkursoren, proliferierende Neuroblasten, fetale und adulte neurale Stammzellen (NSC)	Glioblastoma multiforme, Malignes Melanom

**Tab. 1.1. Übersicht über die in der Immunzytochemie verwendeten Stammzellmarker.**

## 1.8 Zielsetzungen der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Modells für primäre Hirntumoren in der Maus. Da p53 knockout Astrozyten verwendet wurden, lag der Schwerpunkt der Arbeit auf der Ätiologie des sekundären Glioblastoms.

Primäre Astrozyten aus p53 knockout Mäusen wurden isoliert, kultiviert und mit c-Myc-, sowie Akt- exprimierenden MSCV-Vektoren infiziert. Folgende Fragestellungen ergaben sich:

1. Wie verhalten sich c-Myc-, Akt- bzw. c-Myc/Akt- überexprimierende, primäre p53 knockout Astrozyten in Bezug auf Phänotyp, Proliferation und Differenzierung?
2. Kann durch die Überexpression besagter Onkogene eine Immortalisierung der primären Astrozytenkultur erreicht werden?
3. Entstehen durch stereotaktische Injektion von c-Myc/Akt infizierten Astrozyten in das Striatum von Wildtyp- und RAG 2 knockout Mäusen astrozytäre Tumoren?
4. Kommt es zu einer Entdifferenzierung der infizierten Astrozyten mit Expression von Stammzellmarkern?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien

Puffersubstanzen, Lösungsmittel und andere gängige Laborchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Biozym (Hess. Oldendorf), Ambion, (Austin, TX USA), Fisher Scientific (Nidderau), Promega (Mannheim), Riedel de Haën (Seelze) und Thermo Scientific (Karlsruhe) bezogen. Die Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Pipetten wurden vor allem von den Firmen und Greiner bio-one (Frickenhausen) und Eppendorf (Hamburg), die Objektträger und Deckgläser von Menzel-Gläser (Braunschweig) bezogen.

#### 2.1.1 Zellkultur

Kulturschalen für die Zellkultur wurden von Greiner bio-one (Frickenhausen) bezogen.

### 2.2 Allgemeine Puffer, Lösungen, Kulturmedium

Spezielle, für ein Experiment wichtige Ansätze, werden im Folgenden im jeweiligen Kapitel in einer Tabelle erläutert.

20 x Natrium- Borat Puffer (Stock-Lösung)	Endkonzentration	Hersteller
38,137 g Disodiumtetraborat (Borax) + 950ml Aqua bidest Mit ca. 23g Borsäure auf pH 8 einstellen Ad 1 l Aqua bidest	100 mM	Sigma Aldrich, München  Fisher Scientific, Nidderau

25 x TAE Puffer		
1 Packung 25 X TAE Puffer Ad 1 l Aqua bidest	Ambion, USA	

5 x TBE-Puffer		
1 Packung 10 x TBE-Puffer Ad 2 l Aqua bidest	Ambion, USA	

## MATERIAL UND METHODEN

TE-Puffer pH 8		
Reagenz	Endkonzentration (Ansatz)	Hersteller
10 ml Tris 1M + 2 ml EDTA 0,5M Ad 1 l Aqua bidest Auf pH 8 einstellen	10 mM 1 mM	Acros Organics, Belgien Serva, München

PBS	Endkonzentration	Hersteller
80 g NaCl 11.5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2.0 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH auf 7,4 einstellen Ad 10 l Aqua bidest	137 mM 8,1 mM 1,47 mM	Merk, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe Merk, Darmstadt

Tris-Puffer	Endkonz.	Hersteller
121,14 g Tris-(hydroxymethyl)-methylamin pH mit HCl einstellen Ad 1 Aqua bidest	1 M	Acros Organics, Belgien

PIPES-Lösung	Endkonzentration	Hersteller
18,15 g PIPES Auf pH 6,4 einstellen Ad 300 ml Aqua bidest Autoklavieren, bei RT lagern	200 mM	Sigma Aldrich, München
5 x Hybridisierungspuffer		
5,884g NaCl + 500 µl EDTA 0,5M 200mM PIPES pH 6,4 ad 50 ml Lagerung: -20°C	2 M 5 mM	Merk, Darmstadt Serva, München Sigma Aldrich, München

### 2.2.1 Zellkultur

Für die Kultivierung von Astrozyten und Phoenix-Zellen wurde das Kulturmedium wie folgt angesetzt und bei 4°C gelagert:

Kulturmedium (Phoenix-Zellen, Astrozyten)	
500 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + 50 ml FBS (Fetales Bovines Serum) + 5 ml Penicillin/ Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe PAA, Cölbe Invitrogen, Karlsruhe

DPBS, DMEM, 0,05% Trysin/EDTA, 1M HEPES und HBSS wurden von Gibco® (Invitrogen, Karlsruhe) bezogen.

## 2.3 Versuchstiere

Insgesamt wurde mit 3 verschiedenen Mauslinien gearbeitet, die für verschiedene Versuche verwendet wurden. Für die Operationen (Stereotaxie) wurden Wildtyp(wt)- und RAG 2 knockout- Mäuse verwendet. Primäre Astrozytenkulturen wurden sowohl aus Wildtyp(wt)-, als auch aus Tp53 knockout Mäusen isoliert. Alle Linien befanden sich auf einem genetischen C57BL/6- Hintergrund. Die Tierhaltung erfolgte in der SPF-Einrichtung (S2) des Biomedizinischen Forschungszentrums der Universität Marburg.

### 2.3.1 Tp53 knockout Mauslinie

Diese Mauslinie wurde von der Universität Freiburg zur Verfügung gestellt und ausschließlich persönlich durch die Promovendin betreut. Im Alter von ca. 21 Tagen wurden die Tiere abgesetzt. Die Ohren der Tiere wurden nach einem im Labor etablierten Schema gestanzt, um jedem Tier eine individuelle Nummer zuzuordnen zu können. Dabei wurden gerade Nummern an Männchen und ungerade an Weibchen verteilt und in einer Exceltabelle (Microsoft Excel 2007; Microsoft Cooperation, Redmond, USA) verwaltet. Für die Genotypisierung wurden die Tiere „getailt“, das heißt, ein kleines Stückchen des Schwanzes wurde abgeschnitten und in ein mit der Nummer des Tieres beschriftetes Eppendorf Tube gegeben.

## 2.4 Ermittlungen des Genotyps der Tiere

### 2.4.1 PK-Verdau

Zunächst wurde ein von der Anzahl zu verdauender Proben (Tails) abhängiger Master Mix für den Proteinase K-Verdau angesetzt. Dazu wurde Proteinase K (10 mg/ml; Peqlab, Erlangen) 1:100 in Lyse-Puffer verdünnt.

Lyse-Puffer (500 ml)			
Reagenz	Volumen [ml]	Endkonz.	Hersteller
NaCl 5M	20 ml	0,2 M	Merk, Darmstadt
+ Tris 1M (pH 8,35)	50 ml	0,1 M	Acros Organics, Belgien
+ EDTA 0,5M (pH 8,0)	5 ml	0,5 mM	Serva, München
+ SDS 10%	10 ml	0,2%	Pharmacia Biotech, Freiburg
+ Aqua bidest	Add 500 ml		

Jede Schwanzspitze wurde in 500 µl des Master Mix aufgenommen und über Nacht bei 56°C auf dem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) verdaut.

### 2.4.2 DNA-Isolierung

Am nächsten Morgen wurden 500 µl Phenol-Chloroform im Verhältnis 1:1 hinzugefügt. Die Probe wurde gut gemischt, bis die Lösung milchig erschien und 5min mit 20 800 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde abgenommen und in 1 ml kaltes 100% Ethanol überführt anschließend invertiert und 30 min bei -80°C gefällt. Das Präzipitat wurde 10 min bei 4°C mit 20 800 g zentrifugiert, mit 80% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde ca. 3 min bei 37°C getrocknet und in 200 µl Tris (pH 8,35) aufgenommen und 15 min im Thermomixer resuspendiert. Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die gelöste DNA 1:100 in Wasser verdünnt und ihre optische Dichte bei 260, 280 und 320 nm im Spektrophotometer (Amersham, Freiburg) bestimmt.

### 2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde eingesetzt um einen meist kurzen, genau definierten, durch spezifische Oligonukleotid-Primer eindeutig bestimmten Teil eines DNA-Strangs zu vervielfältigen. Die zum DNA-Strang komplementären Primer legten auf den Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese fest, wodurch der zu amplifizierende Teil von beiden Seiten begrenzt wurde und durch die thermostabile Taq-Polymerase mit Hilfe von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) vervielfältigt werden konnte.

Für die Genotypisierung wurden folgende Oligonukleotide als Primer verwendet:

Primer	Bindungsort	Sequenz von 5' → 3'
107_Trp53wt_s	5'	5'-CGG GAA ATA GAG ACG CTG AGT CCG-3'
108_PGKpolyA_p53KO_s	5'	5'-GGT GGG GTG GGA TTA GAT AAA TGC C-3'
109_Trp53_as	5'	5'-AGT GTG ATG ATG GTA AGG ATA GGT GGGC-3'



## MATERIAL UND METHODEN

Die Primer „107\_Trp53wt\_s“ und „109\_Trp53\_as“ amplifizierten das Wildtypallel (310 Basenpaare), während „108\_PGKpolyA\_p53KO\_s“ und „109\_Trp53\_as“ das Trp53-Allel (knockout Bande; (451 Basenpaare)) amplifizierten.

Der 10 µl PCR-Ansatz wurde folgendermaßen auf Eis pipettiert:

Reagenz	Vol [µl]	Endkonzentration	Hersteller
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1,5µl	3,75 mM	Promega, Madison,
5x GoTaq PCR Puffer (pH 8,5)	2µl	1 x	Promega, Madison
dNTP's (10mM)	0,5µl	0,5 mM	PeqLab, Erlangen
P107 (5pmol/µl)	0,44µl	2,2 pmol/µl	Apara-Bioscience, Denzlingen
P108 (5pmol/µl)	0,29µl	1,45 pmol/µl	Apara-Bioscience, Denzlingen
P109 (5pmol/µl)	0,73µl	3,65 pmol/µl	Apara-Bioscience, Denzlingen
GoTaq Hot Start (5U/µl)	0,1µl	0,5 U/µl	Promega, Madison
DMSO 99,9%	1µl	9,9%	Sigma Aldrich, München
DNA	0,5µl		

Der auf Eis pipettierte Ansatz wurde direkt in den 94°C heißen Thermocycler überführt (Hot Start PCR). Die DNA wurde mit folgendem Programm im Thermocycler (Biometra, Göttingen) amplifiziert:

Zyklen	Temp [°C]	Zeit [s]	Vorgang
1	94°C	120	Primäre Denaturierung der DNA
33	94°C	20	Denaturierung der DNA
	58°C	30	Anlagerung der Oligonukleotid-Primer an die DNA-Matrize
	72°C	45	Verlängerung der Primer durch DNA-Polymerase (Elongation)
1	72°C	10 Minuten	Elongation am Ende
Pause	4°C	∞	

### 2.4.4 DNA Gelelektrophorese

Folgende Puffer wurden für die Gelelektrophorese angesetzt:

1 x Natrium-Borat-Puffer	
50 ml 20 x SB Stock Lösung Ad 1 l Aqua bidest	20x SB Stock (siehe Allgemeine Pufferlösungen)
6x Ladepuffer (100ml)	
12 ml 0,5M EDTA + 70 ml 87% Glycerin + 90 µg Xylencyanol + 90 µg Bromphenolblau + 16 ml H <sub>2</sub> O	Serva, München Carl Roth, Karlsruhe Sigma Aldrich, München Sigma Aldrich, München

Um die PCR-Produkte nachweisen zu können, wurden diese in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Herstellung des Gels wurde 1g Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) abgewogen und mit 1x Natrium-Borat-Puffer auf 100 ml aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde in einer Mikrowelle aufgeköcht und kurz abgekühlt. Es wurden 7 µl Ethidiumbromid (10mg/ml); Sigma Aldrich, München) hinzugefügt. Das Gel konnte anschließend gegossen werden. Die PCR-Proben wurden jeweils mit 2 µl 6 x Ladepuffer gemischt und in die Taschen des polymerisierten Gels pipettiert. Als Größenmarker dient ein 1 kb Ladder Mix (Fermentas, St. Leon-Rot). Durch Anregung des Ethidiumbromids mit einer speziellen UV-Lampe (Fisher Scientific, Nidderau) konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht und der Genotyp der Tiere bestimmt werden.

### 2.5 Retrovirale Expressionsvektoren

Für die folgenden Versuche wurden größere Mengen, der von Eilers et al. zur Verfügung gestellten Vektoren (Plasmide), benötigt. Es handelte sich dabei um retrovirale Expressionsvektoren:

Plasmide	
pBabe-Puromycin- <b>MycWT</b> (c = 1 µg/µl) pZWL-neo-My2FLAG- <b>Akt</b> (c = 1 µg/µl) pBabe-H2B- <b>GFP</b> (c = 1 µg/µl)	Eilers et al.

Die Plasmide wurden verdünnt und auf eine Konzentration von 5 ng/μl eingestellt. Alle Plasmide bzw. Konstrukte vermittelten eine Ampicillin-Resistenz.

## 2.5.1 Z-kompetente Bakterien

### 2.5.1.1 Herstellung der Agarplatten

Herstellung von Agar	
5 g Agar + 500 ml LB Medium In Lösung bringen und autoklavieren, bei 4°C lagern	Roth, Karlsruhe

Die Herstellung der Agarplatten erforderte das Aufkochen des Agars. Nachdem dieser auf ca. 60°C abgekühlt war, wurde Ampicillin (100 mg/ml) in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugefügt. Der Agar wurde in Petrischalen gegossen. Diese konnten 6 Wochen bei 4°C gelagert werden.

### 2.5.1.2 Transformation

Für die Transformation der Konstrukte wurde der E.coli Stamm XL1 blue benutzt. Es handelte sich dabei um kompetente Bakterien, die nach dem Standard-Protokoll des *Z-Competent E. coli Transformation Kit* (ZymoResearch, USA) hergestellt und in 50 μl Aliquots bei -80°C gelagert wurden. Für eine Standardtransformation wurde für jedes Konstrukt ein solches Aliquot auf Eis langsam aufgetaut. 5 μl der Plasmidverdünnung (5 ng/μl) wurden mit 50 μl Bakterien vermischt und 25 min auf Eis inkubiert, während die Agarplatten im Brutschrank vorgewärmt wurden. Nach der Inkubation wurden die Bakterien mit einer sterilen Öse auf der Agarplatte ausgestrichen. Die Koloniebildung erfolgte über Nacht im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C. Am darauf folgenden Morgen wurden die Platten bei 4°C gelagert.

### 2.5.1.3 Vorkulturen

Für die Vorkultur wurde zunächst LB-Medium wie folgt angesetzt.

<u>Lysogeny Broth-Medium</u>	
20 g LB-Lenox + 1 l Aqua bidest In Lösung bringen, autoklavieren, bei 4°C lagern	Roth, Karlsruhe

Es wurden 3 Kolonien einer Agarplatte gepickt. Dazu wurde eine kleine Pipettenspitze in eine Kolonie getaucht und in 4 ml LB-Medium mit 80 µl Ampicillin (100mg/ml) abgeworfen. Diese Vorkulturen wurden über Nacht bei 37°C und 300 rpm geschüttelt und anschließend bei 4°C gelagert.

### 2.5.2 Maxi-Präparation der retroviralen Expressionsvektoren

Am folgenden Abend wurden 20 µl einer Vorkultur in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium und 400µl Ampicillin (100mg/ml) pipettiert. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde in einen Zentrifugenbecher überführt und 20 min mit 3220 g bei 4°C pelletiert. Die Plasmid-DNA wurde laut Standardprotokoll des *Maxi Plasmid-Purification-Kit* (Qiagen, Hilden) präpariert und extrahiert. Das DNA-Pellet wurde in 500 µl 10 mM Tris pH 8,35 aufgenommen und 15 min im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) bei 37°C resuspendiert. Die Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt und auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Bei dieser Methode wurde eine sehr saubere DNA aus einer großen Menge von Bakterien extrahiert und stand dann für eine Vielzahl von Experimenten zur Verfügung.

## 2.6 Zellkulturen

### 2.6.1 Primäre Astrozytenkulturen

Kulturmedium	
500 ml DMEM + 50 ml FBS (Fetales Bovines Serum) + 5 ml Penicillin/ Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe PAA, Cölbe Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/DNase I Gemisch	
6 mL 2,5% Trypsin + 750 µL 1% DNase I	Invitrogen, Karlsruhe Roche, Grenzach
Stock Lösung (für 7 Hirne)	
300 µl Trypsin/DNase I Gemisch Ad 4,5 ml HBSS (Hank's Buffered Salt Solution)	Invitrogen, Karlsruhe
Trituration Lösung (für 7 Hirne)	
80 µl DNase I (10mg/ml) Ad 8 ml DPBS (Phosphate Buffered Saline)	Roche, Grenzach Invitrogen, Karlsruhe

Für die Herstellung primärer Astrozytenkulturen wurden Wildtyp-Mäuse (wt) und Tiere der  $p53^{-/-}$ -Mauslinie verwendet. Beide wiesen einen genetischen C57BL/6- Hintergrund auf. Für diese Methode wurden Tiere im Alter von 0 bis 2 Tagen verwendet. Die Jungtiere wurden in einem geschlossenen Glasgefäß mit Isofluran (Baxter, Unterschleißheim) betäubt, desinfiziert und anschließend dekapitiert. Eine Schwanzbiopsie diente zur Genotypisierung (siehe Kap. 2.4).

Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten steril an einer Sterilwerkbank. Mit einer gebogenen Pinzette wurde der Kopf fixiert, während mit einer kleinen Schere die Kopfhaut entfernt wurde. Es konnte so eine Aufsicht auf die Kalotte erlangt werden. Diese wurde ausgehend vom Foramen magnum auf beiden Seiten an der Hutkrempe entlang von caudal nach rostral aufgeschnitten und anschließend mit einer kleinen Pinzette entfernt. Das Gehirn wurde in kaltes HBSS überführt und unter einer Stereolupe mit Hilfe zweier feiner Pinzetten von den Meningen befreit. Dieser Schritt war essentiell zur Verhinderung einer Kontamination mit Fibroblasten. Aus dem HBSS heraus, wurde das Gehirn in eine weitere Kulturschale überführt und mit 700 µl Stock-Lösung versetzt. Mit einem sterilen Skalpell und einer kleinen Pipette wurde das

Gewebe zerkleinert und verflüssigt. Die homogenisierte Masse wurde 8 Minuten bei 37°C im Brutschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert, in 5 ml Kulturmedium aufgenommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min mit 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet konnte in 1 ml Trituration-Lösung resuspendiert werden. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation (5 min, 300 g). Das Zellpellet wurde in 10 ml DMEM resuspendiert und auf einer beschichteten Zellkulturplatte (10 cm Durchmesser) ausplattiert. Die Zellen verblieben bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Das Kulturmedium wurde nach 48 h gewechselt.

### 2.6.2 Phoenix-ECO Zellen (Verpackungszelllinie)

Bei den ekotrophen Phoenix-Zellen (Phoenix-ECO) handelte es sich um eine Verpackungszelllinie die auf einer 293T-Zelllinie (embryonale, humane Nierenzelllinie) basierte. Nach Transfektion mit einem retroviralen Expressionsvektor stellten diese Zellen ein Retrovirus her, das nicht zur Replikation befähigt war und ausschließlich murine Zellen infizierte. Ein von Eilers et al. freundlicherweise zur Verfügung gestelltes Aliquot dieser Zellen wurde auf einer 10 cm beschichteten Kulturschale mit 10 ml Kulturmedium ausplattiert und im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, und 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Die Zellen wurden alle 3 Tage 1:4 gesplittet bis genügend Kulturplatten konfluent bewachsen waren.

#### 2.6.2.1 Einfrieren der Phoenix-ECO Zellen

Durch vorsichtiges Hoch- und Herunterpipettieren des Kulturmediums lösten sich die Zellen von der Platte, wurden in 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min mit 300 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Kulturmedium wurde abgenommen und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen einer Kulturplatte in 1 ml Gefriermedium aufgenommen, das wie folgt hergestellt wurde:

Gefriermedium (für 10 Platten; 10 Aliquots)	
9 ml FBS + 1ml DMSO 99,9%	PAA, Cölbe Sigma Aldrich, München

## MATERIAL UND METHODEN

Die Zellen wurden in spezielle Gefrierröhrchen (Nalgene, USA) überführt und in einer mit Styropor ausgekleideten Box 24 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, bevor sie am Folgetag in flüssigen Stickstoff überführt wurden. Es wurde darauf geachtet, dass nach Entnahme eines Aliquots wiederum passagierte Zellen wie erläutert eingefroren wurden.

### 2.6.2.2 Transfektion der Phoenix-ECO Zellen

Für die Transfektion wurde eine gewünschte Anzahl Phoenixzell-Aliquots im  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad langsam aufgetaut. Der Inhalt des Aliquots wurde in ein 10 ml Blue Cap mit 10 ml kaltem Kulturmedium überführt und zentrifugiert (5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ , 300 g). Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und ausplattiert. 24 h vor einer Transfektion wurden die Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt und erneut ausplattiert ( $4 \times 10^6$  Zellen/ 10 cm Kulturplatte). Nach 20 h wurde das Kulturmedium erneut gewechselt. Folgende Lösung wurde angesetzt:

50 ml 2 x HBS Stock-Lösung (pH 7,05)	Endkonzentration	Hersteller
2,8 ml NaCl 5M + 75 $\mu\text{l}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1M + 2,5 HEPES 1M + 40 ml Aqua bidest	280 mM 1,5 mM 50 mM	Merk, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe
pH-Messung bei Bedarf pH mit NaOH 1M auf 7,05 einstellen Ad 50 ml Aqua bidest Steril filtrieren (0,2 $\mu\text{m}$ ), bei $4^{\circ}\text{C}$ lagern		Merk, Darmstadt

Die Phoenix-Zellen einer Kulturplatte wurden jeweils mit einem Expressionsvektor transfiziert. Für jeden Vektor wurde jeweils Ansatz A und B folgendermaßen pipettiert:

Ansatz A (10 ml Blue Cap)
1 ml 2 x HBS Stock-Lösung

Ansatz B (10 ml Blue Cap)	
100 $\mu\text{l}$ CaCl 2,5M + 40 $\mu\text{l}$ DNA Maxi-Präparation (c = 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 860 $\mu\text{l}$ Aqua iniectionis	Merk, Darmstadt  Braun, Melsungen

## MATERIAL UND METHODEN

Ansatz B wurde mit einer Pipette aufgenommen und tropfenweise zu Ansatz A hinzugefügt. Das Blue Cap wurde gut gemischt und die Mischung vorsichtig in das Kulturmedium der Phoenix-Zellen gegeben. Es handelte sich um eine CaCl-Transfektion. Ein Überschuss an Calcium-Ionen veränderte die Durchlässigkeit der Zellmembran, sodass eine gesteigerte Aufnahmefähigkeit für Fremd-DNA erreicht wurde. Die Phoenix-Zellen wurden mit folgenden Vektoren transfiziert:

Expressionsvektor	Resistenz
pBabe-Puromycin- <i>Myc</i> WT	Puromycin-Resistenz
pZWL-neo-My2FLAG- <i>Akt</i>	Geneticin- (G418) Resistenz
pBabe-H2B- <i>GFP</i>	

Dabei dienten mit dem pBabe-H2B-GFP- Vektor transfizierte Zellen als Kontrolle des Experiments. Das eGFP diente als Reporterprotein, da es, angeregt durch blaues Licht mit einer Wellenlänge von 395 nm, grün fluoresziert. Dieses konnte 24 Stunden nach einer Transfektion überprüft werden.

Laut Protokoll wurde das Kulturmedium 15 h nach einer Transfektion ersetzt. In das neue Kulturmedium (7 ml) sezernierten die Zellen das entsprechende Retrovirus. Der retrovirale Überstand wurde 48 Stunden nach einer Transfektion steril filtriert (0,45 µm, Millipore, Schwalbach) und in 3 ml Aliquots in Flüssigstickstoff gefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C. Der Vorgang konnte nach weiteren 18 Stunden (66 Stunden nach der Transfektion) wiederholt werden, sofern die Zellen zuvor mit 7 ml neuem Kulturmedium versorgt wurden.

### 2.6.3 Retrovirale Infektion und Selektion der Astrozyten

Im Gegensatz zu den Phoenix-Zellen wurden die primären Astrozyten nicht ausgezählt. Nach der Isolierung der Zellen vergingen ca. 7 Tage bis diese eine Konfluenz von 70% (10 cm Kulturplatte) erreichten und mit viralem Überstand infiziert werden konnten. Wildtyp- und Tp53 knockout-Astrozyten wurden nach folgendem Protokoll infiziert:



## MATERIAL UND METHODEN

Der steril filtrierte retrovirale Überstand wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, das Kulturmedium der Astrozyten abgesaugt und folgende Ansätze in einem 10 ml Blue Cap gemischt und auf die Zellen einer 10 cm Kulturplatte pipettiert:

Infektion mit 1 viralen Überstand	Endkonzentration (Kulturschale)
3 ml viraler Überstand	60%
+ 2 ml Kulturmedium	40%
+ 5 µl Polybrene (c= 4 mg/ml)	4 µg/ml

Infektion mit 2 viralen Überständen	Endkonzentration (Kulturschale)
1,5 ml viraler Überstand A	30%
+ 1,5 ml viraler Überstand B	30%
+ 2 ml Kulturmedium	40%
+ 5 µl Polybrene (c = 4 mg/ml)	4 µg/ml

Bei Polybrene (Sigma Aldrich, München) handelte es sich um ein Polyanion, das durch Minimierung von elektrostatischen Abstoßungskräften zwischen Zellmembran und DNA die Infektion erleichterte.

Nach 15 Stunden wurden 5 ml frisches Kulturmedium hinzugefügt. Nach weiteren 25 Stunden wurde der Infektionsansatz vollkommen durch Kulturmedium ersetzt und die Selektion der Astrozyten wie folgt begonnen:

Antibiotikum	Endkonzentration	Hersteller
Puromycin (c = 10 mg/ml)	2 µg/ml	InvivoGen, USA
Geneticin (G418) (c = 100 mg/ml)	500 µg/ml	Invitrogen, Karlsruhe

Die retrovirale Infektion konnte nach 48 h durch den Nachweis der Expression von eGFP kontrolliert werden.

Um eine entsprechende Selektion der mit Myc, Akt bzw. Myc/Akt stabil infizierten Astrozyten zu gewährleisten, wurde das Selektions-Antibiotikum alle 48 h ersetzt. Als Kontrollen dienten Kulturplatten nichtinfizierter Astrozyten, die ebenso einem Selektionsdruck mit einem der genannten Antibiotika ausgesetzt wurden. Im Falle einer Infektion mit 2 viralen Überständen wurden beide Antibiotika hinzugefügt.

### 2.6.3.1 Beobachten der infizierten Astrozyten

Infizierte Astrozyten und nichtinfizierte Kontrollzellen (Wildtyp und Tp53 knockout) wurden alle 24 h unter dem inversen Mikroskop (Leica, Wetzlar) beobachtet, um Veränderungen des Phänotyps und der Proliferation zu dokumentieren. Einige Zellen wurden bis zu 6 Monaten beobachtet. Außerdem wurde ein Teil der Zellen regelmäßig in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt.

### 2.6.3.2 Passagieren der infizierten Astrozyten

Sofern die Kulturplatten konfluent bewachsen waren, wurden die Zellen gesplittet und passagiert. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und mit 500 µl 0,05% Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) abtrypsinisiert. Die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und in einem Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert (5 min, Raumtemperatur, 300 g). Das Zellepellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und ein Teil der Zellen wurde erneut ausplattiert. Die nicht ausplattierten Zellen wurden erneut abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, abzentrifugiert, in 500 µl Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt. Diese wurden bei -80°C gelagert und standen für weitere Versuche zur Verfügung.

### 2.6.3.3 Coverslips/ Fixierung der Astrozyten

Um die Astrozyten immunzytochemisch charakterisieren zu können, wurden mit Hilfe einer Pinzette bis zu 6 sterilisierte runde Deckgläschen (Ø 10 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig) in die Kulturschalen gelegt. Dieses wurde bei jeder Passage wiederholt, sodass Zellen jeder Passage für weitere Versuche zur Verfügung standen. Mit Zellen bewachsene Deckgläschen wurden kurz mit PBS gewaschen und 45 s bei -20°C mit einem Gemisch aus Methanol und Aceton im Verhältnis 1:1 fixiert. Die Deckgläschen wurden kurz getrocknet und mit Hilfe von Corbit-Balsam auf Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) geklebt und bei -20°C in einer verschlossenen Box gelagert.



Abb. 2.1. Schematische Darstellung eines Objektträgers

## 2.7 Zytochemie

### 2.7.1 Fluoreszenzimmunzytochemie

Für die Immunfluoreszenz wurden zunächst die folgenden Lösungen angesetzt:

Block-Lösung (50 ml)	
0,5 g Bovines Serumalbumin (BSA) + 5 µl Triton X-100 + 5 µl 10% NaN <sub>3</sub> Ad 50 ml steril filtriertes PBS	Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München
Antikörper-Verdünnung (50 ml)	
0,5 g Bovines Serumalbumin (BSA) + 50 µl 10% NaN <sub>3</sub> + 150 µl Triton X-100 Ad 50 ml steril filtriertes PBS	Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München

Die bei -20°C gelagerten Objektträger wurden in steriles 1 x PBS überführt und vorsichtig abgetrocknet. Die Deckgläschen wurden mit einem Fettstift (Science Service, München) umrandet. Die Astrozyten wurden 30 min mit 100 µl Blockierungslösung inkubiert. Der BSA-Block sättigt freie Bindungsstellen und reduziert die unspezifische Bindung des Primärantikörpers. Während dessen wurde eine spezifische Verdünnung des Primärantikörpers angesetzt. Die Blockierungslösung wurde abgeschüttet und die Zellen über Nacht bei 4°C mit 100 µl Primärantikörper-Verdünnung in einer feuchten Kammer inkubiert.

Folgende Primärantikörper wurden eingesetzt:

Primär-AK	Host	Verdünnung	Klonalität	Hersteller
GFAP	rabbit	1:1000	poly	Dako, Dänemark
KI67	rat	1:50	mono	Dako, Dänemark
c-Myc	rabbit	1:100	poly	Santa Cruz, USA

## MATERIAL UND METHODEN

Am nächsten Morgen wurde der Primärantikörper abgeschüttet. Die Objektträger wurden 3 x 5 min in 1 x PBS gewaschen und 1 h mit 100 µl Sekundärantikörper-Verdünnung bei Raumtemperatur inkubiert.

Sekundär-AK	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor (488) goat $\alpha$ rabbit IgG (H+L)	1:2000	Molecular Probes, Niederlande
Alexa Fluor (488) goat $\alpha$ rat IgG (H+L)	1:2000	Molecular Probes, Niederlande

Die Objektträger wurden erneut 3 x 5 min mit 1 x PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden 20 s mit 100 µl 4',6-Diamidino-2-phenylindol (Dako, Dänemark; Verdünnung: 1:10.00) inkubiert, gewaschen, mit Fluoreszenz-stabilisierendem Medium eingedeckelt und auf einer Heizplatte getrocknet. Die Zellen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica, Wetzlar) beurteilt und fotografiert.

### 2.7.2 Immunzytochemie

Wie im Kapitel zuvor beschrieben, wurden die Objektträger von -20°C in steriles 1 x PBS überführt und abgetrocknet. Die Deckgläschen wurden mit einem Fettstift (Science Service, München) umrandet und 30 min mit 100 µl 5 % Ziegen Serum inkubiert. Das Normalserum wurde abgeschüttet und 100 µl einer Primärantikörper-Verdünnung auf die Deckgläschen gegeben. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C oder 2 h bei Raumtemperatur.

Folgende Primärantikörper kamen zum Einsatz:

Primär-AK	Host	Verdünnung	Klonalität	Hersteller
CD 133	rabbit	1: 250	poly	Abcam, UK
Nestin	rabbit	1:100	poly	Lifespan Bioscience, USA
Musashi-1	rabbit	1:500	poly	Millipore, USA
Olig 2	rabbit	1:1000	poly	Millipore, USA

Alle weiteren Schritte erfolgten nach Standardprotokoll des *Vectastain ABC Kit (GAR)* (Vectastain Laboratories, USA). Die gewaschenen Objektträger wurden 7 min mit einer DAB-Färbelösung inkubiert, bevor die Reaktion in 1 x PBS abgestoppt wurde. Die

Objektträger wurden in destilliertes Wasser überführt, 30 s in Hämatoxylin gegengefärbt und 10 min in fließendem Leitungswasser gebläut. In einer aufsteigenden Alkohol/Xylolreihe (30 s 70 %, 95 %, 100 % Ethanol, 2 × 1 min Xylol) erfolgte die Entwässerung. Die Deckgläschen wurden mit Corbit-Balsam eingedeckelt.

### 2.8 Stereotaxie

#### 2.8.1 Vorbereitung der Astrozyten

Das Kulturmedium der Astrozyten wurde abgesaugt. Daraufhin wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit 0,05% Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) abtrypsinisiert. Die gelösten Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und 5 min bei 300 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 10ml frischem Kulturmedium gut resuspendiert und in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und in 1 ml PBS aufgenommen. Dieser Vorgang wurde 2 x wiederholt, um eine serumfreie Suspension zu erhalten. Die Zellen wurden im errechneten Volumen DPBS ( $c = 10^4$  Zellen/  $\mu$ l) aufgenommen und auf Eis gelagert.

#### 2.8.2 Operation

Für die Operationen wurden Wildtyp (Bl6)-, sowie RAG 2 knockout Mäuse verwendet. Das Tier wurde in einer Plexiglas-Box mit einem Sauerstoff-Isofluran-Gemisch in eine tiefe Narkose versetzt. Der Kopf des Tieres wurde mit Hilfe eines Rasierers von Haaren befreit und in die Stereotaxieeinheit eingespannt, wobei die sogenannten Earbars oberhalb der Ohren an der Schläfe beidseits befestigt wurden. Die Schnauze lag in der Narkosemaske. Abhängig von der Größe des Tieres variierte die Isofluran-Konzentration zwischen 1,2 und 2,3 Vol%. Die Tiefe der Narkose konnte anhand von Frequenz und Tiefe der Atmung beurteilt werden. Vor dem invasiven Eingriff wurden die Schmerzreflexe durch starkes Kneifen in die Hinterpfoten überprüft.

Das Operationsfeld wurde sorgfältig mit 75% Ethanol desinfiziert, um ein sauberes, antiseptisches Arbeiten zu ermöglichen. Alle Schichten der Haut wurden mit einer kleinen chirurgischen Schere von caudal nach rostral eröffnet und die Haut mit zwei

## MATERIAL UND METHODEN

Wundhaken nach lateral gezogen, sodass die Kalotte bzw. Sutura sagittalis und Sutura coronalis dargestellt werden konnten.

Die Zellen wurden mit Hilfe einer 200 µl Pipette resuspendiert, um die 10 µl Hamiltonspritze (Hamilton, CH-Bonaduz) mit einer 20 µl Pipette luftfrei von hinten zu befüllen. Der Stempel wurde montiert und vorgeschoben, bis ein Tropfen der Zellsuspension sichtbar wurde. Dieser wurde verworfen und die Hamiltonspritze in die Stereotaxieeinheit eingespannt und mit einer Klemmschraube befestigt. Als Nullpunkt wurde das Bregma (Zusammentreffen der Sutura coronalis und der Sutura sagittalis) eingestellt. Für die Implantation in das rechte Striatum wurden folgende Koordinaten genutzt.

0-Punkt	Bregma (Kreuzung Sutura coronalis und Sutura sagittalis)
X-Achse (lateral dexter)	2,0mm
Y-Achse (rostral)	0,6mm
Z-Achse (Tiefe)	3,0mm + 0,3mm Tasche

Die Kanüle wurde genau auf das Bregma eingestellt, die Koordinaten abgelesen und im Op-Bericht vermerkt. Es folgten die Berechnung und Einstellung der Hamiltonkanüle auf die Zielkoordinaten. Die Kalotte wurde am eingestellten Punkt farblich markiert und mit Hilfe des Stereotaxiebohrers (Aesculap, Tuttlingen) abgetragen. Eine dünne Knochenschicht des 2-3 mm großen Bohrlochs blieb erhalten. Diese wurde mit der eingespannten Hamiltonkanüle oberflächlich durchstoßen und die Z-Koordinate (Dura-Ebene) ermittelt. Um im Gehirn eine Tasche für die Zellen zu schaffen, wurde die Kanüle 0,3 mm tiefer geschoben und zurückgezogen. Die Injektion der Zellen erfolgte über 5 min durch langsames Drehen des Stempels, um eine plötzliche Zunahme des intrakraniellen Volumens zu vermeiden. Nach der Injektion verblieb die Kanüle 10 min im Zielgebiet, um das Absetzen der Zellen zu gewährleisten. Schließlich wurde die Kanüle über einen Zeitraum von 5 min aus dem Zielgebiet gezogen.

Die Kalotte wurde mit einem sterilen Tupfer gesäubert, die Wundränder der Kopfhaut wurden adaptiert und geklammert. Die Maus wurde aus der Stereotaxieeinheit entnommen, gewogen und mit Ohrstanzen markiert. Die Tiere wurden 21 Tage beobachtet.

## 2.9 Gehirnsektionen

Die Maus wurde mit Isofluran (Baxter, Unterschleißheim) betäubt. Der Kopf des Tieres wurde mit 80% Ethanol gründlich desinfiziert und mit einer Knochenschere abgetrennt. Die Kopfhaut wurde mit einer kleinen Schere aufgeschnitten und abgetrennt. Die Schädelkalotte wurde vom Foramen magnum ausgehend auf beiden Seiten (oberhalb der Ohren) entlang von caudal nach rostral aufgeschnitten und mit einer feinen Pinzette vom Gehirn abgehoben. Das freigelegte Gehirn wurde vorsichtig von der Schädelbasis gelöst, herausgehoben und durch einen Frontalschnitt mit einer Rasierklinge zerteilt. Beide Gehirnhälften wurden auf kleinen Korkplatten in TissueTec (Sakura Finetek, NL) eingebettet, in mit flüssigem Stickstoff gekühltem 2-Methylbutan (Merk, Darmstadt) schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  luftdicht aufbewahrt.

### 2.9.1 Kryostatschnitte

Um die Gehirne morphologisch und immunhistochemisch auswerten zu können, wurden diese im Kryostaten (Leica, Wetzlar) geschnitten. Das Gehirn wurde 30-45 min im Kryostaten auf eine Temperatur von  $-24^{\circ}\text{C}$  äquilibriert. Anschließend wurden  $5\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte hergestellt und abwechselnd auf beschichtete Superfrost Plus-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig), sowie unbeschichtete Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Die Superfrost Plus-Objektträger wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, während die Schnitte auf den normalen Objektträgern HE gefärbt wurden.

### 2.9.1.1 Hämatoxylin-Eosinfärbung (HE-Färbung)

Hämalaun nach Mayer (1 l Ansatz)	
1 mg/ml Hämatoxylin	Merk, Darmstadt
0.2 mg/ml NaJO <sub>3</sub>	Merk, Darmstadt
50 mg/ml KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Merk, Darmstadt
50 mg/ml C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Merk, Darmstadt
1 mg/ml C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Merk, Darmstadt

Eosin-Färbelösung (100 ml Ansatz)	
1 g Eosin	Merk, Darmstadt
+ 50 ml Aqua bidest	Merk, Darmstadt
+ 50 ml 96% Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
+ 1 Tropfen 100 % CH <sub>3</sub> COOH (Eisessig)	Merck, Darmstadt

Um die Zellen bzw. den Tumor zu finden, wurden die Kryostatschnitte 3 min in *Hämatoxylin* gefärbt, 10 min unter warmem fließendem Leitungswasser gebläut und in destilliertes Wasser überführt. Anschließend wurde 2 min in *Eosin* gegengefärbt. In einer aufsteigenden Alkohol/Xylolreihe (2 × 5 Minuten 70 %, 96 %, 100 % Ethanol, sowie 2 × 5 Minuten Xylol) wurden die Schnitte entwässert und mit Corbit-Balsam eingedeckelt. Bei dieser Färbung erschienen die Kerne blauviolett, alle übrigen Strukturen in verschiedenen Farbabstufungen rot.

### 2.9.1.2 Immunhistochemie

Die Kryostatschnitte wurden 45 s in einem -20°C kalten 1:1 Gemisch aus Methanol und Aceton (Riedel de Haën, Seelze) fixiert und kurz bei Raumtemperatur getrocknet. Es folgte eine 10 minütige Blockierung der endogenen Peroxidase mit 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 ml PBS + 1 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen, mit einem Fettstift umrandet und 30 min mit Normalserum (Ziegenserum) blockiert. Das Serum wurde abgeschüttet und die Schnitte über Nacht bei 4°C mit 100 µl Primärantikörper-Verdünnung in einer feuchten Kammer inkubiert. Folgende Primärantikörper-Verdünnungen wurden angesetzt:



## MATERIAL UND METHODEN

Primär-AK	Host	Verdünnung	Klonalität	Hersteller
CD 4	rat	1: 2000	mono	PharMingen, USA
CD 8	rat	1: 2000	mono	PharMingen, USA
Mac-1	rat	1: 500	mono	MPI Freiburg, Freiburg
c-Myc	rabbit	1: 100	poly	Santa Cruz, USA
KI67	rat	1: 50	mono	Dako, DK

Am nächsten Morgen wurden alle Schnitte 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Die mit c-Myc inkubierten Schnitte wurden weiter nach Standardprotokoll des *Vectastain ABC Kit (GAR)* (Vectastain Laboratories, USA) behandelt, während die anderen Schnitte 1 h bei Raumtemperatur mit 100 µl Sekundärantikörper-Verdünnung inkubiert, 3 x 5 min mit PBS gewaschen und 20 min mit Lösung C des *Histostain® Plus Kit* (Invitrogen, USA) inkubiert wurden.

Sekundär-AK	Verdünnung	Hersteller
Goat $\alpha$ rat IgG (biotiniliert)	1: 200	Dako, DK

Zum Abschluss wurden alle Schnitte 7 min mit DAB-Färbelösung entwickelt, mit PBS abgestoppt, mit destilliertem Wasser gespült, 2 min mit Hämatoxylin gefärbt und 5 min unter fließendem Wasser gebläut. In einer aufsteigenden Alkohol/Xylolreihe (2 x 5 Minuten 70 %, 96 %, 100 % Ethanol, sowie 2 x 5 Minuten Xylol) wurden die Schnitte entwässert und anschließend mit Corbit-Balsam eingedeckelt.

### 2.10 Versuche mit Plasmid-DNA

Für die Detektion von humanem c-Myc auf RNA-Ebene musste eine Sonde hergestellt werden. Ein Teil der c-Myc-cDNA sollte in einen Vektor (pGem4z) kloniert werden. Dieses wird im folgenden Kapitel ausführlich beschrieben. Als Template diente die humane cDNA des pBabe-Puromycin-*Myc*WT-Vektor.

#### 2.10.1 Primerdesign

Die Nukleotidsequenz des humanen c-Myc (NM\_002764) wurde aus der Genbank „NCBI Nucleotide“ herauskopiert und in das Programm „Pearl Primer“ eingefügt. Dieses Programm schlägt verschiedene Paare von forward- und reverse-Primern vor, die keine Dimere bilden und ähnliche annealing-Temperaturen aufweisen. Mit Hilfe des

## MATERIAL UND METHODEN

Programms „BLAST“ wurde im Anschluss verifiziert, dass die Primer ausschließlich Sequenzen im gewünschten Gen erkannten. An die so ausgewählten Primer wurden zusätzlich Oligonukleotidüberhänge angefügt, die von den folgenden Enzymen geschnitten werden konnten:

EcoRI        cag↓aatc  
HindIII      ttcca↓agctt

Folgende Primer wurden bei Apar Bioscience (Denzlingen) bestellt und im empfohlenen Volumen aufgenommen.

Primer	Sequenz
c-myc forward	5'-cag aat tcg tct gga tca cct tct gct g-3'
c-myc reverse	5'-ttc caa gct tgc ctc ttg aca ttc tcc tcg-3'

### 2.10.2 Linearisierung des pBabe-Puromycin-*Myc*WT-Vektor

Der pBabe-Puromycin-*Myc*WT-Vektor wurde im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) 2 Stunden bei 37°C folgendermaßen linearisiert:

Reagenz	Volumen	Hersteller
Plasmid-DNA (c = 1 µg/µl)	0,5 µl	Fermentas, St. Leon-Rot
+ 10 x Buffer „O“	3 µl	
+ SalI (10 U/µl)	0,5 µl	
+ Aqua bidest	26 µl	

Anschließend wurde die Plasmid-DNA nach Standardprotokoll des *PCR-Purification-Kit* (Quiagen, Hilden) aufgereinigt. Die DNA konnte als Template verwendet werden.

### 2.10.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit diesem Template (linearisierter pBabe-Puromycin-*Myc*WT-Vektor) wurde eine PCR durchgeführt. Folgender PCR-Ansatz wurde pipettiert:

Reagenzien	Volumen	Hersteller
cDNA (Template)	4 µl	
+ forward-Primer (5 pmol/µl)	5 µl	Apara Bioscience, Denzlingen
+ reverse-Primer (5 pmol/µl)	5 µl	Apara Bioscience, Denzlingen
+ Master Mix:	86 µl	
Aqua bidest	68 µl	
+ 10x Puffer	9,5 µl	Thermo Scientific, Karlsruhe
+ dNTP's 2 mM	1 µl	PeqLab, Erlangen
+ MgCl <sub>2</sub> 25 mM	7 µl	Thermo Scientific, Karlsruhe
+ Taq-Polymerase	0,5 µl	Thermo Scientific, Karlsruhe

Die PCR erfolgte mit folgendem Programm:

1	94°C	60 Sekunden	Primäre Denaturierung der DNA
35	94°C	60 Sekunden	Denaturierung der DNA
	56°C	60 Sekunden	Anlagerung der Oligonukleotid-Primer
	72°C	60 Sekunden	an die DNA-Matrize Verlängerung der Primer durch DNA-Polymerase (Elongation)
1	72°C	5 Minuten	Elongation am Ende
Pause	12°C	∞	

### 2.10.4 SB-Gelelektrophorese

Um das Gelingen der PCR zu beurteilen, wurde ein 1% Agarosegel gegossen (siehe Kap. 2.4.4). Dann wurden 10 µl der PCR-Probe mit 2 µl 6 x Ladepuffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.10.5 Phenol/Chloroform Extraktion

Das PCR-Produkt wurde mit 90 µl Tris/EDTA-Puffer (pH8) versetzt. Anschließend wurden 2 Volumen Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1 hinzupipettiert. Die Probe wurde gut gemischt, bis sie milchig erschien und 5 min mit 20 800 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, in 100% Ethanol überführt, invertiert und anschließend 20 min auf Trockeneis gefällt. Die Probe wurde zentrifugiert (10 min, 20 800 g, 4°C), mit 80% Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert, 3 min im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) getrocknet und in 25 µl Tris pH 8,35 resuspendiert.

### 2.10.6 Restriktionsverdau

Das in der PCR-Reaktion entstandene Produkt, besaß durch die entworfenen Primer die für den Restriktionsverdau nötigen Überhänge. Mit den gleichen Enzymen wurde auch ein im Labor vorhandener Vektor (*pGem4z*) verdaut. Folgende Ansätze wurden 2 Stunden bei 37°C auf dem Thermomixer inkubiert:

pGem4z		
pGem4z (c = 0,5 µg/µl)	1 µl	Fermentas, St. Leon-Rot
+ 10x Puffer „R“	3 µl	
+ EcoRI (10 U/µl)	0,5 µl	
+ HindIII (10 U/µl)	0,5 µl	
+ Aqua bidest	25 µl	
PCR-Produkt		
PCR-Produkt	25 µl	Fermentas, St. Leon-Rot
10x Puffer „R“	10 µl	
EcoRI (10 U/µl)	5 µl	
HindIII (10 U/µl)	5 µl	
Aqua bidest	55 µl	

### 2.10.7 TAE- Gelelektrophorese

1 x TAE-Puffer	
20 ml 25 x TAE-Puffer (Stock) Ad 500 ml Aqua bidest	Siehe Allgemeine Lösungen

Zunächst wurde ein 1%iges TAE-Gel gegossen. Dafür wurde 1 g Standard-Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) mit 100 ml 1x TAE-Puffer aufgeköcht, abgekühlt, mit 7 µl Ethidiumbromid (c = 10 mg/ml) versehen und gegossen. Das im Restriktionsverdau geschnittene PCR-Produkt und der linearisierte pGem4z wurden in einem 1 % TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Unter einer UV-Lampe (Fisher Scientific, Nidderau) konnten die gewünschten Banden sichtbar gemacht und mit einer sterilen Rasierklinge aus dem Gel ausgeschnitten werden.

### 2.10.8 Aufreinigung der Gelfragmente

Die Gelfragmente wurden nach Standardprotokoll des *Gel-Extraction-Kit* (Quiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde photometrisch ermittelt.

### 2.10.9 Ligation

Das PCR-Produkt wurde mit dem linearisierten pGem4-Plasmid und einer Ligase über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Das Verhältnis von Insert zu Vektor betrug dabei 3:1. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Insert.

pGem4z + PCR-Produkt		
pGem4z (c = 5 ng/µl)	10 µl	Promega,USA Promega,USA
+ PCR-Produkt (c = 35 ng/µl)	0,3 µl	
+ 10x Ligase Puffer	3 µl	
+ T4 Ligase	1 µl	
+ Aqua bidest	15,7 µl	
Negativkontrolle		
pGem4z (c = 5 ng/µl)	10 µl	Promega,USA Promega,USA
+ 10x Ligase Puffer	3 µl	
+ T4 Ligase	1 µl	
+ Aqua bidest	16 µl	

### 2.10.10 Transformation Z-kompetenter Bakterien

Die Transformation Z-kompetenter Bakterien wurde in Kapitel 2.5.1.2 bereits ausführlich beschrieben. 5 µl der Ligation sowie der Negativkontrolle wurden mit 50 µl Bakterien wie bereits beschrieben inkubiert und ausplattiert. Die Koloniebildung erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Hareus, Hanau). Am darauf folgenden Morgen wurden die Platten bei 4°C gelagert.

### 2.10.11 Mini-Präparation (Mini-Prep) und Restriktionsverdau

Folgende Lösungen wurden angesetzt. Lösung 1 und das LB-Medium wurden bei 4°C gelagert, während Lösung 2 und 3 bei Raumtemperatur aufbewahrt werden konnten.

LB-Medium	
20 g LB-Lenox + 1 l Aqua bidest In Lösung bringen, autoklavieren, bei 4°C lagern	Roth, Karlsruhe
Lösung 1	
2,5 ml Tris/Hcl pH 8 + 1 ml RNase A (5 mg/ml) + 1 ml EDTA 0,5M Ad 50 ml Aqua bidest	Promega, Mannheim Serva, München
Lösung 2	
5 ml NaOH 2M + 5 ml 10% SDS Ad 50 ml Aqua bidest	Merck, Darmstadt Pharmacia Biotech, Freiburg
Lösung 3	
14,72 g Kaliumacetat Ad 50 ml Aqua bidest Auf pH 5 einstellen mit 100% Eisessig	Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt

Eine Mini-Prep ist eine Isolation von Plasmid-DNA aus einer kleinen Menge von Bakterien.

Sie diente dazu, durch einen anschließenden Restriktionsverdau herauszufinden, ob der Vektor das gewünschte Insert enthält. Zunächst wurden 5 Vorkulturen (siehe Kap. 2.5.1.3) angesetzt. Am nächsten Morgen wurde 1 ml der Vorkultur in ein 1,5ml

## MATERIAL UND METHODEN

Eppendorf Tube überführt und abzentrifugiert (5 min 3800 g). Das Bakterienpellet wurde in 300 µl Lösung 1 resuspendiert. Es wurde 300 µl Lösung 2 hinzugefügt, invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 4°C kalte Lösung 3 hinzugegeben, invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe 10 min bei 4°C mit 20 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt, 0,7 vol Isopropanol hinzugefügt, 20 min bei -80°C gefällt und anschließend zentrifugiert (4°C, 20 800 g, 10 min). Das Pellet wurde mit 150 µl 80% Ethanol gewaschen, im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) getrocknet und in 30 µl Tris pH 8,35 resuspendiert. 15 µl wurden für den folgenden Restriktionsverdau eingesetzt und 2 Stunden bei 37°C verdaut.

Restriktionsverdau Mini-Prep		
Mini-Prep-DNA	15 µl	
+ 10 x Puffer „R“	3 µl	Fermentas, St. Leon-Rot
+ EcoRI (10 U/µl)	0,5 µl	Fermentas, St. Leon-Rot
+ HindIII (10 U/µl)	0,5 µl	Fermentas, St. Leon-Rot
+ Aqua bidest	11 µl	

Die verdauten Proben wurden mit 5 µl 6 x Lade-Puffer vermischt, in einem 1 % SB-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, unter der UV-Lampe analysiert und fotografiert. Mit einer positiven Mini-Prep (positiven Vorkultur) konnte eine Maxi-Prep angesetzt werden.

### 2.10.12 Maxi-Präparation (Maxi-Prep)

20 µl einer positiven Vorkultur dienten zum Ansetzen einer 200 ml Maxi-Prep. Alle weiteren Schritte wurden in Kapitel 2.5.2 bereits ausführlich beschrieben. Im Anschluss wurde das Konstrukt an Agowa (Berlin) versendet und Teile des Plasmids, sowie das Insert sequenziert.

## 2.11 Versuche mit RNA

### 2.11.1 RNA- Isolierung

Wie bereits beschrieben, wurden die Zellen in 500 µl Trizol aufgenommen und bei -80°C gelagert. Um die RNA der Zellen zu isolieren, wurden die Proben zunächst auf Eis aufgetaut und mit Hilfe eines Turrax-Stabes (IKA, Staufen) in Trizol homogenisiert bis die Flüssigkeit milchig erschien. Die folgenden Schritte erfolgten nach Standardprotokoll (Invitrogen, Karlsruhe). Das getrocknete RNA-Pellet wurde in 10 µl Tris/EDTA (pH 8) aufgenommen, 15 min bei 37°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) gelöst und eine photometrische Konzentrationsbestimmung vorgenommen. Die RNA wurde anschließend bei -80°C gelagert.

### 2.11.2 RNase Protection Assay

Der RNase Protection Assay diente der quantitativen Bestimmung der RNA-Expression verschiedener Gene. Dazu wurde ein Überschuss an radioaktiv markierter Einzelstrang-RNA, auch als Antisense-Sonde bezeichnet, zur Bildung stabiler doppelsträngiger RNA-RNA-Hybride verwendet. Nicht hybridisierte Einzelstrang-RNA wurde, im Gegensatz zu RNA-RNA-Hybriden, durch für einzelsträngige RNA spezifische RNasen verdaut. Die Proben wurden anschließend denaturiert und in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Autoradiographie wurde die protektierte radioaktive RNA sichtbar gemacht.

#### 2.11.2.1 Herstellung der radioaktiv markierten Sonden

Bis auf die c-Myc-Sonde, deren Herstellung bereits beschrieben wurde, waren die anderen Sonden bereits linearisiert im Labor vorhanden. Folgende Sonden wurden verwendet:



Sonde	Länge [bp]	Sonde	Länge [bp]
GAP43	340	PLP	175
NF68	311	MBP	155
c-Myc	235	Calbindin	140
Synaptophysin	200	GFAP	129
		L32	78

### 2.11.2.2 Einzelsondentest

Bevor die RNA-Proben mit einem großen Sondenset analysiert wurden, wurde die c-Myc Sonde im Einzelsondentest überprüft. Der hergestellte Vektor (pGem4z-cMyc) wurde durch einen Restriktionsverdau mit EcoRI (Fermentas, St. Leon-Roth) linearisiert und nach Standardprotokoll des *Quiagen PCR Purification Kit* (Quiagen, Hilden) aufgereinigt. Folgender 10 µl Ansatz wurde pipettiert, wovon 1 µl für die Sondensynthese in der RPA genutzt wurde (siehe unten „Transkriptionsansatz“)

Plasmid (Konzentration)	Volumen	Endkonzentration (Ansatz)
pGem4z-cMyc (c = 0,05 µg/µl)	3 µl	15 ng/µl
+ L32 (c = 0,25 µg/µl)	0,6 µl	15 ng/µl
+ Tris pH 7,4	6,4 µl	

### 2.11.2.3 Sondenset

Für die Herstellung der antisense-Sonden aus den Plasmiden wird eine T7-Polymerase verwendet. Diese synthetisiert, ausgehend vom T7-Promoter des pGem4z, eine Sonde entlang des Inserts und fällt schließlich an der EcoRI-Schnittstelle ab. Das entstehende Fragment ist komplementär zur zu detektierenden mRNA und kann somit mit dieser Hybride bilden.

## MATERIAL UND METHODEN

Der Transkriptionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Transkriptionsansatz (20,5 µl Ansatz)		
Reagenz	Vol.	Hersteller
5 x Transkriptionspuffer	4 µl	Promega, Mannheim
+ DTT 100 mM	2 µl	
+ dNTP-Mix (G-,A-,CTP: je 2,5 mM; UTP: 30µM)	1 µl	Pharmacia Biotech, Freiburg
+ Template Sondenst (15 ng/Template)	1 µl	
+ <sup>32</sup> P-UTP	5 µl	PerkinElmer, USA
+ RNA Guard (27 U/µl)	1,5 µl	Pharmacia Biotech, Freiburg
+ T7-Polymerase (10 U)	1 µl	Promega, Mannheim
+ Aqua iniectionis	5 µl	

Der Ansatz wurde mit Hilfe einer Pipette gemischt und 1 Stunde bei 37°C im Thermocycler (Bio-Rad, München) inkubiert.

### 2.11.2.4 DNase Verdau

Nach abgeschlossener Sonden-synthese wurden die DNA-Matrizen durch einen DNase-Verdau aus dem Ansatz entfernt. Folgendes wurde pipettiert:

DNase-Verdau (30,5 µl Ansatz)		
Ansatz „Transkriptionsansatz“ (s.o.)	25 µl	
+ 10 x DNase Puffer (RQ1)	2 µl	Promega, Mannheim
+ DNase I (RQ1, 10 U/µl)	1 µl	Promega, Mannheim

Dieses wurde gut gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

### 2.11.2.5 Phenol/Chloroform-Extraktion und RNA Fällung

Um die RNA-Sonden zu reinigen, wurde zunächst mit Phenol/Chloroform extrahiert:

Phenol/Chloroform-Extraktion		
Ansatz „DNase-Verdau“ (s.o.)	30,5 µl	
+ EDTA 20 mM pH 8	29 µl	Serva (München,D)
+ Tris-gesättigtes Phenol/Chloroform (1:1)	70 µl	

## MATERIAL UND METHODEN

Die Präzipitation erfolge im Anschluss in 750 µl Präzipitation-Mix auf Trockeneis. Die Proben wurden zentrifugiert, mit 80% EtOH gewaschen und in 20 ml 1 x Hybridisierungspuffer aufgenommen.

Präzipitation-Mix			
Reagenz	Vol	Endkonzentration	Hersteller
NH <sub>4</sub> Ac 5M	1,92 ml	190 mM	Merck, Darmstadt
+ 100% EtOH	48 ml	96%	Carl Roth, Karlsruhe
+ tRNA (10 mg/ml)	80 µl	16 µg/ml	Roche Diagnostics, CH

Für den 1 x Hybridisierungspuffer wurde 5 x Hybridisierungspuffer (siehe Kap. 3.2) mit Formamid (Merck, Darmstadt) im Verhältnis 1: 4 gemischt. Daraus ergeben sich die folgenden Endkonzentrationen:

1 x Hybridisierungspuffer		
PIPES pH 6.4	40 mM	Sigma Aldrich, München
+ NaCl	400 mM	Merck, Darmstadt
+ EDTA	1 mM	Merck, Darmstadt

### 2.11.2.6 Szintillationsmessung und Ansatz der Working Dilution

1 µl einer jeden Probe wurde 1:10 und 1:100 in Hybridisierungspuffer verdünnt. 1 µl der jeweiligen Verdünnung wurde im Szintillationsmesser (Bromma, Schweden) gemessen. Die Sonde wurde so verdünnt, dass sie 500 DPM/µl/UTP-Rest im Sondenmix aufwies.

Für den Ansatz der Working Dilution wurde das errechnete Volumen der Sonde mit der (Anzahl der Proben x 10µl Hybridisierungspuffer) gemischt.

2.11.2.7 Hybridisierung, RNase Behandlung, Proteinase-K Verdau

Der Hybridisierungsansatz wurde in 0,5 ml Safe Locks (Eppendorf, Hamburg) pipettiert, gemischt, anzentrifugiert und über Nacht im Thermocycler (Bio-Rad, München) inkubiert (Programm „HYB“).

Hybridisierungsansatz	
RNA Probe	2,5 µg
+ Working Dilution	10 µl

Programm „HYB“	
94°C	10 Minuten
56°C	16 Stunden

Nicht-hybridisierte Einzelstrang-RNA wurde am nächsten Tag 45 min bei 32°C verdaut. Dazu wurden 100 µl RNase-Mix auf jede hybridisierte Probe gegeben.

RNase Master Mix (25 Ansätze)		
RNase Puffer	2,5 ml	
+ RNase A (100 µg/ml)	5 µl	Promega, Mannheim
+ RNase T1 (125 U/µl)	1 µl	Promega, Mannheim

RNase Puffer (Stock)		
Reagenz	Volumen	Endkonzentration im Ansatz
Tris pH 7,5 1M	5 ml	0,01M
+ NaCl 5M	30 ml	0,3M
+ EDTA 0,5M pH8	5 ml	5mM
+ Aqua bidest	460 ml	

Da RNasen sehr stabile Enzyme sind, wurden diese durch Proteinase K inaktiviert. Es wurden 18 µl Master Mix auf jede Probe gegeben und 30 min bei 37°C im Thermocycler (Bio-Rad, München) verdaut. Folgender PK-Master Mix wurde angesetzt:

PK-Master Mix (25Ansätze)		
10% SDS	155 µl	Pharmacia Biotech, Freiburg
+ tRNA (2 mg/ml)	30 µl	Roche Diagnostics, Basel
+ Proteinase K (10 mg/ml)	30 µl	PaqLab, Erlangen
+ Aqua bidest.	235 µl	

Die Aufreinigung der verbliebenen RNA-RNA-Hybride erfolgte durch eine Phenol/Chloroform Extraktion und Präzipitation im Präzipitation-Mix auf Trockeneis. Die Hybridpellets wurden mit 80% EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 6 µl RNA-Lade-Puffer aufgenommen.

RNA-Lade-Puffer (Lagerung: -20°C)		
Reagenz	Volumen	Endkonzentration im Ansatz
Formamid	12 ml	80%
+ 0,5M EDTA pH8	3 ml	10 mM
+ Xylene Cyanol	15 mg	1 mg/ml
+ Bromphenolblau	15 mg	1 mg/ml

Als Standard diente eine 1:10 Verdünnung aus Working Dilution und Hybridisierungspuffer. 1 µl dieser Verdünnung wurden mit 6 µl RNA-Lade-Puffer versetzt. Alle Proben wurden anschließend im Heizblock (Bio-Rad, München) 3 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gelagert.

#### 2.11.2.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Es wurden 80 ml Gel angesetzt und zwischen zwei mit Spacern auseinander gehaltene Glasplatten gegossen. Das polymerisierte Gel wurde in eine Elektrophoreseapparatur (Life Technologies, Karlsruhe) eingespannt, welche mit 1 x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer befüllt wurde. Das Gel wurde etwa 30 min bei 60 W vorgewärmt. Mit einer Hamilton-Spritze wurden die Taschen des Gels beladen, wobei der Standard zum Schluss aufgetragen wurde. Die Proben wurden bei 60 W aufgetrennt. Das Gel wurde im Anschluss auf Whatman-Papier aufgezogen, mit Zellophan bedeckt und auf einem Gel-Trockenapparat (Thermo Scientific, Karlsruhe) für 30 min bei 80°C getrocknet. Das getrocknete Gel wurde auf einen Röntgenfilm (Kodak Biomax-S; Kodak Company, Rochester, USA) gelegt und bei -80°C 5 Tage exponiert. Anschließend wurde der Film entwickelt.

## MATERIAL UND METHODEN

Polyacrylamid-Gel (Ansatz für 1 Gel)		
Ragenzien	Volumen	Hersteller
Sequenziergel Verdünner	56 ml	Carl Roth, Karlsruhe
+ Sequenziergel Konzentrat	16 ml	Carl Roth, Karlsruhe
+ Sequenziergel Puffer	8 ml	Carl Roth, Karlsruhe
+ 10% APS (Ammoniumperoxodisulfat)	640 µl	Carl Roth, Karlsruhe
+ TEMED (Tetramethylethyldiamin)	32 µl	Sigma Aldrich, München

Nach der Entwicklung des Films wurde dieser eingescannt und mit dem Programm Microtek ScanWizard (Willich, Dtl) bearbeitet. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels des Programms ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

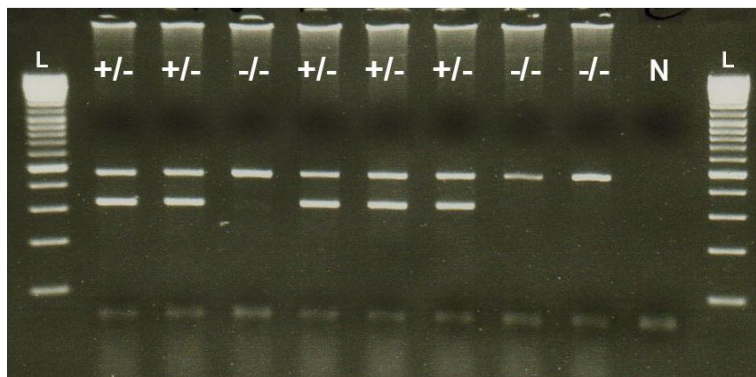
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Mausmodell

Für die Herstellung sogenannter knockout-Mäuse werden embryonale Stammzellen entnommen und in vivo vermehrt. In diese wird durch Elektroporation, Mikroinjektion oder andere Verfahren ein Inaktivierungsvektor eingebracht. Dieser Vektor wird artifiziell hergestellt und besteht unter anderem aus dem zu inaktivierenden Gen. Dieses Gen ist mit einer Mutation versehen, welches die Transkription verhindert bzw. das Protein inaktiviert. Durch homologe Rekombination wird das mutierte Gen in das Erbgut eingebaut. Es folgt eine negative Selektion der Zellen, die das Gen nicht oder an einer falschen Stelle eingebaut haben. Die genetisch veränderte Stammzelle wird in eine Blastozyste eingeführt und einer scheinchwangeren Maus implantiert. Das chimäre Tier wird mit einem Wildtypier gekreuzt. Durch Kreuzung heterozygoter Nachkommen ist ein Teil der F2-Generation homozygot.

#### 3.2 Genotypisierung

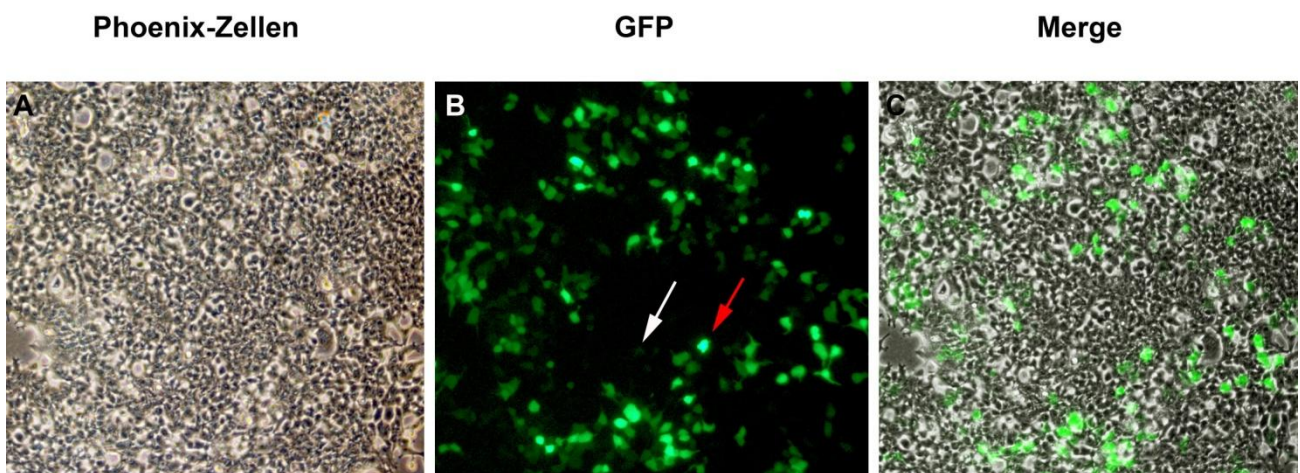
Die Nachkommen der Mauslinie sowie die Jungtiere, die für die Herstellung primärer Astrozytenkulturen genutzt wurden, wurden mit Hilfe der PCR genotypisiert (s. Abb. 3.1). Besonderes Interesse galt den homozygoten knockout-Tieren. Diese konnten durch eine einzelne knockout-Bande (450 Basenpaare (bp)) identifiziert werden. Als Negativkontrolle (N) diente ein Ansatz ohne DNA.



**Abb. 3.1. Genotypisierung mittels PCR.** Homozygote knockout-Mäuse (-/-) zeigten die Amplifikation eines 450 bp großen Fragments, während heterozygote Tiere (+/-) die Amplifikation von 2 Fragmenten (450 und 310 bp) zeigten. Die Ergebnisse wurden mit einer Negativkontrolle (N) verglichen. Als Größenstandard diente ein GeneRuler DNA Ladder Mix (L).

### 3.3 Transfektion der Phoenix-Zellen

Auf Herkunft und Funktion der ecotrophen Phoenix-Zellen (Phoenix-ECO) wurde bereits in Kap. 2.6.2 eingegangen. Es handelte sich hierbei um eine Calcium-Chlorid-Transfektion. Ein Überschuss an Calcium-Ionen veränderte die Durchlässigkeit der Zellmembran und ermöglichte die Aufnahme retroviraler Expressionsvektoren. Durch Ko-Transfektion eines speziellen Vektors (*pBabe-H2B-GFP*) konnte das Gelingen der Transfektion durch GFP-Expression der Phoenix-Zellen im Fluoreszenzmikroskop überprüft werden (s. Abb. 3.2). Da die Zellen keiner FACS-Analyse unterzogen wurden, wurden einzelne Gesichtsfelder ausgezählt, um die Effizienz der Transfektion beurteilen zu können. Diese betrug zwischen 30% und 40%, wobei die GFP-Expression verschiedener Zellen stark variierte (s. Abb. 3.2 B).

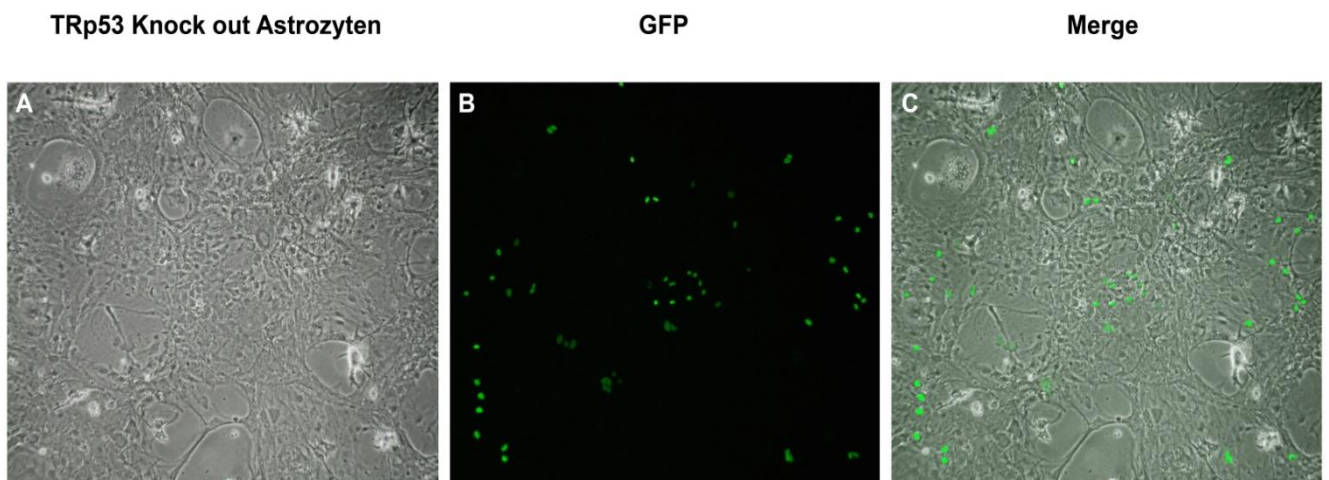


**Abb. 3.2. Ko-Transfektion der Phoenix-Zellen.** Durch Transfektion der Phoenix-Zellen (A; Vergrößerung: 100fach) mit einem GFP-Kontrollvektor (*pBabe-H2B-GFP*) konnten der Transfektionserfolg sowie die Effizienz im Fluoreszenzmikroskop (B; Vergrößerung: 100fach) beurteilt werden. Die GFP-Expression verschiedener Zellen variierte dabei stark (starke Expression: B, roter Pfeil; geringe Expression: B, weißer Pfeil).



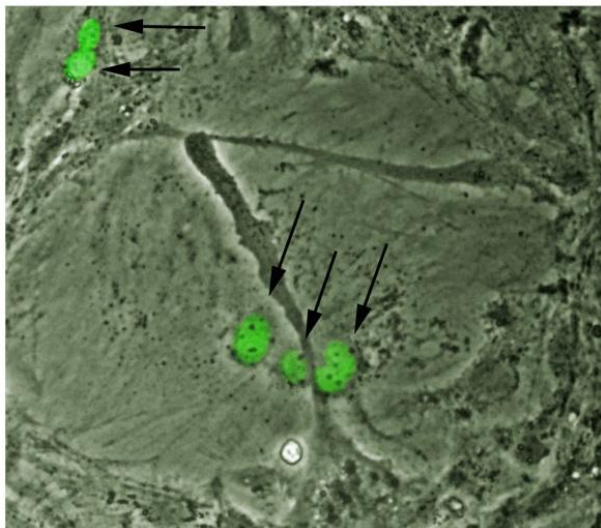
### 3.4 Infektion der Tp53 knockout-Astrozyten

Die Tp53 knockout-Astrozyten wurden mit Hilfe der durch die Phoenix-Zellen hergestellten Retroviren infiziert. Auch hier wurde eine Ko-Infektion vorgenommen, um das Gelingen der Infektion beurteilen zu können. Die Effizienz der Infektion wurde im Fluoreszenzmikroskop beurteilt (s. Abb. 3.3 bzw. 3.4), hatte jedoch für den weiteren Verlauf des Experiments keine große Bedeutung, da durch eine konsequente Selektion nur infizierte Astrozyten überlebten.



**Abb. 3.3. Ko-Infektion der Tp53 knockout-Astrozyten.** Primäre Astrozytenkultur (A; Vergrößerung 100fach). GFP-Expression infizierter Astrozyten (B; Vergrößerung 100fach ). Merge der Bilder A und B (C; Vergrößerung 100fach).

### Merge



**Abb 3.4. Ko-infizierte Tp53 knockout-Astrozyten.** Nukleäre GFP-Expression (Pfeile). Vergrößerung 200fach.

Die ko-infizierten Tp53 knockout-Astrozyten dienten der Kontrolle des Experiments und wurden nicht weiter verfolgt. Das Interesse galt den mit c-Myc ( $p53^{Myc}$ ), Akt ( $p53^{Akt}$ ) und c-Myc/Akt ( $p53^{MA}$ ) infizierten Astrozyten. Durch Selektion mit speziellen Antibiotika (Neomycin, Puromycin; s. Kap. 2.6.3) konnte nach dem vollständigen Absterben einer Kontroll-Kulturplatte nicht-infizierter Tp53 knockout-Astrozyten davon ausgegangen werden, dass nur infizierte Astrozyten auf den zu beobachtenden Kulturplatten überlebten. Diese wurden passagiert und beobachtet.

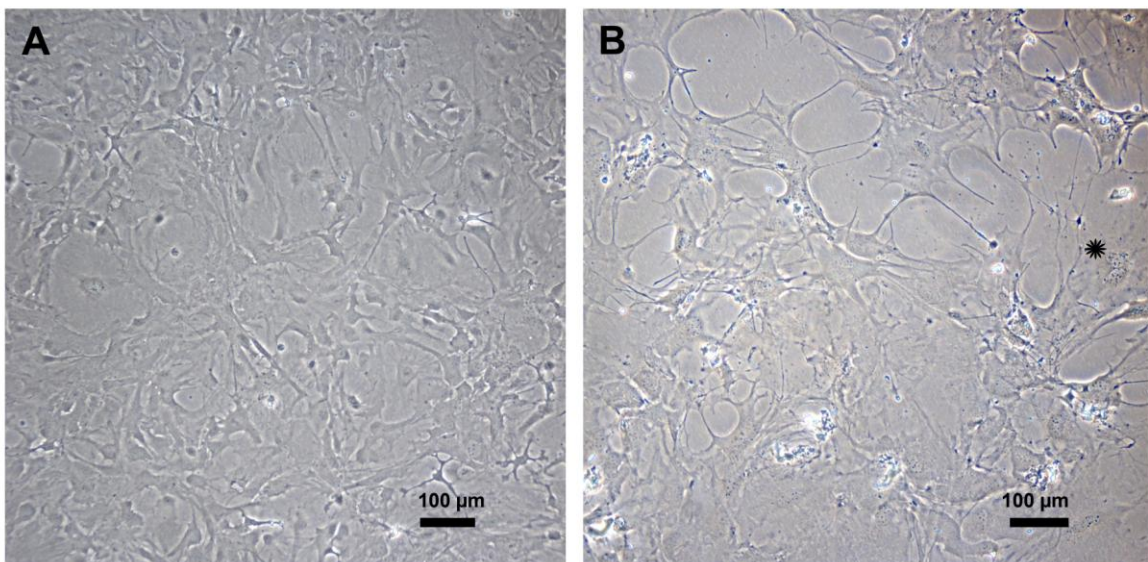
### 3.5 Phänotypische Veränderungen der infizierten Tp53-knockout-Astrozyten

Eine Malignisierung bzw. Entartung als Folge einer genetischen Instabilität hat häufig Auswirkungen auf den Phänotyp einer Zelle. Bereits der Verlust des Tumorsuppressors p53 kann zu einer Transformation im Sinne einer Akkumulation genetischer Abnormalitäten führen (73). Ausgeprägte phänotypische Unterschiede zwischen Bl6-Wildtypastrozyten und p53-defizienten Kulturen wurden mit dem Phasenkontrastmikroskop in frühen Passagen nicht beobachtet. Beide Kulturen wiesen typische astrozytäre Merkmale wie z.B. Zellausläufer auf. Allerdings konnten bei vielen  $p53^{KON}$ -Astrozyten im Gegensatz zu Bl6-Wildtyp-Astrozyten prominente Zellkerne nachgewiesen werden (Abb. 3.5 A; B, Stern). Größeren Einfluss auf den Phänotyp der Astrozyten zeigte allerdings die Überexpression der Onkogene c-Myc und Akt. Die  $p53^{MYC}$ -Astrozytenkulturen wiesen bereits in frühen Passagen charakteristische Veränderungen des Phänotyps auf, die sie sowohl von nicht-infizierten Tp53 knockout-Astrozyten ( $p53^{KON}$ ), als auch von Bl6-Wildtyp-Astrozyten unterschieden. So erschienen die Zellen einer  $p53^{MYC}$ -Astrozytenkultur sehr klein, kompakt und spindelig und erinnerten nur noch wenig an eine astrozytäre Zelle (siehe Abb. 3.5 B; F). Im Gegensatz dazu wiesen die Akt-überexprimierenden Astrozyten ( $p53^{AKT}$ ) auch in späten Passagen ein eher astrozytäres Aussehen auf. Allerdings konnten auch bei diesen Zellen einige phänotypische Besonderheiten beobachtet werden. Die Astrozyten der  $p53^{AKT}$ -Kultur erschienen groß, flächig und zeichneten sich durch große Kerne mit prominenten Nukleoli aus (siehe 3.5 B; E, Stern). Auch multinukleäre Zellen konnten beobachtet werden (s. 3.5 B; C, Pfeil). Kulturen der  $p53^{MA}$ -Astrozyten wiesen ein Mischbild oben genannter Charakteristika auf. Während die Astrozyten früher Passagen

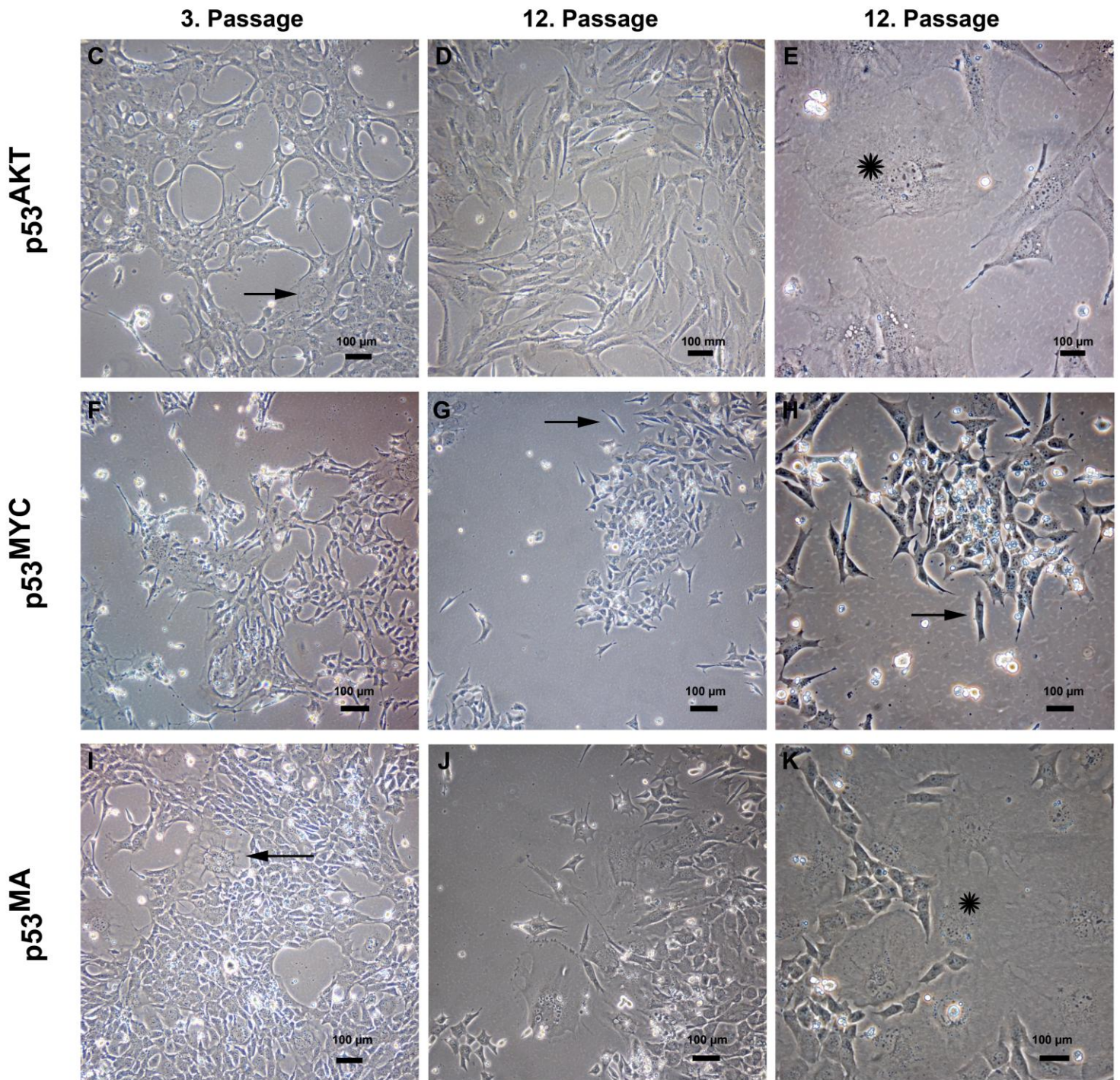
noch deutlich größer erschienen, konnten besonders in späteren Passagen meist kleine, kompakte, stellenweise aber auch große, multinukleäre Zellen beobachtet werden (s. Abb. 3.5 B; K, Stern). Folgende phänotypische Veränderungen konnten bei den infizierten Astrozytenkulturen beobachtet werden: Hyperchromatische Kerne mit prominenten Nukleoli (s. Abb. 3.5 B; K) und eine deutlich verschobene Kern-Plasma-Relation (s. Abb. 3.5 B; H) zu Gunsten des Zellkerns. Trotz individuell unterschiedlicher Morphologie, wiesen die Astrozyten der  $p53^{MYC}$ ,-  $p53^{AKT}$ - und  $p53^{MA}$ -Kulturen somit phänotypische Eigenschaften tumorigen-entarteter Zellen auf.

**Bl6 3. Passage**

**$p53^{KON}$  3. Passage**



**Abb 3.5 A: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen primärer Astrozytenkulturen verschiedener Passagen.** Bl6-Wildtypastrozyten (A) und  $p53$ -defiziente Astrozytenkulturen (B) wiesen keine großen phänotypischen Unterschiede auf. Bei einigen  $p53^{KON}$ -Astrozyten konnten deutlich vergrößerte Zellkerne nachgewiesen werden (B, Stern)

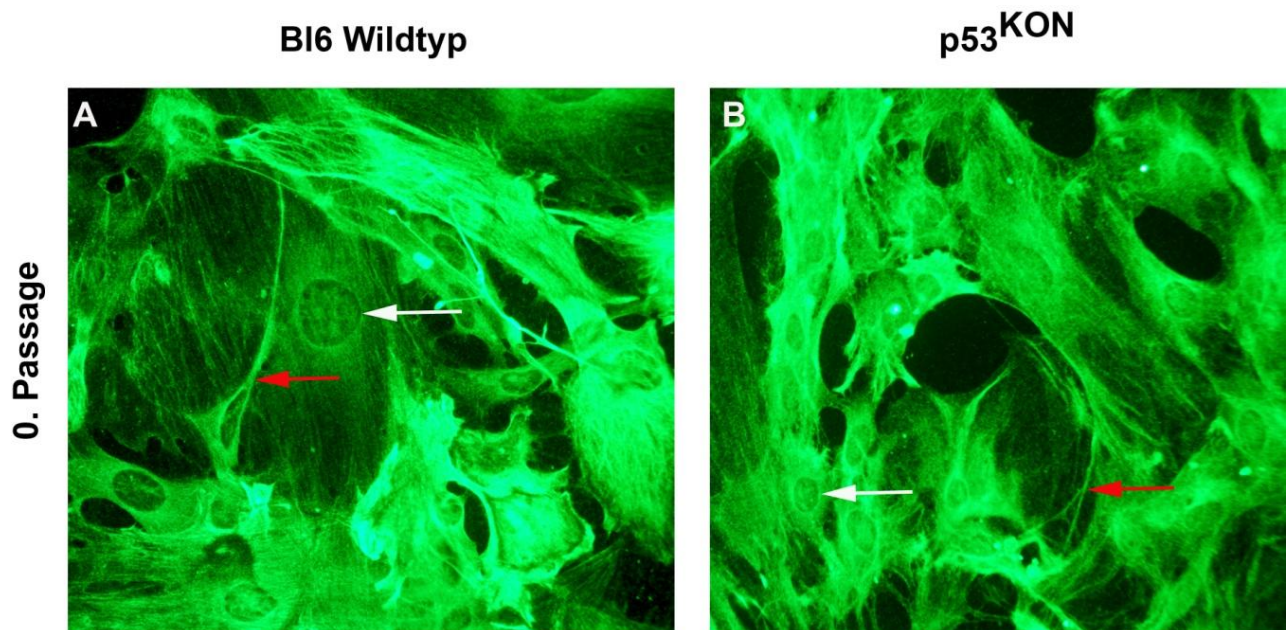


**Abb. 3.5 B. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen primärer Astrozytenkulturen verschiedener Passagen.** Durch kleine, spindelige Astrozyten mit kürzeren Fortsätzen als die Kontrollastrozyten zeichneten sich bereits frühe Passagen der  $p53^{MYC}$ -Kulturen aus (F). Spätere Passagen dieser Kulturen zeigten sehr kleine, teils bipolare Zellen mit sehr kurzen Fortsätzen (G-H, Pfeile). Auffällig war eine deutliche Abnahme der Kern-Zytoplasma-Relation. Kulturen der  $p53^{AKT}$ -Astrozyten fielen besonders in späten Passagen durch große, flächige Zellen mit großen, teils multiplen Zellkernen auf (E, Stern Pfeil). Ein sehr heterogenes Bild zeigten die  $p53^{MA}$ -Kulturen. In frühen und späten Passagen konnten kleine, aber auch große, flächige Astrozyten nachgewiesen werden (I, Pfeil; K, Stern). Eine 12. Passage der B16- und  $p53^{KON}$ -Astrozytenkultur konnte durch früheres Absterben der Kulturen nicht beobachtet werden. Vergrößerung bis auf Bild C, F, I 100fach. Bilder C, F und I 200fach

### 3.6 GFAP-Expression

#### 3.6.1 GFAP-Expression von Bl6- und p53<sup>KON</sup>-Astrozyten

Um die zu infizierenden Zellen zu charakterisieren und die maligne Transformation bzw. die Entdifferenzierung der infizierten Astrozyten beurteilen zu können, wurden diese immunzytochemisch näher untersucht. So wurden infizierte Astrozyten verschiedener Passagen mit einem Primärantikörper gegen GFAP (Glial fibrillary acidic protein) inkubiert. Bei GFAP handelt es sich um ein Protein, welches als Intermediärfilament im Zytoplasma von Gliazellen (vor allem Astrozyten) vorkommt. In der frühen Entwicklung von Astrozyten steht die Expression von Vimentin im Vordergrund. Mit zunehmender Differenzierung wird das Intermediärfilament Vimentin durch GFAP ersetzt und dient somit als Differenzierungsmarker (9). Durch Inkubation mit einem „AlexaFlour®488“-Sekundärantikörper konnte die GFAP-Expression im Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden. Durch eine gegen GFAP gerichtete immunzytochemische Färbung einer 0. Passage der p53<sup>KON</sup>-Kulturen, konnte sichergestellt werden, dass es sich bei den zu infizierenden Zellen ausschließlich um Astrozyten handelte (siehe Abb. 3.6 B). So stellten sich ca. 90% der Zellen (in einer Gegenfärbung mit Dapi) GFAP-positiv dar, wobei das Zytoskelett deutlich sichtbar wurde (Abb. 3.6; roter Pfeil) und die Zellkerne von der Färbung ausgespart waren (Abb. 3.6; weißer Pfeil).



**Abb. 3.6. GFAP-Expression von p53<sup>KON</sup>- und B16 Wildtyp-Astrozyten (0. Passage).** Inkubation der Astrozyten mit einem gegen GFAP gerichteten Primärantikörper und Alexa Fluor® 488-Sekundärantikörper. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. 90% der Zellen (Gegenfärbung mit Dapi; hier nicht dargestellt) stellten sich GFAP positiv da. Es zeigte sich ein typisches Färbemuster mit Färbung des Intermediärfilaments GFAP (roter Pfeil) und Aussparung des Zellkerns (weißer Pfeil). Vergrößerung: 1 x 400 Öl.

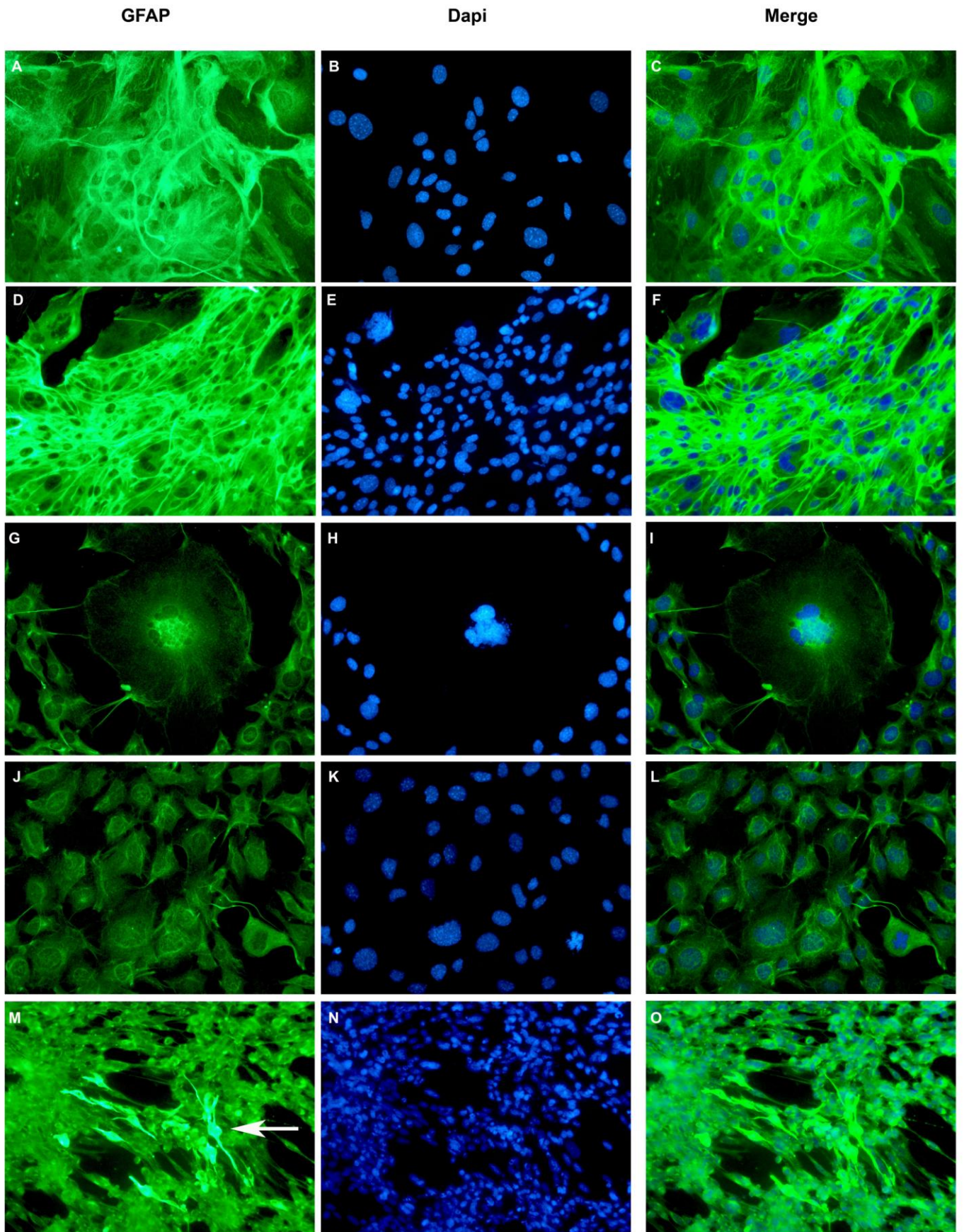
### 3.6.2 GFAP-Expression infizierter Astrozytenkulturen

Um beurteilen zu können, ob die Überexpression der Onkogene Akt und c-Myc sowie der Verlust des p53-Tumorsuppressors einen Einfluss auf die GFAP-Expression bzw. Differenzierung der infizierten Astrozyten hatten, wurde eine frühe Passage (2. Passage) und eine etwas spätere Passage (7. bzw. 8. Passage) immunzytochemisch gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Die p53<sup>KON</sup>-Astrozyten zeichneten sich unabhängig von der Passage durch eine konstante GFAP-Expression aus (Abb. 3.7 A, D). Im Gegensatz dazu kam es mit fortlaufender Passage der mit Myc oder Akt infizierten Astrozytenkulturen zu einer deutlichen Reduktion der GFAP-Expression. Durch eine besonders geringe GFAP- Immunoreaktivität zeichneten sich p53<sup>AKT</sup>-Kulturen aus. Bei diesen Kulturen konnte das Intermediärfilament immunzytochemisch schon in frühen Passagen kaum nachgewiesen werden (Abb. 3.7 G). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der p53<sup>MYC</sup>-Astrozytenkulturen zeigten eine deutliche Abnahme der Expression des Intermediärfilaments mit fortlaufenden Passagen. Im Gegensatz zu

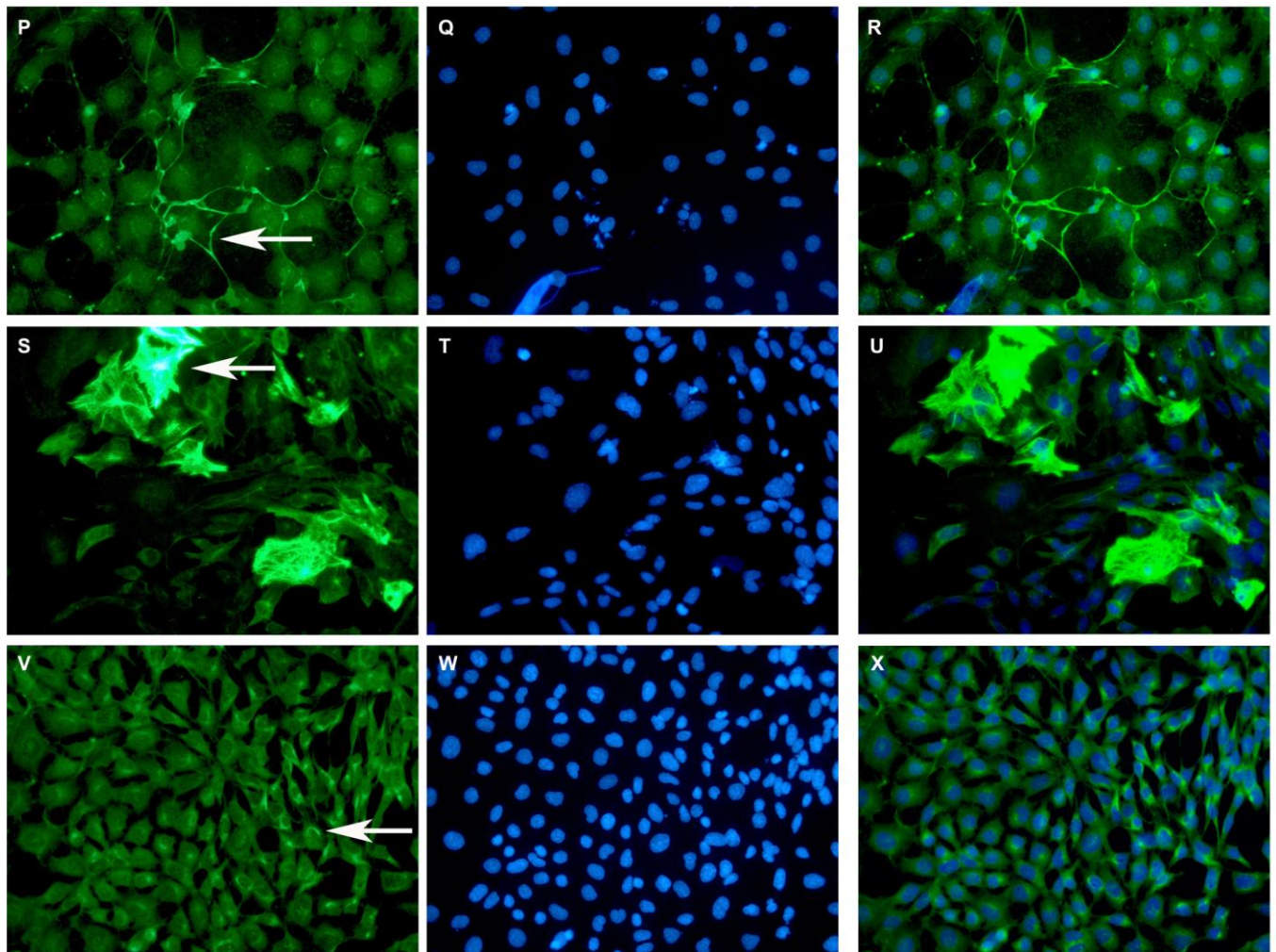
Astrozyten, die mit Akt infiziert wurden, exprimierten frühe Passagen der mit c-Myc infizierten Astrozyten jedoch deutlich mehr GFAP (Abb. 3.7 M). Die Expression ließ erst im Verlauf der Passagen deutlich nach und beschränkte sich in der 8. Passage auf einige übrig gebliebene GFAP-positive Zellausläufer (Abb. 3.7 P; weißer Pfeil).

Ein ähnliches Bild der GFAP-Expression zeigten die p53<sup>MA</sup>-Kulturen. Obwohl die Astrozyten früher Passagen weniger GFAP exprimierten als p53<sup>MYC</sup>-Kulturen, konnten im Gegensatz zu p53<sup>AKT</sup>-Kulturen in frühen Passagen noch vereinzelt stark GFAP-positive Zellen (Abb. 3.7 S, weißer Pfeil) nachgewiesen werden. Astrozyten späterer Passagen stellten sich entweder negativ dar oder zeichneten sich durch eine sehr geringe, perinukleäre, halbmondartige Expression des Intermediärfilaments aus (Abb. 3.7 V, weißer Pfeil). Zusammenfassend schien die Überexpression von Akt sowie c-Myc unabhängig voneinander zu einer Abnahme der GFAP-Expression zu führen, da alle infizierten Kulturen von Beginn an deutlich weniger GFAP exprimierten als vergleichbare p53<sup>KON</sup>-Kulturen. Ob es sich dabei um einen direkten Einfluss der Onkogene auf die GFAP-Expression oder um Dedifferenzierungsprozesse handelt, soll in Kapitel 4 näher erläutert werden. Auch die Zusammenhänge zwischen Reduktion der Zellgröße, Proliferationsrate und morphologischen Veränderungen des Phänotyps sollen dort näher besprochen werden.

*ERGEBNISSE*





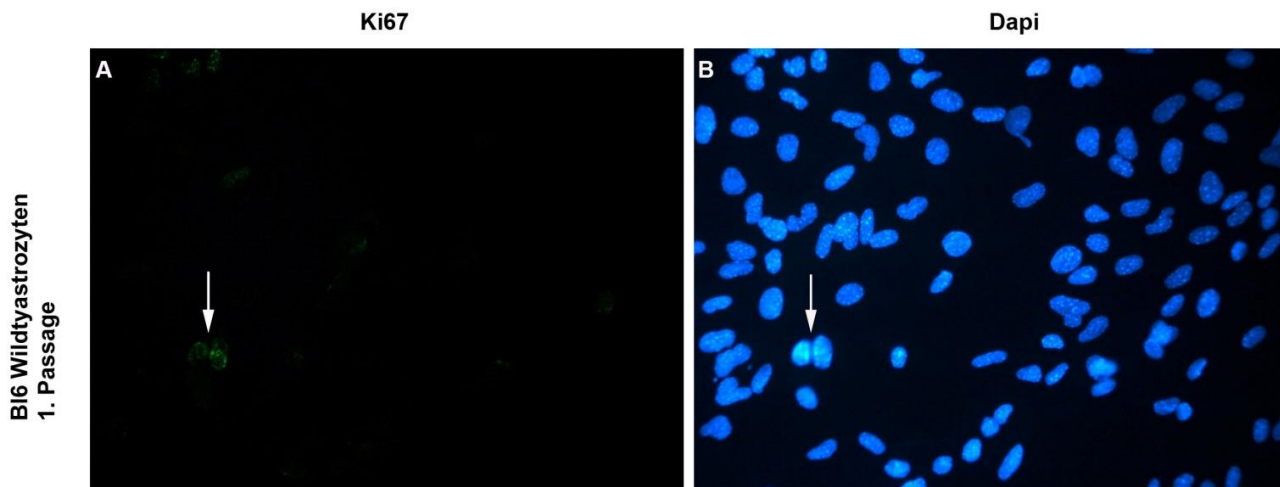


**Abb. 3.7. GFAP-Expression infizierter Astrozytenkulturen und  $p53^{KON}$ -Kulturen verschiedener Passagen.** Inkubation der Astrozyten mit einem gegen GFAP gerichteten Primärantikörper und Alexa Fluor® 488-Sekundärantikörper. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenz gegen GFAP (A,D,G,J,M,P,S,V). Markierung der Zellkerne mit Fluoreszenzfarbstoff Dapi (B,E,H,K,N,Q,T,W). Merge: Übereinanderlegen beider Fluoreszenzaufnahmen (Dapi + GFAP). Deutliche GFAP-Expression der  $p53^{KON}$ -Kulturen beider Passagen. Im Gegensatz dazu  $p53^{AKT}$ -Kulturen mit nur geringer Expression des Intermediärfilaments in frühen wie späteren Passagen. Deutliche Reduktion der GFAP-Expression im Verlauf der Passagen bei  $p53^{MYC}$ - und  $p53^{MA}$ -Kulturen. Frühe Passagen der  $p53^{MYC}$ -Kulturen (M), insgesamt jedoch deutliche höhere Expression des Intermediärfilaments als vergleichbare  $p53^{MA}$ -Kulturen (S). Als Nebenbefund konnten Veränderungen des Phänotyps beobachtet werden. Die Abnahme der Zellgröße im Verlauf der Passagen bei  $p53^{MA}$ -Kulturen und die spindeligen, kleinen Astrozyten der  $p53^{KON}$ -Kulturen (G) wurden bereits beschrieben. Außerdem waren die großen Zellkerne der  $p53^{KON}$ -Kulturen (B, E) sowie die multinukleären, flächigen Astrozyten der  $p53^{AKT}$ -Kulturen (I) auffällig (Vergrößerung: 1 x 400 Öl).

### 3.7 Proliferation der Astrozytenkulturen

#### 3.7.1 Ki67-Expression

Mit verschiedenen Methoden sollte herausgefunden werden, inwiefern die Überexpression der Onkogene c-Myc und Akt die Proliferation der Astrozyten beeinflusste. Es wurden verschiedene Passagen immunzytochemisch gegen Ki67 gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Bei dem Protein Ki67 handelt es sich um einen Proliferationsmarker. Das Antigen wird von Zellen exprimiert, die sich in den Zellzyklusphasen G1, G2, S und M befinden. Ruhende Zellen (G0-Phase) exprimieren das Antigen nicht und stellen sich daher immunzytochemisch negativ dar. Mit einer Ki67-Färbung konnte sowohl die Wachstumsfraktion als auch die Wachstumsgeschwindigkeit eingeschätzt werden. Für die Beurteilung der Proliferationsbereitschaft wurden frühe und späte Passagen aller Kulturen mit einem Antikörper gegen murines Ki67 inkubiert. Um den Einfluss des Tumorsuppressors p53 auf die Proliferationsbereitschaft beurteilen zu können, wurden Bl6-Wildtyp-Astrozytenkulturen und p53<sup>KON</sup>-Kulturen verglichen. Der Anteil proliferationsbereiter Bl6-Astrozyten war sehr gering. So konnten pro Gesichtsfeld oft nur 1 oder 2 Ki67-positive Zellen gefunden werden (Abb. 3.8). Die Bl6-Wildtypastrozytenkulturen zeichneten sich durch eine sehr geringe Wachstumsfraktion aus.



**Abb. 3.8. Ki67-Expression von Bl6-Wildtypastrozyten (1. Passage).** Inkubation mit einem Primärantikörper gegen murines Ki67 und Färbung mit einem Alexa Fluor® 488-Sekundärantikörper (A). Markierung der entsprechenden Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dapi (B). Darstellung zweier schwach Ki67-positiver Zellkerne (A, weißer Pfeil) bzw. Kennzeichnung dieser im Gesichtsfeld (B, weißer Pfeil). Vergrößerung: 400fach Öl.

Im Vergleich zu Bl6-Kulturen konnte bereits in frühen Passagen der  $p53^{\text{KON}}$ -Astrozytenkulturen (2. Passage) ein deutlich größerer Anteil proliferationsbereiter Zellkerne nachgewiesen werden (Abb. 3.9 A). Die Wachstumsfraktion dieser Kulturen nahm mit fortlaufenden Passagen kontinuierlich zu (Abb. 3.9 D). Somit hatte die fehlende Funktion des Tp53 in Bezug auf die Zellzykluskontrolle maßgeblichen Einfluss auf die Proliferationsbereitschaft der  $p53$ -defizienten Kulturen im Vergleich zu Wildtyp-Kulturen. Überraschenderweise zeichneten sich die  $p53^{\text{AKT}}$  infizierten Astrozyten nicht durch eine gesteigerte Wachstumsfraktion aus. So zeigten frühe (Abb. 3.9 G, I), aber auch spätere (s. Abb. 3.9 J, L) Passagen der  $p53^{\text{AKT}}$ -Kulturen ähnliche, oft sogar niedrigere Wachstumsfraktionen als vergleichbare  $p53^{\text{KON}}$ -Kulturen. Die Überexpression des Onkogens c-Myc schien einen weitaus größeren Einfluss auf die Proliferationsbereitschaft der Astrozyten zu haben. Die mit c-Myc infizierten Kulturen ( $p53^{\text{MYC}}$ ,  $p53^{\text{MA}}$ ) wiesen schon in frühen Passagen eine sehr hohe Proliferationsbereitschaft auf (Abb. 3.9 M, O, S, U). Im Vergleich zu  $p53^{\text{AKT}}$ - oder  $p53^{\text{KON}}$ -Kulturen konnte außerdem bei vielen Zellkernen der  $p53^{\text{MYC}}$ - bzw.  $p53^{\text{MA}}$  Astrozyten eine weitaus höhere Antigenexpression des Ki67 (z.B. Abb. 3.9 M, weißer Pfeil) nachgewiesen werden.

Unterschiede der Ki67-Expression zwischen p53<sup>MYC</sup>- und p53<sup>MA</sup>-Kulturen konnten erst in späten Passagen beobachtet werden. Wie in Abb. 3.9 ersichtlich, zeichnete sich die 8. Passage der p53<sup>MYC</sup>-Kultur (Abb. 3.9 P, R) im Vergleich zur p53<sup>MA</sup>-Kultur (Abb. 3.9 V, X) durch eine weitaus höhere Proliferationsbereitschaft aus. In späteren Passagen exprimierten bis zu 80% der p53<sup>MYC</sup>-Astrozyten das Antigen Ki67 (Abb. 3.9 R) und wiesen damit die höchste Wachstumsfraktion aller Kulturen auf. Die Überexpression des Onkogens c-Myc führte also zu einer enormen Proliferationsbereitschaft.

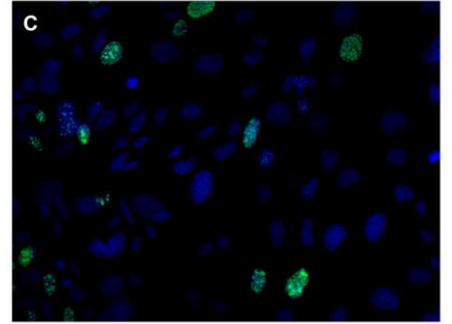
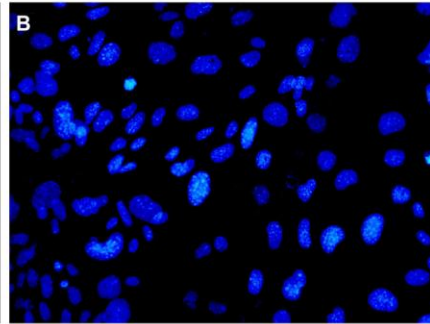
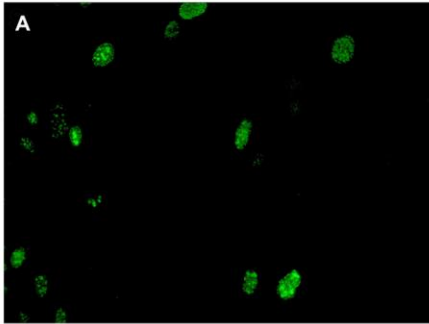
*ERGEBNISSE*

KI67

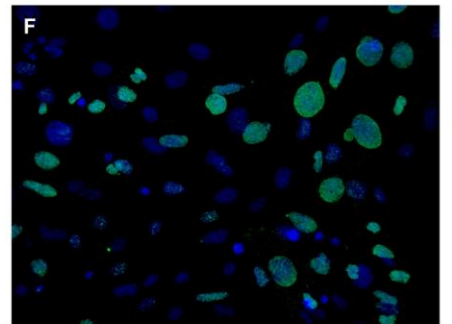
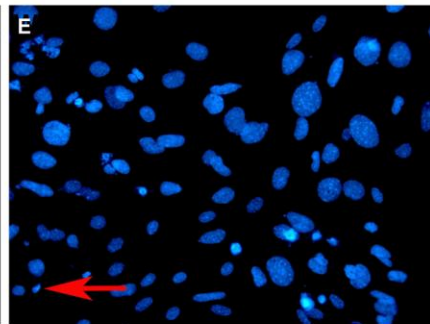
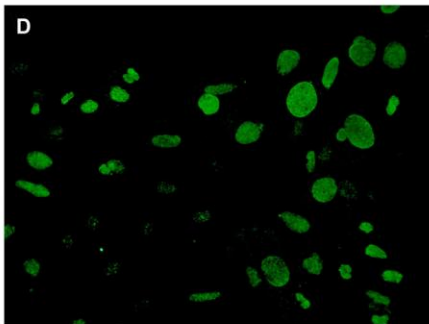
Dapi

Merge

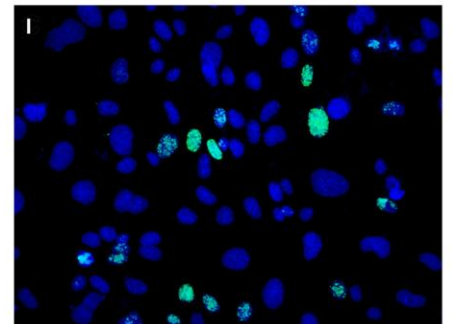
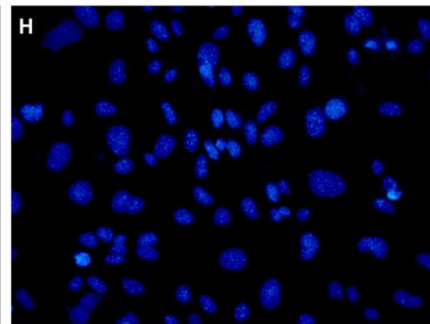
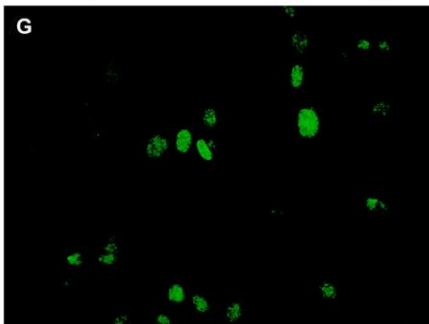
p53KON  
2. Passage



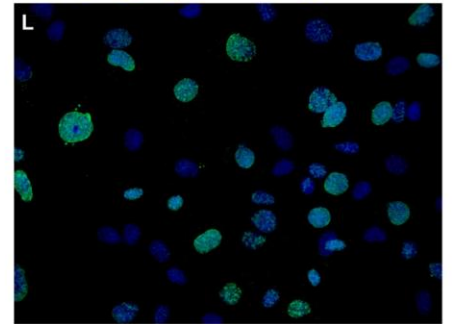
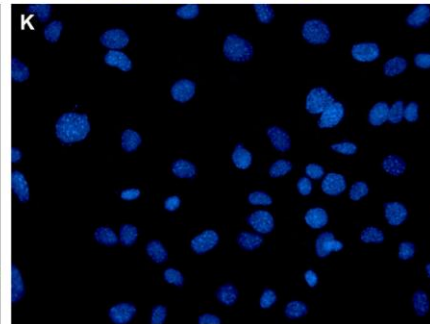
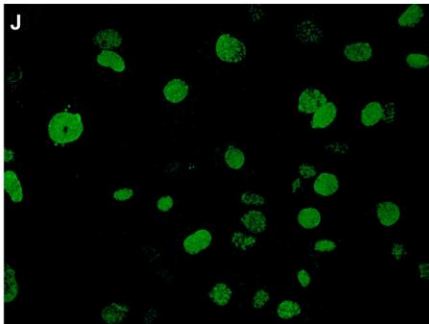
p53KON  
7. Passage

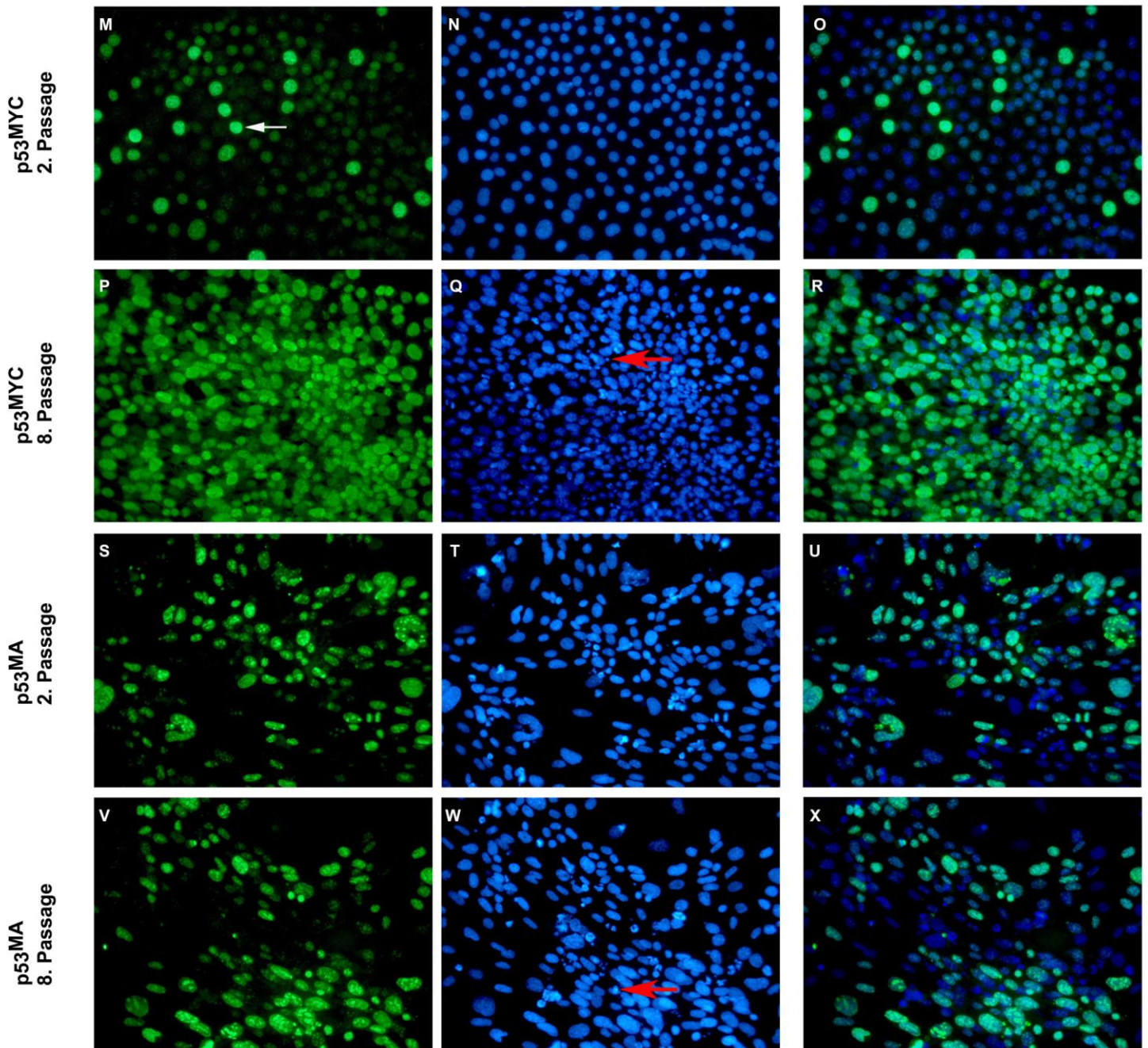


p53AKT  
2. Passage



p53AKT  
8. Passage





**Abb. 3.9. Ki67-Expression infizierter Astrozytenkulturen und p53<sup>KON</sup>-Kulturen verschiedener Passagen.** Inkubation der Astrozyten mit einem gegen murines Ki67 gerichteten Primärantikörper und Alexa Fluor® 488-Sekundärantikörper. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenz gegen Ki67 (A,D,G,J,M,P,S,V). Markierung der Zellkerne mit Fluoreszenzfarbstoff Dapi (B,E,H,K,N,Q,T,W). Merge: Übereinanderlegen beider Fluoreszenzaufnahmen (Dapi + Ki67). Bei allen Kulturen konnte im Verlauf der Passagen eine Zunahme der Proliferationsbereitschaft beobachtet werden. Eine vergleichbar geringe Wachstumsfraktion wiesen p53<sup>KON</sup>- und p53<sup>AKT</sup>-Kulturen auf. Eine weitaus größere Proliferationsbereitschaft konnte bei p53<sup>MYC</sup>- und p53<sup>MA</sup>-Kulturen beobachtet werden. Besonders viele Ki67-positive Astrozyten konnten bei p53<sup>MYC</sup>-Kulturen späterer Passagen (R) nachgewiesen werden. Als Nebenbefund konnten bei p53<sup>KON</sup>-, p53<sup>MYC</sup>- und p53<sup>MA</sup>-Kulturen vereinzelte Karyopyknoten nachgewiesen werden (E,Q,W; rote Pfeile). Als Karyopyknose bezeichnet man die Schrumpfung des Zellkerns und Verdichtung des Chromatins. Dabei handelte es sich um ein Zeichen des programmierten Zelltods (Apoptose). Vergrößerung 400fach Öl.

### 3.7.2 Passagen

Neben der Bestimmung der proliferationsbereiten Zellen durch eine immunzytochemische Färbung gegen den Proliferationsmarker Ki67, gaben auch die Passagen der Astrozyten Aufschluss über die Proliferation der Kulturen. Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop beobachtet und bei Konfluenz passagiert bzw. gesplittet. Wie stark die Astrozyten verdünnt wieder ausplattiert wurden, hing von ihrer Proliferation bzw. Wachstumsgeschwindigkeit ab. Im Laufe dieser Arbeit wurden 6 Ansätze infizierter Astrozytenkulturen verfolgt und passagiert. Das Verhalten der verschiedenen Kulturen war reproduzierbar. In Tabelle 3.1 wurden die Passagen eines Infektionsansatzes unabhängig von der Zeit beispielhaft dargestellt. Wie bereits in 3.7.1 erläutert, wiesen die mit c-Myc infizierten Astrozytenkulturen (p53<sup>MA</sup> und p53<sup>MYC</sup>) eine sehr hohe Proliferationsbereitschaft auf. Die Kulturen wurden im Durchschnitt alle vier Tage passagiert. In späteren Passagen wuchsen die Kulturen so rasant, dass sie (ca. alle vier Tage) bis zu 1:200 verdünnt werden mussten.

Passage	P53MYC	P53MA	P53AKT	P53KON
1	1:4	1:4	1:3	1:4
2	1:5	1:5	1:5	1:5
3	1:10	1:5	1:5	1:5
4	1:50	1:10	1:5	1:5
5	1:50 (19)	1:20 (19)	1:5 (34)	1:10 (27)
6	1:50	1:50	1:5	1:10
7	1:50 (31)	1:50 (26)	1:5 (46)	1:20 (53)
8	1:75	1:50	1:5	
9	1:100	1:75	1:5	
10	1:100	1:75	1:10	
11	1:100	1:100	1:10	
12	1:200	1:100	1:10	
13	1:200	1:100	1:20	
14	1:200	1:200	1:20	

**Tab. 3.1. Exemplarische Darstellung der Passagen aller Kulturen.** Repräsentativ für alle Infektionsansätze wurden 14 Passagen eines Infektionsansatzes unabhängig von der Zeit aufgelistet. Es wurde deutlich, dass die p53<sup>MYC</sup>-Kulturen am stärksten verdünnt werden mussten. Im Gegensatz dazu konnten p53<sup>AKT</sup>- und p53<sup>MA</sup>-Kulturen deutlich niedriger gesplittet werden, da die Kulturen nicht so schnell wuchsen. Diese Ergebnisse waren reproduzierbar und bestätigten die Beobachtungen der Ki67-Immunfluoreszenz. Um eine

gewisse Vorstellung vom zeitlichen Verlauf der Passagen zu gewinnen, wurden die Tage der 5. und 7. Passage in Klammern erwähnt. So wurde z.B. eine p53<sup>MYC</sup>-Kultur nach 19 Tagen, eine p53<sup>AKT</sup>-Kultur erst nach 34 Tagen zum 5. Mal passagiert.

Auf eine tabellarische Aufführung der Passagen einer B16-Wildtypkultur wurde verzichtet. Auch diese wurden über einen längeren Zeitraum beobachtet und passagiert, konnten jedoch durchschnittlich nur 6 Wochen in Kultur gehalten bzw. 3 x 1:3 gesplittet

werden, bis die Astrozyten abgestorben waren. Die in der Tabelle 3.1 dargestellten Passagen bestätigten die Beobachtungen der Ki67-Immunfluoreszenz. So wiesen p53<sup>MYC</sup>- und p53<sup>MA</sup>-Kulturen weitaus höhere Proliferationsgeschwindigkeiten als entsprechende p53<sup>AKT</sup>- bzw. p53<sup>KON</sup>-Kulturen auf. In späteren Passagen überstieg die Wachstumsfraktion der p53<sup>MYC</sup>-Astrozyten die der p53<sup>MA</sup>-Kulturen. Bestätigt wurde die geringe Proliferation der p53<sup>AKT</sup>-Kulturen. Diese wurden deutlich niedriger und seltener gesplittet als vergleichbare p53<sup>MA</sup>- und p53<sup>MYC</sup>-Kulturen. Der Nachweis vieler Ki67-positiver Zellkerne korrelierte also tatsächlich mit einer rasanten Zellteilung bzw. einem schnellen Wachstum der Kulturen.

### 3.7.3 Kulturplatten

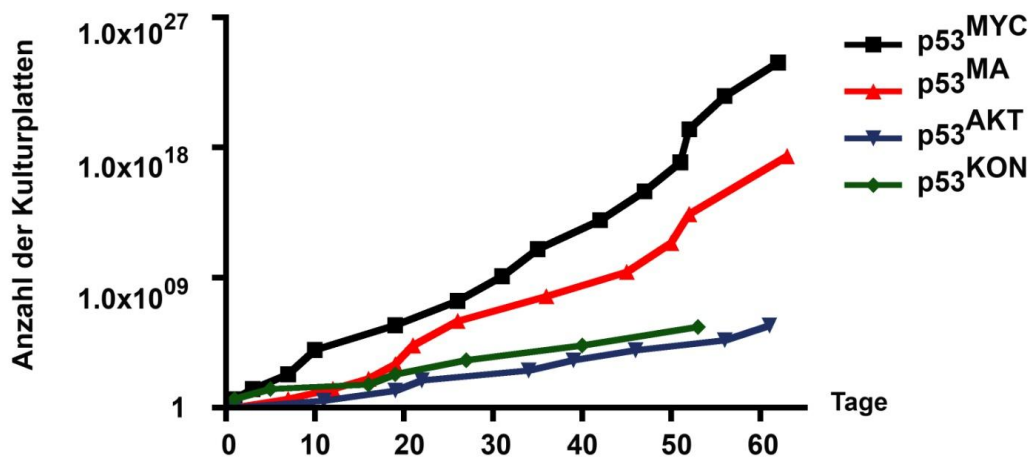
Im Falle einer Passage wurde nur der in Tabelle 3.1 dargestellte Anteil einer Astrozytenkultur ausplattiert. Der Rest der Kultur stand für weitere Experimente zur Verfügung. Um die Wachstumskinetik anschaulicher darzustellen, wurde die Anzahl der Kulturplatten (KP) berechnet, die entstanden wäre, wenn alle Zellen des Infektionsansatzes wie in Tabelle 3.1 dargestellt ausplattiert worden wären. Der Beobachtungszeitraum betrug 60 Tage. In dieser Zeit wurden die Astrozyten passagiert und ausgezählt. Die errechnete Anzahl der Kulturplatten wird in Abb. 3.10 dargestellt.

Beispiele der Berechnung:

$$p53^{MYC} \text{ (nach der 3. Passage): } 4 \text{ KP} \times 5 \text{ KP} \times 10 \text{ KP} = \underline{200 \text{ KP}}$$

$$p53^{MYC} \text{ (nach der 6. Passage): } 4 \text{ KP} \times 5 \text{ KP} \times 10 \text{ KP} \times 50 \text{ KP} \times 50 \text{ KP} \times 50 \text{ KP} \\ = \underline{25 \times 10^6 \text{ KP}}$$



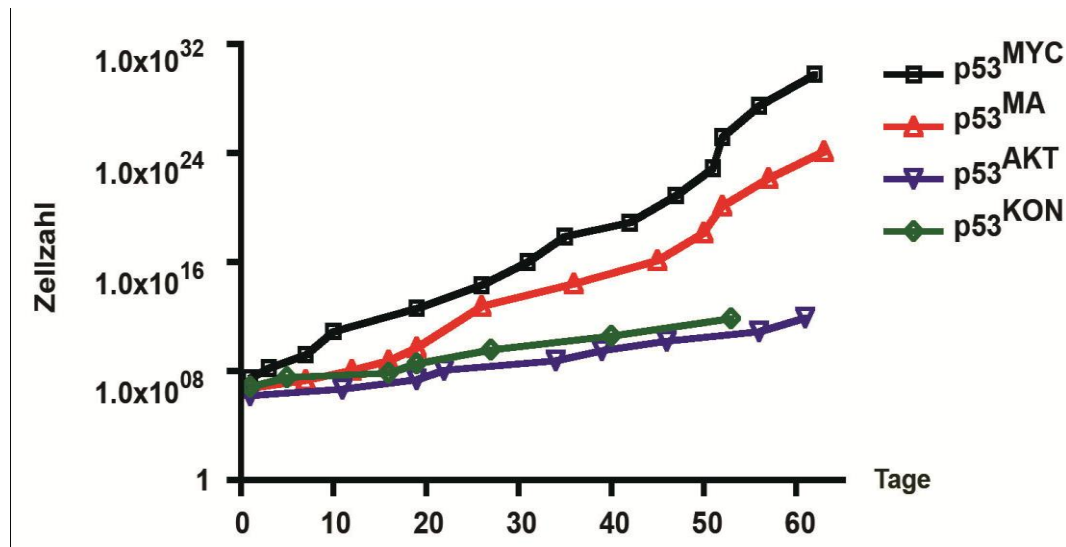


**Abb. 3.10. Errechnete Anzahl der Kulturplatten.** Die Kulturen wurden entsprechend Tab. 3.1 passagiert. Der Beobachtungszeitraum betrug 60 Tage. Für p53<sup>MYC</sup> errechnete sich im Verlauf der Passagen die größte Anzahl der Kulturplatten, da diese Kulturen am schnellsten wuchsen und dementsprechend am höchsten und häufigsten gesplittet werden mussten. Ersichtlich wurden deutliche Unterschiede der Proliferationsgeschwindigkeit der verschiedenen Kulturen.

### 3.7.4 Zellzahl

Die errechneten Kulturplatten gaben bereits einen ersten Aufschluss über das Proliferationsverhalten der Kulturen. Der Phänotyp der Astrozyten konnte bei dieser Berechnung allerdings nicht berücksichtigt werden. Wie bereits in Kapitel 3.5 erläutert, zeichneten sich aber besonders die p53<sup>MYC</sup>-Astrozyten im Verlauf der Passagen durch eine Abnahme der Zellgröße aus. Eine konfluente Kulturplatte konnte somit nur einen eingeschränkten Aufschluss über die Zunahme der tatsächlichen Zellzahl geben. Um dieser Frage jedoch Rechnung zu tragen, wurden die Astrozyten aller Kulturen im Zuge von 12 Passagen (p53<sup>KON</sup>; 7 Passagen) in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt. Die Zellzahl einer konfluenten Kulturplatte wurde dokumentiert. Am Ende des Beobachtungszeitraums von 60 Tagen wurde der Durchschnitt der Zellzahl jeder Kultur (z.B. p53<sup>MA</sup>) ermittelt und mit der Anzahl der theoretisch vorhandenen Kulturplatten (Tab.3.1) multipliziert. Somit konnten der morphologische Aspekt der Zellen sowie die Proliferationsbereitschaft berücksichtigt werden. Es konnten große Unterschiede bezüglich der Zellzahl der Kulturen festgestellt werden. So betrug die durchschnittliche Zellzahl einer p53<sup>MYC</sup>-Kultur pro konfluenter 10 cm-Kulturplatte  $8,25 \times 10^6$  Zellen. Bei

p53<sup>AKT</sup>-Kulturen handelte es sich im Gegensatz dazu nur um  $1,67 \times 10^6$  Astrozyten. Es ergaben sich aufgrund des Phänotyps also sehr verschiedene Zellzahlen, die das Zellteilungspotential der p53<sup>MYC</sup>- und p53<sup>MA</sup>-Kulturen nochmals unterstrichen. Die errechneten Zellzahlen, multipliziert mit den errechneten Kulturplatten sind in Abb. 3.11 dargestellt.



**Abb. 3.11. Anzahl der Astrozyten pro Kulturplatte.** Die Astrozyten einer konfluenten Kulturplatte wurden vor jeder Passage in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt. Aus den dokumentierten Zellzahlen jeder Passage wurde ein Durchschnitt gebildet und mit der Anzahl der errechneten theoretischen Anzahl der Kulturplatten (Abb. 3.10) multipliziert. Die p53<sup>MYC</sup>- und p53<sup>MA</sup>-Kulturen wiesen das größte Zellteilungspotenzial bzw. durch phänotypische Veränderungen auch die größte Zellzahl pro Kulturplatte auf.

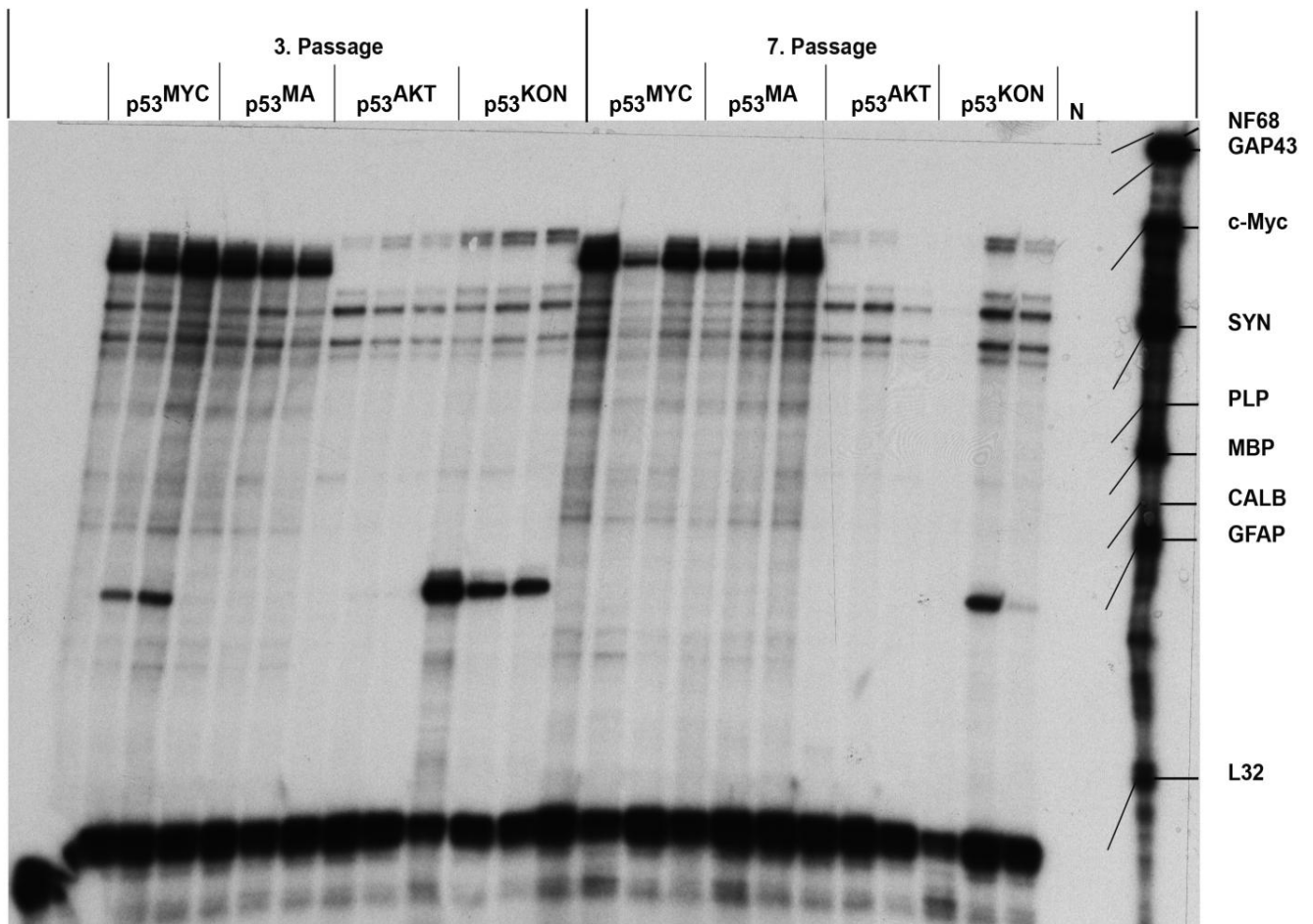
Die Berechnung der Zellzahl unterstrich nochmals den Antagonismus der p53<sup>AKT</sup>- und p53<sup>MYC</sup>-Astrozytenkulturen in Bezug auf Proliferationsbereitschaft und Wachstum der Kulturen. Die phänotypischen Veränderungen der Kulturen im Verlauf wurden bereits ausführlich beschrieben. Der Zusammenhang zwischen einer geringen Zellgröße der p53<sup>MYC</sup>-Astrozyten und ihrer immensen Proliferationsbereitschaft konnte hier eindrucksvoll beobachtet werden. Durch eine gesteigerte c-Myc-vermittelte Proliferationsbereitschaft wurde ein Eintritt der Astrozyten in die G0-Phase verhindert und Differenzierungsprozesse, wie die Ausbildung von Zellausläufern, unterbunden. Es konnte also gezeigt werden, dass eine Veränderung der Zellmorphologie und die Proliferationsbereitschaft miteinander korrelieren.

### 3.8 Immortalisierung und Apoptose

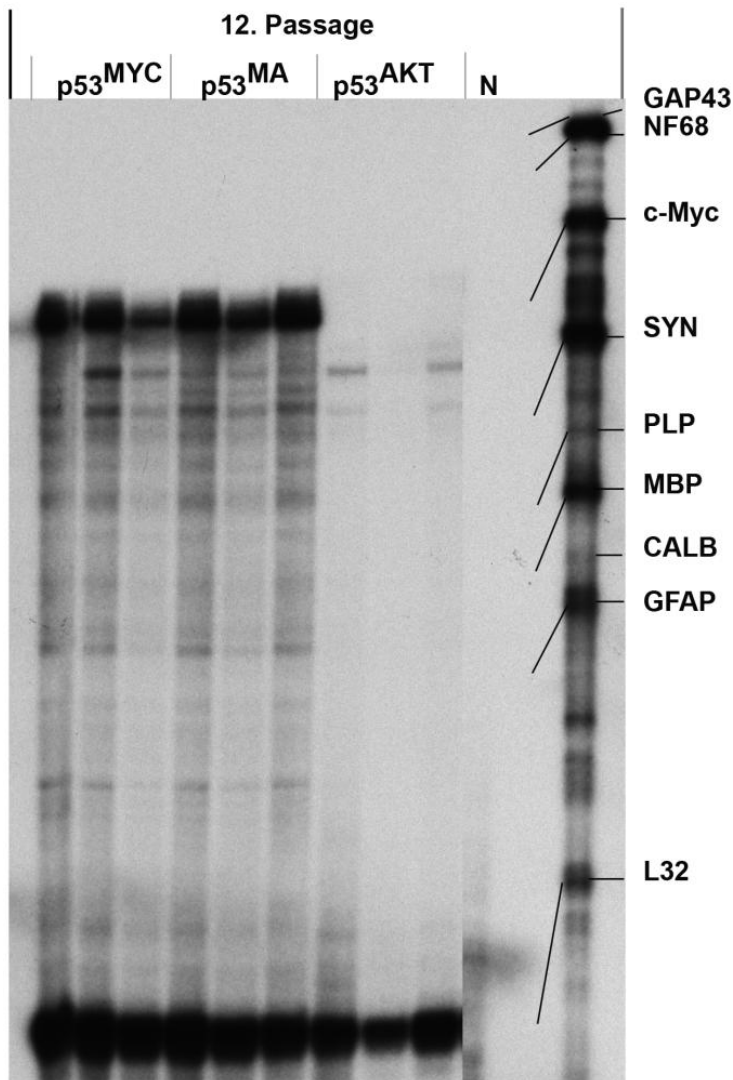
Im Verlauf dieser Arbeit wurden insgesamt 6 unabhängige Infektionsansätze (6 unabhängige p53<sup>AKT</sup>-, p53<sup>MYC</sup> - und p53<sup>MA</sup> – Kulturen) beobachtet. Das Verhalten der infizierten Astrozyten wurde mit jenem von p53<sup>KON</sup>- und Bl6-Astrozytenkulturen verglichen. Um eine möglichst große Anzahl verschiedener Zelllinien untersuchen zu können, wurden 1. Passagen auf mehrere Kulturplatten (Zusatzplatten) verteilt und weiterhin beobachtet. Die Kulturen konnten unabhängig voneinander verfolgt werden und hatten somit die Möglichkeit, verschiedene Sekundärmutationen zu generieren. Auf das Proliferationsverhalten der verschiedenen Kulturen wurde bereits ausführlich eingegangen. Während primäre Bl6-Astrozytenkulturen ein durchschnittliches Überleben von 6 Wochen aufwiesen, variierte das der p53<sup>KON</sup>-Kulturen stark. So konnten p53<sup>KON</sup>-Kulturen bis zu 3-4 Monate beobachtet werden, wurden jedoch nach einer gewissen Zeit nicht mehr passagiert, da ein großer Teil der Kultur im Verlauf unterging bzw. die Zellen abstarben. Das Überleben dieser p53-defizienten Astrozyten schien stark von der Generation bestimmter Sekundärmutationen abhängig zu sein. Auch eine Immortalisierung einzelner p53<sup>KON</sup>-Astrozyten konnte beobachtet werden, da einige Astrozyten deutlich länger überlebten als der bereits abgestorbene Rest der Kultur. Dieses stellte jedoch eine Ausnahme dar. Im Gegensatz dazu konnte sowohl bei p53<sup>AKT</sup>- als auch bei p53<sup>MA</sup>-Kulturen eine Immortalisierung der ganzen Astrozytenkultur beobachtet werden. Diese Zelllinien konnten bis zu 7 Monate beobachtet werden, bis die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren oder verworfen wurden. Ein entsprechend langes Überleben bzw. eine Immortalisierung konnte bei keiner der p53<sup>MYC</sup>-Kulturen beobachtet werden. Nach ca. 3 Monaten kam es zum Zelltod vieler p53<sup>MYC</sup>-Astrozyten. Es konnten Apoptosefiguren beobachtet werden und die untergegangenen Zellen lösten sich von der Kulturplatte. Im Falle einer graphischen Darstellung käme es dann zu einem starken Abfall der roten Kurve in Abb. 3.9 und 3.10. Nach durchschnittlich 4 Monaten konnte das Absterben der gesamten Kultur beobachtet werden. Zusammenfassend konnte nur durch Überexpression von Akt, nicht aber durch c-Myc, eine Immortalisierung erreicht werden. Eine konstitutive Aktivierung von c-Myc allein (ohne Akt) führte zu einer sehr großen Proliferationsbereitschaft, konnte den programmierten Zelltod bzw. das Absterben der Zellen jedoch nicht verhindern.

### 3.9 mRNA-Expression neuronaler und glialer Marker

Dieses Experiment diente der weiteren Untersuchung einer möglichen Dedifferenzierung der infizierten Astrozytenkulturen verschiedener Passagen. Quantifiziert wurde die RNA-Expression bestimmter Marker, welche von verschiedenen Zellen des ZNS (neuralen, oligodendroglialen und astrozytären Ursprungs) exprimiert werden. Zu den untersuchten Markern gehörten NF68 (Neurofilament 68), GAP43 ((neuron) Growth Associated Protein 43), SYN (Synaptophysin), PLP (Proteolipo-Protein 1), MBP (Myelin-Basisches Protein) und CALB (Calbindin). Des Weiteren wurde die mRNA-Expression des glialen Differenzierungsmarkers GFAP untersucht. Durch die Herstellung einer Sonde (s. Kap. 2.10), konnte auch die Expression des humanen c-Myc nachgewiesen werden.



**Abb. 3.12. Genexpression verschiedener Astrozytenkulturen der 3. und 7. Passage.** Mittels RPA wurde die Expression von verschiedenen neuronalen Markern, GFAP und humanem c-Myc analysiert. Verwendet wurden 2,5 µg Gesamt-RNA von 3 unabhängigen RNA-Proben. Im Gegensatz zu p53<sup>AKT</sup>- und p53<sup>KON</sup>- konnte bei p53<sup>MYC</sup>- und p53<sup>MA</sup>-Kulturen durch Infektion mit humanem c-Myc eine konstitutive Expression des Onkogens nachgewiesen werden. Eine GFAP-Expression konnte in 2 von 3 p53<sup>MYC</sup>-Proben (3. Passage) und in den Kontrollen (p53<sup>KON</sup>) nachgewiesen werden. Es kam zu einer Degradation einer p53<sup>KON</sup>-Probe (1. Bande, 7. Passage). Diese wurde somit nicht bewertet. Eine Expression neuronaler Marker konnte nicht beobachtet werden. Die unterste Bande jeder Bahn entsprach der mRNA, die für das konstitutiv exprimierte ribosomale Protein L32 kodiert und diente als RNA-Ladekontrolle. Als Negativkontrolle (N) diente ein Ansatz ohne RNA. Als Längenstandard wurde der radioaktiv markierte Sonden-Satz aufgetragen (rechte Bande)



**Abb. 3.13. Genexpression verschiedener Astrozytenkulturen der 12. Passage.** Mittels RPA wurde die Expression von verschiedenen neuronalen Markern, GFAP und humanem c-Myc analysiert. Verwendet wurden 2,5 µg Gesamt-RNA von 3 unabhängigen RNA-Proben. Auch hier konnte eine konstitutive Expression von c-Myc bei p53<sup>MA</sup>- und p53<sup>MYC</sup>-Kulturen nachgewiesen werden. Eine Expression von neuronalen Markern oder GFAP wurde nicht beobachtet. Da die Kontrollkulturen bereits früher abstarben, konnte eine 12. Passage nicht beobachtet bzw. hier analysiert werden. Die unterste Bande jeder Bahn entsprach der mRNA, die für das konstitutiv exprimierte ribosomale Protein L32 kodiert und diente als RNA Ladekontrolle (N=Negativkontrolle). Als Längenstandard wurde der radioaktiv markierte Sonden-Satz aufgetragen (rechte Bande).

Durch Herstellung einer Sonde für humanes c-Myc konnte die Expression der entsprechenden m-RNA in allen mit c-Myc infizierten Kulturen ( $p53^{MYC}$ ,  $p53^{MA}$ ) nachgewiesen werden. Die starken Banden sprechen für eine deutliche Expression des Onkogens in den genannten Zelllinien ( $p53^{MYC}$ ,  $p53^{MA}$ ). Bei  $p53^{KON}$ - und  $p53^{AKT}$ -Kulturen konnte die mRNA des humanen Onkogens nicht nachgewiesen werden. Es ist fraglich, ob es sich bei der Doppelbande oberhalb der Bande des humanen c-Myc um die murine Variante des Onkogens handelt. Dieses würde die Expression in allen Zelllinien (siehe 3.12 und 3.13) erklären.

Eine Expression oben genannter neuronaler Marker konnte bei keiner Kultur beobachtet, eine neuronale Differenzierung bzw. Entdifferenzierung der Astrozyten somit ausgeschlossen werden. Des Weiteren konnte eine Kontamination der Zellkulturen mit anderen Zellen des ZNS ausgeschlossen werden. Auch die Expression des glialen Differenzierungsmarkers GFAP konnte beurteilt werden. Die Kontrollkulturen ( $p53^{KON}$ ) der 3. Passage zeigten eine hohe Expression des Markers. Deutlich geringer war die Expression hingegen zum Zeitpunkt der 7. Passage. Leider ließen sich hier nur 2 Proben in die Beurteilung einbeziehen, da es sich bei der ersten Bande (Abb. 3.12:  $p53^{KON}$ ; 7. Passage) um ein Degradationsphänomen handelte. Wie in Abb. 3.12 jedoch erkennbar, wurde die GFAP-spezifische mRNA nur von einer Kultur hoch, von der anderen geringer exprimiert. Was die GFAP-Expression infizierter Astrozytenkulturen betraf, so konnten spezifische Banden nur in 2 von 3 unabhängigen  $p53^{MYC}$ -Kulturen der 3. Passage nachgewiesen werden. In späteren Passagen wurde eine Expression des glialen Markers nicht beobachtet. Es kam bei  $p53^{MYC}$ -Kulturen also zu einer raschen Herunterregulierung der GFAP-Expression im Verlauf der Passagen. Bei  $p53^{MA}$ - sowie  $p53^{AKT}$ -Kulturen konnte eine mRNA-Expression des astrozytären Differenzierungsmarkers nie nachgewiesen werden. Die Expression des Onkogens Akt führt also direkt zu einer Entdifferenzierung mit Verlust der GFAP-Expression.

Um die Ergebnisse der RPA übersichtlicher darzustellen, wurden die autoradiographischen Banden mit Hilfe des ImageJ®-Programms quantitativ analysiert und mit GraphpadPrism® bildlich dargestellt.

3.9.1 Quantitative Analyse und Auswertung der RPA

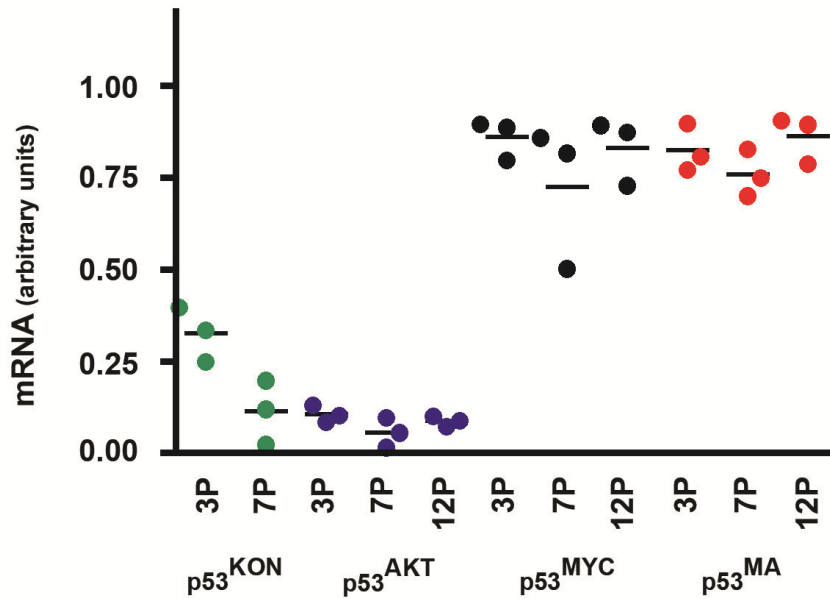


Abb. 3.14. Quantitative Analyse der autoradiographischen Banden von humanem c-Myc aus Abb. 3.12 und 3.13. Unterschied in der Expression von humanem c-Myc zwischen mit humanem c-Myc infizierten Kulturen (p53<sup>MYC</sup>, p53<sup>MA</sup>) und nicht mit diesem Onkogen infizierten Kulturen (p53<sup>KON</sup>, p53<sup>AKT</sup>).

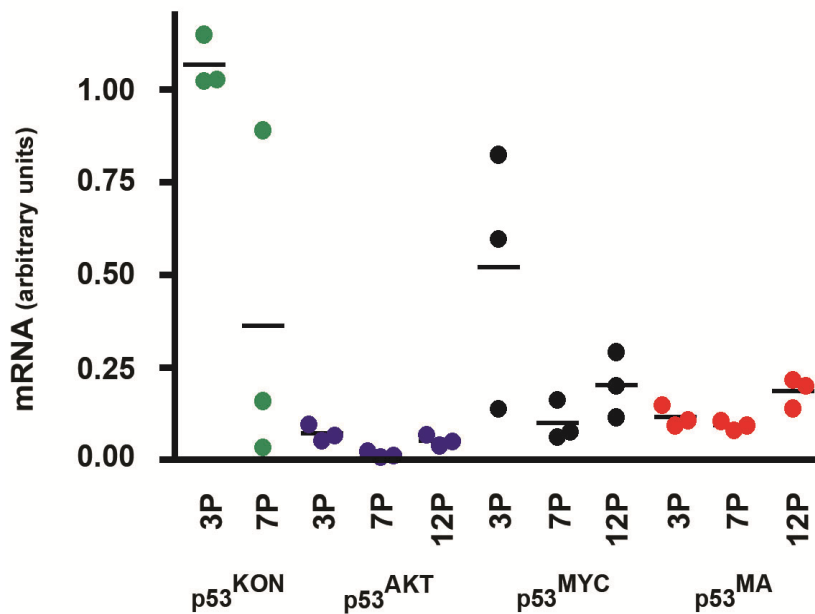


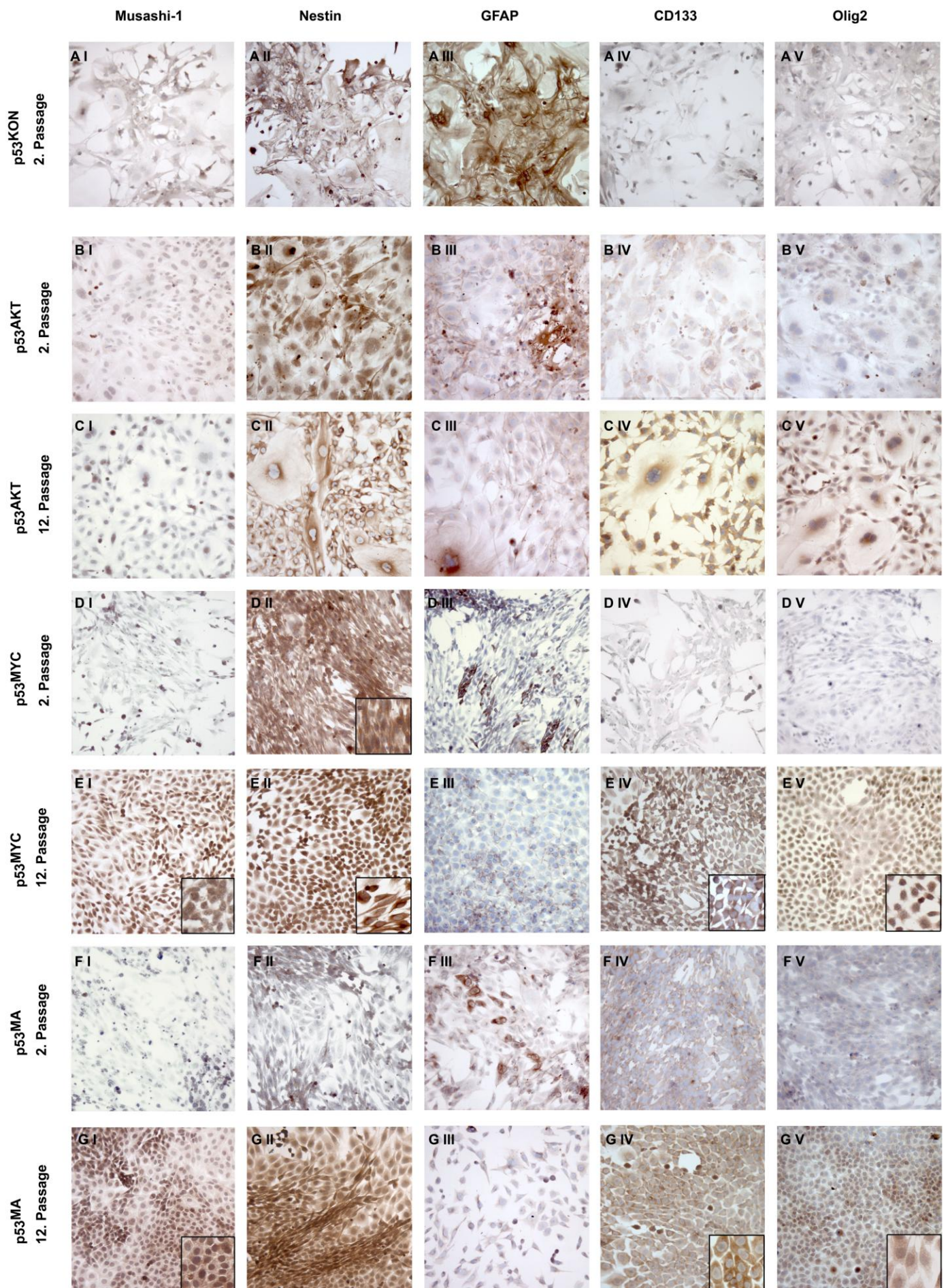
Abb. 3.15. Quantitative Analyse der autoradiographischen Banden von GFAP aus Abb. 3.12 und 3.13. Herunterregulierung der GFAP-Expression bei p53<sup>KON</sup>- und p53<sup>MYC</sup>-Kulturen im Verlauf der Passagen. Die Abnahme der GFAP-Expression der p53<sup>KON</sup>-Kulturen im Verlauf der Passagen wurde hier allerdings zu drastisch dargestellt, da die erste p53<sup>KON</sup>-Kultur (7. Passage) trotz Degradationsphänomen in die Auswertung einbezogen wurde. Eine Expression GFAP-spezifischer mRNA konnte bei keiner p53<sup>MA</sup>- oder p53<sup>AKT</sup>-Kultur beobachtet werden.

### 3.10 Expression neuronaler Stammzellmarker

In diesem Experiment sollte herausgefunden werden, ob es bei den infizierten Astrozytenkulturen zu einer Expression verschiedener Stammzellmarker kommt. Um dieses zu überprüfen, wurden Astrozyten verschiedener Passagen immunzytochemisch gefärbt und mikroskopisch beurteilt. Um die Intermediärfilamentausstattung der infizierten Astrozyten beurteilen zu können, wurden diese zusätzlich gegen den Differenzierungsmarker GFAP gefärbt. Es ist bekannt, dass primäre Astrozytenkulturen nicht nur GFAP, sondern auch Nestin exprimieren (95). Wie in Abb. 3.16 ersichtlich, konnte bei p53<sup>KON</sup>-Kulturen der 2. Passage eine geringe Nestin- (Abb. 3.16 A II), jedoch eine hohe GFAP-Expression (A III) nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte bei diesen Kulturen eine Expression von Stammzellmarkern ausgeschlossen werden. Die Akt-infizierten Kulturen (p53<sup>AKT</sup>) der 2. und 12. Passage zeigten eine sehr geringe GFAP-Expression (B III, C III), welches die Ergebnisse der RPA bestätigte. Diese Kulturen exprimierten in frühen wie auch späten Passagen deutlich mehr Nestin (B II, C II) als GFAP. Bei den p53<sup>MYC</sup>- und p53<sup>MA</sup>-Kulturen kam es im Verlauf der Passagen zu einer Herunterregulierung des GFAP. Während bei beiden Kulturen zum Zeitpunkt der 2. Passage noch vereinzelt GFAP-positive Zellen nachgewiesen werden konnten (D III, F III), stellten sich Astrozyten der 12. Passage GFAP-negativ dar. Eine starke Nestin-Expression konnte bei p53<sup>MYC</sup>-Kulturen in frühen wie späten Passagen (D II), bei p53<sup>MA</sup>-Kulturen nur in sehr späten Passagen (G II) festgestellt werden. Die Expression der Stammzellmarker Olig2 und Musashi-1 konnte in frühen Passagen der Kulturen nicht nachgewiesen werden. Eine Musashi-1-Expression konnte erst in späten Passagen der p53<sup>MYC</sup>- und p53<sup>MA</sup>-Kulturen durch Anfärbung der Zellkerne mit Aussparung der Nukleoli beobachtet werden. Akt-infizierte Kulturen exprimierten diesen Stammzellmarker zu keinem Zeitpunkt. Ein ähnliches Bild bot die Immunzytochemie gegen Olig2, da auch dieses Protein erst in späten Passagen nachgewiesen werden konnte. Allerdings konnte eine deutliche Expression des Markers bei p53<sup>MA</sup>- und p53<sup>MYC</sup>-Kulturen der 12. Passage nachgewiesen werden (E V, G V), während die Expression bei p53<sup>AKT</sup>-Kulturen der 12. Passage deutlich geringer ausfiel. Es handelte sich also bei den p53<sup>AKT</sup>-Kulturen um eine geringere Aufregulierung von Olig2 (C V). Eine CD133-Expression konnte zum Zeitpunkt der 12. Passage bei allen infizierten Kulturen beobachtet werden. Des Weiteren konnte eine Expression des



Oberflächenantigens bei p53<sup>MA</sup>-Kulturen bereits zum Zeitpunkt der 2. Passage nachgewiesen werden (F IV). Bei CD133 handelt es sich um ein Oberflächenantigen. In angeschnittenen Geweben (bzw. angeschnittenen Zellen) stellt sich eine positive Immunhistochemie gegen CD133 durch die Anfärbung der Zellmembran, nicht jedoch des Zytoplasmas dar. Da es sich hier jedoch um die Anfärbung einer komplett erhaltenen Zelle (mit komplett erhaltener Zellmembran) handelte, erschien der Körper der Zelle positiv. Es war somit schwer zu beurteilen, ob es sich bei der CD133-Positivität um eine unspezifische zytoplasmatische oder eine echte, die ganze Zirkumferenz der Zellmembran betreffende, Färbung handelte. Zusammenfassend konnte eine Aufregulierung von neuronalen Stammzell- bzw. Progenitormarkern im Verlauf der Passagen erst zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt beobachtet werden. Der Übersichtlichkeit halber wurden in Abb. 3.16 nur 2 Passagen dargestellt. Dazwischen wurden weitere Passagen immunzytochemisch untersucht. Eine deutliche Expression von neuronalen Stammzellmarkern konnte aber erst bei Kulturen der 12. Passage nachgewiesen werden.



**Abb. 3.16. Expression von neuronalen (Stammzell-)markern.** Die infizierten Astrozytenkulturen und Kontrollkulturen (p53<sup>KON</sup>) wurden immunzytochemisch gefärbt. Die

infizierten Astrozytenkulturen exprimierten deutlich weniger GFAP als vergleichbare p53<sup>KON</sup>-Kulturen. Die Expression von Nestin stellte sich bei Kontrollkulturen gering, bei infizierten Kulturen deutlich stärker dar. Während p53<sup>MYC</sup>- und p53<sup>AKT</sup>-Kulturen das Intermediärfilament bereits in frühen Passagen exprimieren, kam es bei p53<sup>MA</sup>-Kulturen erst in späten Passagen zu einer immunzytochemisch positiven Reaktion. Musashi-1 konnte nur bei p53<sup>MA</sup>- sowie p52<sup>MYC</sup> der 12. Passage nachgewiesen werden. CD133 und Olig2 konnten bei allen infizierten Kulturen der 12. Passage beobachtet werden. Vergrößerung: 1 x 20; (kleine Zusatzbilder: 400fach)

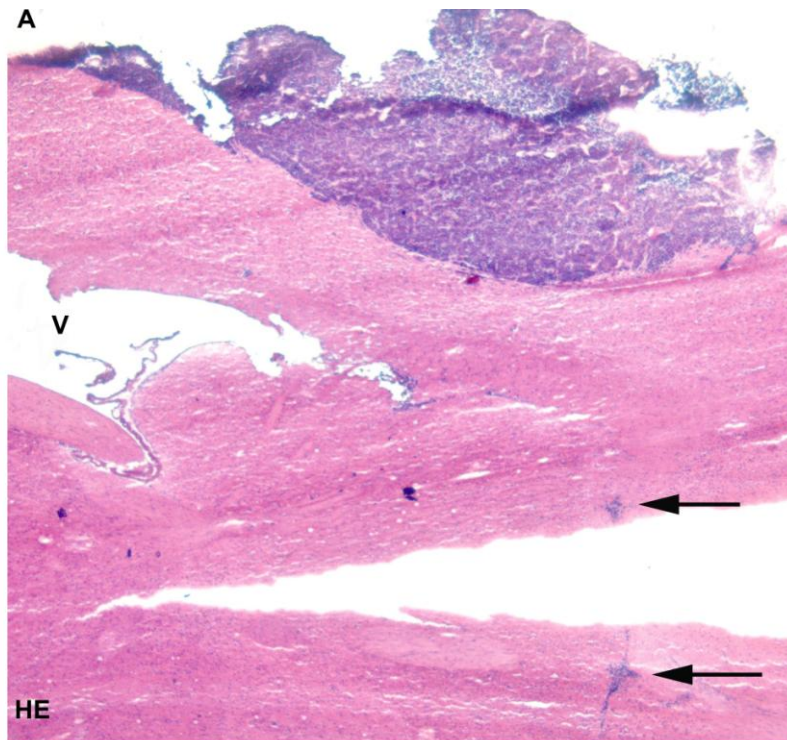
### 3.11 Stereotaktische Implantation von Tumoren

Mit diesem Experiment sollte herausgefunden werden, ob es durch stereotaktische Injektion infizierter Astrozyten in das rechte Striatum von Bl6-Wildtyp- bzw. RAG 2 knockout-Mäusen zu einer Tumorentstehung kommt. Es wurden Astrozyten verschiedener p53<sup>MA</sup>-Kulturen von den Kulturplatten gelöst, ausgezählt, mehrmals mit PBS gewaschen und in einem von der Zellzahl abhängigen Volumen PBS aufgenommen. Die Konzentration betrug 10<sup>4</sup> Astrozyten pro µl PBS. Es wurden mehrere Operationsserien durchgeführt. Eine erste Serie mit 4 Bl6-Tieren diente der Etablierung des Experiments. Den Tieren wurden 40.000 p53<sup>MA</sup>-Astrozyten stereotaktisch injiziert. Zwei Tiere erhielten Astrozyten einer 1. Passage und die anderen beiden Tiere die Zellen einer 6. Passage. Nach 21 Tagen wurden die Hirne der Tiere entnommen und am Kryostaten geschnitten. Es gelang jedoch kein Nachweis einer Tumormorphologie in dieser Versuchsreihe. Es folgten weitere Operationsserien:

- 2. Serie: 4 Bl6-Mäuse; 80.000 p53<sup>MA</sup>-Astrozyten (8. Passage)
  - 3. Serie: 4 Bl6-Mäuse; 60.000 p53<sup>MA</sup>-Astrozyten (3. Passage)
- 4 RAG 2 knockout Mäuse; 60.000 p53<sup>MA</sup>-Astrozyten (3. Passage)

Leider verstarb ein Tier der 2. Serie während der OP und konnte somit nicht in die Auswertung einbezogen werden. Die Hirne der Mäuse wurden 21 Tage post-OP entnommen, bei -80°C gelagert und am Kryostaten geschnitten sowie HE gefärbt. Bei einem Tier der 2. Serie wurde das Hirn erst nach 28 Tagen entnommen. Dieses Tier fiel nach 28 Tagen mit einer akuten Schwellung an dem rechten Hemikranium auf und wurde daraufhin getötet. Die Tumorentwicklung dieses Tieres wurde in Abb. 3.17 dargestellt. Es handelte sich um einen Tumor, der nicht nur rasant wuchs (große Tumormasse und zahlreiche Mitosen), sondern auch die Kalotte des Tieres durchbrach und zerstörte. Es fanden sich Tumorzellen zwischen den Knochenbälkchen der Kalotte

(Abb. 3.17 B). Der Tumor wuchs scharf abgegrenzt, das Hirn verdrängend (Abb. 3.17 A), den Knochen der Kalotte jedoch infiltrierend. Insgesamt konnte bei 2 von 3 Tieren der 2. Serie sowie bei allen Tieren der 3. Serie nach 21 Tagen eine Tumorbildung nachgewiesen werden. Vier der entstandenen Tumoren aus Serie 3 wurden in Abb. 3.18 abgebildet und mit Pfeilen gekennzeichnet.



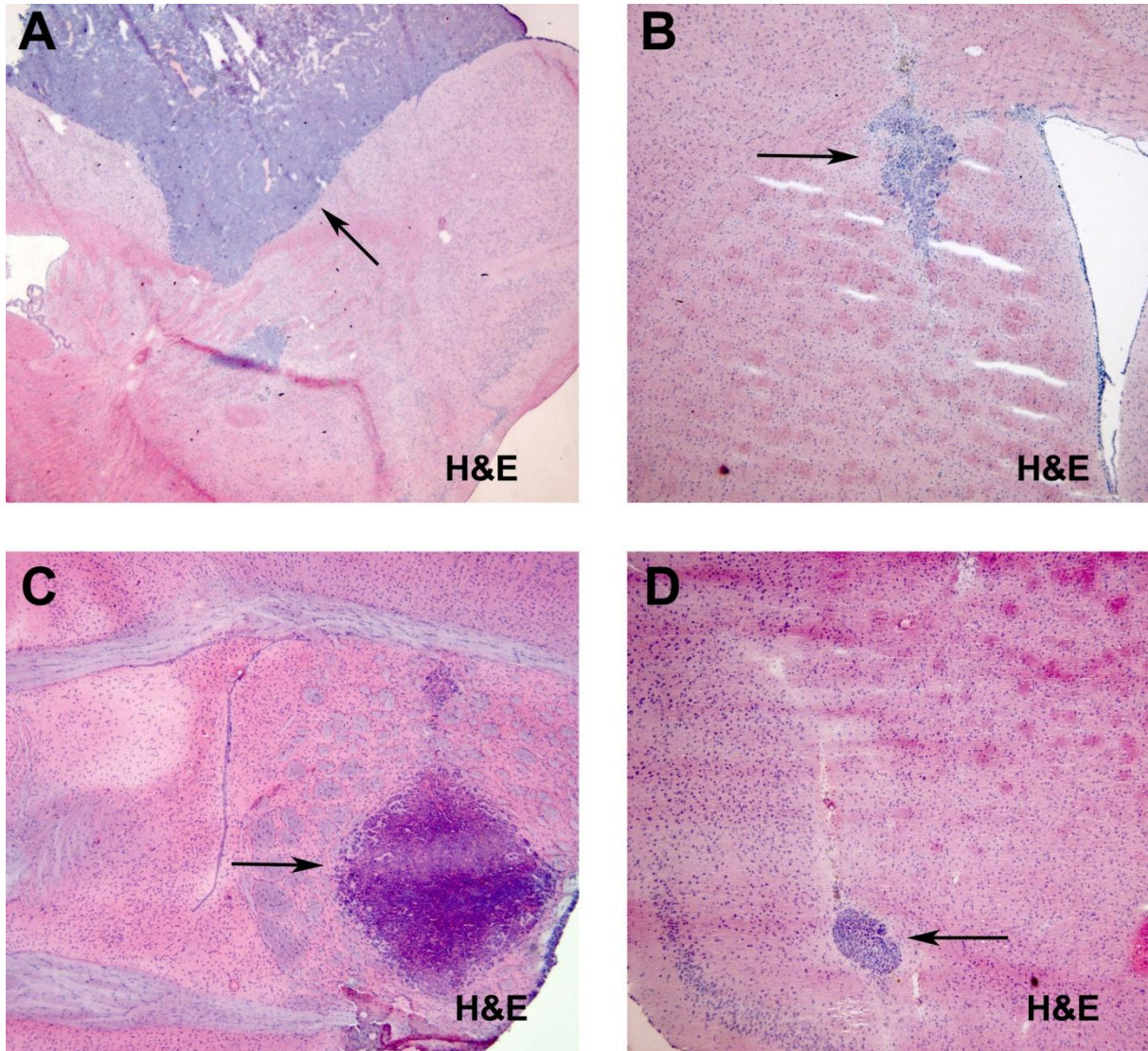
**Abb.3.17 A. HE-Färbung eines Tumors.**

Darstellung eines Tumors, der das Hirngewebe durch schnelles Wachstum deutlich verdrängte. Es handelte sich um ein Tier aus der 2. OP-Serie, dessen Hirn nach 28 Tagen entnommen wurde. Das Schockgefrorene Hirn wurde am Kryostaten geschnitten. Die Schnitte wurden HE gefärbt. Deutlich erkennbar, die im Stichkanal verbliebenen Astrozyten (Pfeile). Die Zellen bzw. der Tumor färbte sich blau, während das Gewebe rosa erschien. Seitenventrikel (V). Vergrößerung: 1x 2,5.



**Abb.3.17 B. Infiltration der Kalotte.**

Bei einem Tier der 2. OP-Serie konnte eine Infiltration der Kalotte durch die Tumorzellen beobachtet werden. Die Kalotte (Stern) war mit Tumorzellen durchsetzt (Pfeil). Das Tier war zuvor durch eine Schwellung an dem rechten Hemikranium aufgefallen. Vergrößerung: 1 x 20.



**Abb. 3.18. HE-Färbung verschiedener Tumoren (Pfeile).** Den Mäusen wurden p53<sup>MA</sup>-Astrozyten stereotaktisch in das rechte Striatum injiziert. Die Hirne wurden entnommen und am Kryostat geschnitten. Die Schnitte wurden HE gefärbt. Die Tumoren (Pfeile) erschienen blau, während sich das Gewebe rosa anfärbte. Bei Abb. 3.16 und Bild A handelte es sich um verschiedene Anschnitte desselben Tumors. Weitere abgebildete Tumoren (B, C, D) entstammten Mäusen, deren Hirn bereits nach 21 Tagen entnommen wurde. Tumoren der 2. OP-Serie (A, C) erschienen deutlich größer als Tumoren der 3. OP-Serie (B, D). Vergrößerung A: 1 x 2,5; B-D: 1 x 5.

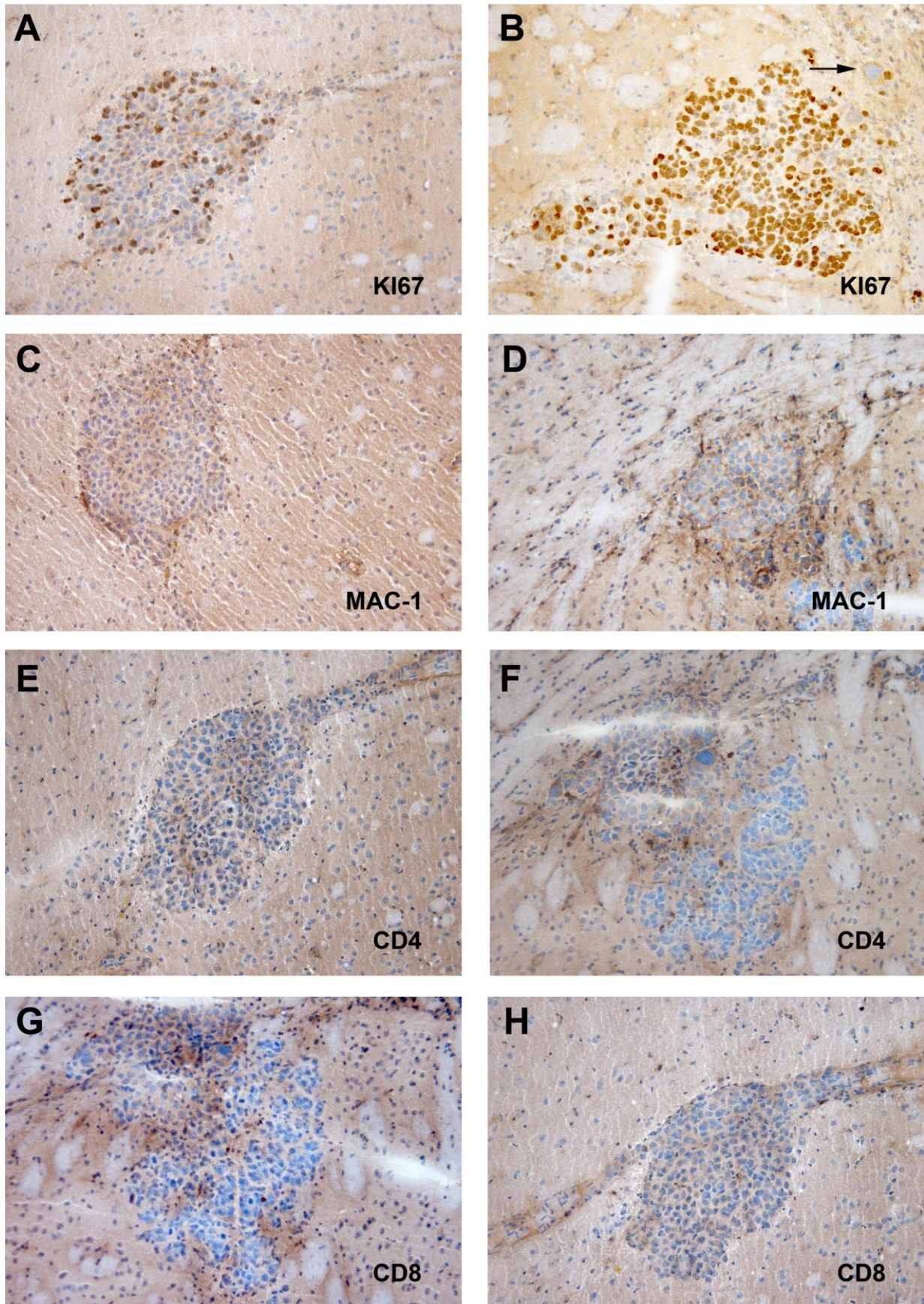
Mäuse der 2. OP-Serie (Abb. 3.18. A, C) entwickelten größere Tumoren als Tiere der 3. OP-Serie (B, D). Die Größe des entstandenen Tumors hing von der Anzahl der injizierten Astrozyten, wichtiger jedoch, von der Passage der Zellen ab, da Astrozyten späterer Passagen einen deutlich größeren Tumor formierten. Jedoch besaßen alle Zellen (3. und 8. Passage) die Fähigkeit im Hirn zu überleben und eine wachsende

Tumormasse zu bilden. Des Weiteren hatte auch die Verweildauer der Astrozyten Einfluss auf die Ausdehnung des Befunds, da ein sehr großer Tumor bei einem Tier der 2. OP-Serie beobachtet werden konnte, dessen Hirn erst nach 28 Tagen entnommen wurde (Abb. 3.17). Die injizierten Astrozyten (unabhängig von der Passage) waren also tumorigen. So konnte nicht nur das Überleben der injizierten Astrozyten über einen Zeitraum von bis zu 28 Tagen, sondern auch eine Proliferationsbereitschaft der stereotaktisch injizierten Astrozyten im Fremdhirn (Kap. 3.12) nachgewiesen werden. Die in das Hirn injizierten Astrozyten bildeten eine Tumorformation, die das gesunde Hirngewebe lokal verdrängte. Des Weiteren wurde der entstandene Tumor nicht vom Immunsystem des Tieres erkannt. Einige Tumoren wuchsen sehr scharf begrenzt (Abb. 3.18 A). Andere wiederum zeigten ein eher aufgelockertes Wachstum (Abb. 3.18 C). Ein für das Glioblastoma multiforme typisches, infiltratives Wachstum konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die entstandenen Tumoren verdrängten abhängig von ihrem Ausmaß das umliegende Hirngewebe, wie es bei Metastasen beobachtet wird.

### 3.12 Immunhistochemische Färbung der implantierten Tumoren

Die Schock-gefrorenen Hirne wurden am Kryostaten geschnitten. Die Schnitte wurden abwechselnd auf normale und Superfrost-Objektträger aufgenommen. Die Schnitte auf den normalen Objektträgern (OT) wurden HE-gefärbt, während die Schnitte auf den Superfrost-OT für immunhistochemische Färbungen genutzt wurden. Wie bereits erwähnt, wurde eine 3. Serie mit 4 Bl6- sowie 4 RAG 2-knockout-Mäusen operiert. Den RAG 2 defizienten Mäuse fehlte das RAG 2-Gen (recombination activating gene 2), welches zusammen mit Recombination Activating Gene 1 (rag 1) essentiell für die V(D)J-Rekombination der Immunglobulinketten ist. Dieser genetische Defekt blockierte frühe Entwicklungsphasen von B- und T-Lymphozyten. Die Tiere besitzen keine funktionsfähigen T- sowie B-Lymphozyten und sind somit immundefizient. Das folgende Experiment sollte den Einfluss des Immunsystems auf das Wachstum des Tumors bzw. das Überleben der injizierten Astrozyten im Hirn untersuchen. Die verwendeten Mausmodelle und die injizierten Astrozyten besaßen denselben genetischen Hintergrund (C75 BL/6), eine mögliche Aktivierung des Immunsystems sollte dennoch ausgeschlossen werden. Durch Operation beider Mauslinien sollte der

Einfluss von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auf das Tumorwachstum untersucht werden. Bei der histologischen Auswertung der Kryostatschnitte konnte jedoch kein Unterschied zwischen B16- und RAG2 defizienten-Mäusen in Bezug auf Größe und Phänotyp der Tumoren entdeckt werden. Es konnte keine Infiltration von T-Lymphozyten in den Kryostatschnitten der B16-Mäuse nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.19 E-H). Des Weiteren wurde auch die Makrophageninfiltration in das Hirn der operierten Mäuse quantifiziert. Durch eine immunzytochemische Detektion des Makrophagen-Antigens Mac-1 konnten Makrophagen nachgewiesen werden. Weder bei B16- noch bei RAG2-defizienten-Mäusen konnte eine starke Infiltration durch Fresszellen beobachtet werden (Abb. 3.19 C, D). Ein Abbau der Tumorzellen bzw. eine Aktivierung des Immunsystems gegen die Tumorzellen konnte demnach ausgeschlossen werden. Des Weiteren sollte die Proliferationsbereitschaft der entstandenen Tumoren durch eine Immunzytochemie gegen Ki67 beurteilt werden. Wie bereits beschrieben, verdrängten alle entstandenen Tumoren das umliegende Hirngewebe, wiesen jedoch eine unterschiedliche Proliferationsbereitschaft auf. Während einige Tumoren eine deutliche Proliferationsbereitschaft aufwiesen (Abb. 3.19 B), konnte bei anderen nur eine auffallend geringe Anzahl Ki67-postiver Astrozyten beobachtet werden (Abb. 3.19 A). Abschließend ist jedoch zu erwähnen, dass die injizierten Astrozyten bzw. die entstandenen Tumoren im Hirn der operierten Mäuse überlebten, wuchsen und die Fähigkeit besaßen, das Hirngewebe zu verdrängen.



**Abb. 3.19. Immunhistochemische Färbungen der Kryostatschnitte der entstandenen Tumoren. Abbildung von jeweils 2 Beispielen.** Die Kryostatschnitte der entstandenen Tumoren wurden immunzytochemisch gefärbt. Die Kryostatschnitte wurden mit verschiedenen Primärantikörpern (B16-Tiere: CD4, CD8, Mac-1, Ki67, RAG2-knockout: Mac-1, Ki67)



## *ERGEBNISSE*

inkubiert. Mittels Immunhistochemie der Schnitte gegen Ki67 konnten die proliferationsbereiten Zellen des Tumors nachgewiesen werden. Die Tumoren zeigten verschiedene Wachstumsfraktionen (A, B). Einige tumoröse Astrozyten konnten an den großen Zellkernen erkannt werden (B, Pfeil). Eine Infiltration von T-Lymphozyten (bei Bl6-Tieren) und Makrophagen konnte nicht nachgewiesen werden (Vergrößerung: 100fach).

## 4. Diskussion

### 4.1 Eignet sich eine p53 knockout-Mauslinie bzw. primäre p53 knockout-Astrozyten zur Etablierung eines Mausmodells für das sekundäre Glioblastom?

Das p53-Tumorsuppressor-Protein (Tp53) ist maßgeblich verantwortlich für den Erhalt der genetischen Stabilität bzw. Integrität der Zelle. Durch bestimmte Mutagene, wie z.B. ionisierende Strahlung oder virale Onkogene, kann es zur Schädigung bzw. Veränderung des Erbguts kommen. Dieses führt zur Aktivierung des Tumorsuppressors p53, was einen Zellzyklusstopp oder die Reparatur der DNA zur Folge hat. Ist die Schädigung des Erbguts irreparabel, kommt es durch die Aktivierung des p53 zum programmierten Zelltod (Apoptose). Infolgedessen kann eine Mutation bzw. ein Verlust des Tumorsuppressors zur Tumorigenese (67) führen. Es ist somit nachvollziehbar, dass Tp53-defiziente Mäuse (homozygote Tp53 knockout-Mäuse) bereits sehr früh verschiedene Tumoren (4), u.a. auch Hirntumoren entwickeln (45). Der Verlust des Tumorsuppressors p53 geht auch beim Menschen mit einer hohen Prädisposition für die Entwicklung maligner Hirntumoren einher. So entwickeln Betroffene des Li-Fraumeni-Syndroms bereits in jungen Jahren maligne Gliome (102).

Wie bereits ausführlich in der Einleitung vorgestellt, wird zwischen primärem und sekundärem Glioblastoma multiforme unterschieden. Während das primäre Glioblastom de novo entsteht, entwickelt sich das sekundäre aus einer niedriggradigeren Vorläuferläsion (niedriggradiges Astrozytom). Auch auf die typischen Mutationen, die diese beiden Entitäten voneinander unterscheiden, wurde bereits ausführlich eingegangen. Bei der Tp53-Mutation handelt es sich um eine sehr frühe Mutation, die in einer Mehrzahl (ca. 60%) niedriggradiger Astrozytome sowie in sekundären Glioblastomen entdeckt werden kann. Die Daten der wissenschaftlichen Literatur weisen darauf hin, dass es sich bei der Mutation um eine maßgebliche genetische Alteration handelt, die die Progression bzw. Transition zu einem höhergradigen Astrozytom bzw. malignen Tumor ermöglicht (13, 30). Es lag also für die Versuchsanordnung vorliegender Experimente nahe, ähnliche Bedingungen für die Entwicklung eines neuen Mausmodells für das sekundäre Glioblastom zu schaffen. Die beschriebene Mutation des Tp53-Gens kann zu einem kompletten Funktionsverlust des Proteins führen. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass eine Mutation das

Protein so moduliert, dass diese pathologische Effekte aufweicht. Natürlich handelte es sich in dieser Arbeit im Gegensatz zu einer Mutation um einen kompletten knockout des Tp53-Gens. Allerdings konnte auf diese Weise die Funktion des Gens bzw. Proteins vollkommen unterdrückt werden, um die Auswirkungen verschiedener Onkogene (hier Akt und c-Myc) auf eine mögliche neoplastische Transformation primärer Astrozyten zu untersuchen. Des Weiteren ebnete ein Tp53-knockout den Weg zu einer erhöhten Wachstumsfraktion und einer spontanen Immortalisierung (73) der Astrozyten. Durch Substitution entsprechender Wachstumsfaktoren kann bei lange kultivierten p53 knockout-Astrozyten im Verlauf eine maligne Transformation beobachtet werden (8, 112). Der knockout des Tp53 stellte daher in dieser Arbeit eine Voraussetzung für die Generierung astrozytärer Zelllinien dar, da eine Infektion und somit Überexpression von c-Myc allein oder in Kombination mit Akt bei Bl6-Astrozyten zu einem raschen Zelltod führte. Dies kann einerseits dadurch erklärt werden, dass eine Überexpression von c-Myc zu einer direkten Aktivierung des ARF/p53 Signalwegs und im Folgenden zu einer Apoptose führt (68). Andererseits könnten durch die c-Myc-bedingte Proliferation, Sekundärmutationen entstanden sein, welche die DNA schädigten und so indirekt zu einer Aktivierung des p53-getriggerten Zelltods in Bl6-Tieren führten. Da bei den Bl6-Astrozyten eine deutlich niedrigere Infektionseffizienz beobachtet werden konnte, muss in Betracht gezogen werden, dass der Infektionsvorgang selbst zum Absterben der Bl6-Astrozyten führte. Die Tatsache, dass p53 zu einer Repression von c-Myc führt, unterstreicht die Gegensätzlichkeit der Funktion dieser Gene. Die p53-Defizienz schien also eine Voraussetzung für das Gelingen des Experiments zu sein, da die Induktion der Apoptose und somit ein frühes Absterben der Zelllinien verhindert werden konnte. Des Weiteren zeigen Tp53-defiziente Astrozyten nicht nur per se eine höhere Proliferationsrate, sondern auch einen deutlichen Überlebensvorteil (73) gegenüber Bl6-Astrozyten. Dies bestätigten auch die Ergebnisse dieser Arbeit: Kultivierte Tp53-defiziente Astrozyten wiesen ein deutlich längeres Überleben auf als vergleichbare Bl6-Astrozyten. Bei einigen p53-knockout-Kulturen konnte sogar eine in der Literatur bereits beschriebene Immortalisierung beobachtet werden (73). Eine Tp53-Defizienz ermöglichte somit nicht nur einen langen Beobachtungszeitraum der Kulturen, sondern begünstigte eine durch die Onkogene c-Myc und Akt induzierte Transformation der Astrozyten.

## 4.2 Sind Akt und c-Myc potentielle Onkogene zur Induktion von Gliomen?

Bei c-Myc handelt es sich um einen Helix-loop-Helix-Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Vielzahl muriner und humaner Gene reguliert. Das Gen hat großen Einfluss auf die Proliferation und Zelldifferenzierung. Die Expression des Gens kann u.a. durch Wachstumsfaktoren induziert werden (2). Insbesondere in proliferierenden Zellen können hohe c-Myc-RNA-Spiegel nachgewiesen werden. Zellen, die durch retrovirale Infektion c-Myc überexprimieren, zeichnen sich, unabhängig von externen Wachstumsfaktoren, durch eine rasante Proliferation aus (66). Es ist möglich, dass die c-Myc bedingte genetische Instabilität eine indirekte Folge der promotischen Funktion des Onkogens darstellt. Andererseits hemmt c-Myc auch direkt einige Gene, wie z.B. Gadd45 (Growth Arrest and DNA Damage), welche die Zelle vor DNA-Schäden und Tumorformationen schützen (63).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es sich bei c-Myc um ein sehr potentes Onkogen handelt, das in der Ätiologie vieler Tumoren eine wichtige Rolle spielt. Auch in einem bestimmten Prozentsatz von Glioblastomen kann eine Amplifikation bzw. Überexpression des c-Myc-Gens gefunden werden (44, 105).

Was das Verhalten der mit c-Myc infizierten Tp53-defizienten Astrozyten ( $p53^{MYC}$ ) betraf, so konnte die in der Literatur beschriebene rasante Proliferation durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden: Die  $p53^{MYC}$ -Astrozyten wiesen die größte Wachstumsfraktion (Ki67-Immunhistochemie) und Anzahl von Mitosen auf. Die Zellpopulation wuchs rasant und mußte sehr oft passagiert werden (siehe Kap. 3.7). Die Zellen hatten also einen deutlichen Proliferationsvorteil. Allerdings konnte durch die Überexpression von c-Myc keine Immortalisierung der Astrozyten erreicht werden. Die Zellen hatten zwar einen geringen Überlebensvorteil gegenüber den nicht infizierten Tp53-defizienten Astrozyten, die Kulturen starben jedoch nach 3-4 Monaten ab. In der Literatur wird diskutiert, dass die Überexpression von c-Myc zu einer Zunahme des programmierten Zelltods führen kann (54). Da p53-abhängige Apoptosesignalwege, wie z.B. der ATM- oder ARF-Signalweg (86) durch die p53-Defizienz keine Rolle spielen dürften, scheinen andere Signalwege zum programmierten Zelltod der Astrozyten zu führen. So kommt es z.B. in c-Myc-überexprimierenden Zellen zu einer p53-unabhängigen Suppression des antiapoptotischen Bcl-2 sowie zu einer Induktion der pro-apoptotischen Gene Bax und Bak (40). Dieses könnte erklären, warum es nicht

gelang, die p53<sup>MYC</sup>-Zelllinie zu immortalisieren. Eine generelle Immortalisierung aller Ansätze über den Beobachtungszeitraum konnte in den vorliegenden Untersuchungen nur bei Akt-überexprimierenden Astrozyten beobachtet werden. Diese schien unabhängig von der c-Myc-Überexpression zu sein, da sowohl die p53<sup>AKT</sup>- als auch die p53<sup>MA</sup>-Zelllinien immortalisiert werden konnten. Bei Akt handelt es sich um eine Serin/Thyrosin-Kinase. Durch Phosphorylierung bestimmter Proteine hat Akt einen sehr großen Einfluss auf die Hemmung der Apoptose und damit Förderung des Zellüberlebens. So führt eine Überexpression von Akt beispielsweise zu einer Inhibition von BAD und Caspase 9 (64) - zwei sehr wichtigen Mediatoren des programmierten Zelltods. Des Weiteren wird Akt für die Resistenz vieler Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika (21, 28) verantwortlich gemacht.

Der PI3K-Signalweg spielt auch bei der Genese des primären und sekundären Glioblastoma multiforme eine wichtige Rolle, da eine Vielzahl dieser Tumoren eine Überexpression des Onkogens aufweisen (92). Oft hängt dies offensichtlich mit einer Mutation des PTEN-Tumorsuppressors zusammen (77) - einem Antagonisten des Phosphoinositid-3-Signalwegs (103). In einem gewissen Prozentsatz maligner Glioblastome kann eine Inaktivierung beider Tumorsuppressoren (PTEN und p53) beobachtet werden. Dieses hat eine Aktivierung von c-Myc und eine maligne Transformation der Zellen zur Folge (116).

Durch die Modulation einiger am Zellzyklus beteiligten Substrate gilt Akt als ein proliferationsförderndes Onkogen. Es hemmt z.B. durch Phosphorylierung die antiproliferativ wirkenden CDK-Inhibitoren P21/Waf1/Cip1 und P27/Kip2 (59, 96) und induziert das für die Zellzyklusprogression verantwortliche Cyclin D1 (80). Eine durch die Überexpression von Akt induzierte Proliferation konnten wir in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Die mit Akt infizierten Astrozyten (p53<sup>AKT</sup>) proliferierten langsamer und wiesen eine geringere Wachstumsfraktion auf (Ki67-Immunhistochemie) als vergleichbare Kontrollastrozyten (p53<sup>KON</sup>). Des Weiteren fiel auf, dass Astrozyten, die mit c-Myc allein infiziert wurden (p53<sup>MYC</sup>), schneller proliferierten als Astrozyten, die beide Onkogene überexprimierten (p53<sup>MA</sup>). Da jedoch die p53<sup>MA</sup> sehr viel rasanter proliferierten als die p53<sup>AKT</sup>, zeigte dies erneut den großen proliferationsfördernden Einfluss des c-Myc. Es bleibt zu bedenken, dass in vielen Tumoren, wie auch im Glioblastoma multiforme, nicht Akt selbst, sondern PTEN mutiert oder ein LOH (loss of heterozygosity) zu einem Funktionsverlust des Tumorsuppressors führt (55). Der

Verlust eines funktionierenden PTEN führt in der weiteren Signalkaskade zu einer Überexpression von Akt. Durch eine Infektion der p53-defizienten Astrozyten mit Akt wurde das Onkogen kontinuierlich überexprimiert. Im Gegensatz zu Gliomzellen verfügten die Astrozyten jedoch über ein intaktes PTEN. Dessen Funktion ist neben der Hemmung des PI3K/Akt-Signalwegs auch die direkte Induktion proliferationshemmender Mediatoren wie p27KIP1 und p21Waf1 sowie die Herunterregulierung von Cyclin D und Cyclin A (52). Eine Überexpression von c-Myc hemmt wiederum den CDK-Inhibitor p27KIP1 (3).

Da in der Literatur keine Hinweise auf eine proliferationshemmende Funktion des Akt gefunden werden konnten, kann zusammenfassend postuliert werden, dass die Akt-vermittelte proliferationsfördernde Wirkung ganz offensichtlich durch andere intakte Signalwege der Astrozyten gehemmt wurde und dass es sich bei c-Myc um ein weitaus potenteres Onkogen in Bezug auf die Proliferationsförderung handelt, das durch selbige Signalwege nicht beeinflusst wurde. Durch die in der aktuellen Arbeit vorliegenden Untersuchungen, gelang die Herstellung von Astrozytenzelllinien in vitro durch Kombination einer p53-Defizienz und einer Überexpression von c-Myc und Akt. Diese Zelllinien wiesen viele Charakteristika von Tumorzellen auf, z.B. eine rasche Proliferation, Unabhängigkeit von externen Wachstumsfaktoren, hohe Mitoseraten, ungehemmter Zellzyklus, Verlust der Kontaktinhibition, Kernatypien bzw. maligner Phänotyp und Immortalisierung. In einem gewissen Prozentsatz maligner Glioblastome ist eine Inaktivierung beider Tumorsuppressoren (PTEN und p53) beschrieben. Dieses führt direkt zu einer Aktivierung von zellulärem c-Myc (116). Wenn davon ausgegangen werden darf, dass ein defektes PTEN zu einer Aktivierung von Akt führt, wiesen die in der vorliegenden Arbeit hergestellten Zelllinien, viele Gemeinsamkeiten der erwähnten Glioblastomzellen (p53-Defizienz, Aktivierung von AKT und c-Myc) auf. In beiden Fällen führte die Kombination genannter genetischer Defekte zu einer malignen Progression der Astrozyten.

### 4.3 Kann durch die Überexpression der Onkogene eine Entdifferenzierung der Astrozyten erreicht werden?

Diese Arbeit befasste sich mit dem Einfluss überexprimierter Onkogene auf die Differenzierung von Tp53-defizienten Astrozyten. In der Immunhistochemie wurde sich

besonders auf das Intermediärfilament GFAP konzentriert. Da es sich hierbei um einen Differenzierungsmarker für astrozytäre Zellen handelt, lag es nahe, diesen immunhistochemisch in verschiedenen Passagen der Astrozyten nachzuweisen. Des Weiteren wurde in vielen *in vitro*-Studien festgestellt, dass eine Abnahme der GFAP-Expression mit einer Dedifferenzierung und Transformation von Astrozyten vereinbar ist. Tumoraströzyten exprimieren deutlich weniger GFAP als Wildtyp- (normale) Astrozyten. Zudem nimmt die Expression des Intermediärfilaments mit zunehmender Malignität der Zellen ab (39).

Durch die Experimente der vorliegenden Arbeit sollte herausgefunden werden, ob die Überexpression der Onkogene Akt und c-Myc zu einer Entdifferenzierung bzw. Abnahme der GFAP-Expression führt. Besonders Akt-überexprimierende Astrozyten zeigten in den vorliegenden Studien eine rasche Abnahme der GFAP-Expression. Trotz astrozytären Phänotyps konnte das Intermediärfilament bereits früh (2. Passage) nur noch in geringem Maße nachgewiesen werden. Auch auf mRNA-Ebene (RPA) konnte GFAP bei p53<sup>AKT</sup>-Astrozyten nicht nachgewiesen werden. Bei c-Myc überexprimierenden Astrozyten konnte das Intermediärfilament hingegen in frühen Passagen immunhistochemisch und in 2 von 3 unabhängigen mRNA-Proben nachgewiesen werden. Bei Astrozyten, die sowohl Akt als auch c-Myc überexprimierten, konnten in frühen Passagen immunhistochemisch zwar noch einige für GFAP-positive Astrozyten nachgewiesen werden, auf mRNA-Ebene aber war das Intermediärfilament schon früh (2. Passage) nicht mehr nachweisbar. In der Literatur findet sich kein Hinweis auf eine direkte Beeinflussung der GFAP-Expression durch die Überexpression der Onkogene c-Myc und Akt. Für c-Myc jedoch wurde bereits beschrieben, dass eine Überexpression sowohl zu einer kompakteren Zellmorphologie als auch zu einem undifferenzierten Zellbild mit Verlust der GFAP-Expression führt (57). Beides konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. In der Literatur gibt es lediglich vereinzelte Hinweise auf den Einfluss von Akt-abhängigen Differenzierungsvorgängen bzw. den Einfluss auf den Phänotyp bei astrozytären Zellen. In anderen Zellsystemen kommt es jedoch durch die Inhibition des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs zu einer Ausdifferenzierung von pluripotenten zu differenzierten Zellen (87).

Man kann also postulieren, dass eine Überexpression von Akt durch intrazelluläre Entdifferenzierungsvorgänge zu einem frühen Verlust der GFAP-Expression führt. Der Verlust der Expression fand jedoch früher statt als bei c-Myc-überexprimierenden

Astrozyten. Da auch bei den  $p53^{MA}$  schon früh keine GFAP-Expression auf mRNA-Ebene nachweisbar war, spricht dies eher für einen direkten Einfluss der Akt-Überexpression auf die Expression des Intermediärfilaments. Ansonsten müsste postuliert werden, dass Akt effizientere Entdifferenzierungsprozesse steuert als c-Myc. Dieses würde allerdings Ergebnissen aus der aktuellen Literatur widersprechen.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass beide Onkogene zu einem Verlust der Expression des astrozytären Differenzierungsmarkers GFAP auf Protein- sowie auf mRNA-Ebene führten. Während c-Myc-überexprimierende Astrozyten einen sehr kleinen, kompakten Phänotyp entwickelten, wiesen die  $p53^{AKT}$ -Astrozyten auch in späteren Passagen eher einen großen, astrozytären Phänotyp auf.

Neben einer Entdifferenzierung hin zu einer undifferenzierten Zelle ist natürlich auch die Option zu diskutieren, dass die Überexpression der genannten Onkogene zu einer Umdifferenzierung der Zellen führt. Auch dieses konnte in den vorliegenden Untersuchungen durch Nachweis der Expression spezifischer Marker festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch, dass es weder bei verschiedenen Passagen von  $p53^{MYC}$ , noch bei  $p53^{AKT}$  oder  $p53^{MA}$  zu einer Expression von oligodendroglialen oder neuronalen Markern auf mRNA-Ebene kam (Kap. 3.9). Die Abnahme der GFAP-Expression erklärte sich also durch eine Ent- und nicht durch eine Umdifferenzierung der Astrozyten.

#### 4.4 Kann durch die Überexpression der Onkogene Akt und Myc die Expression von Stammzellmarkern hervorgerufen werden?

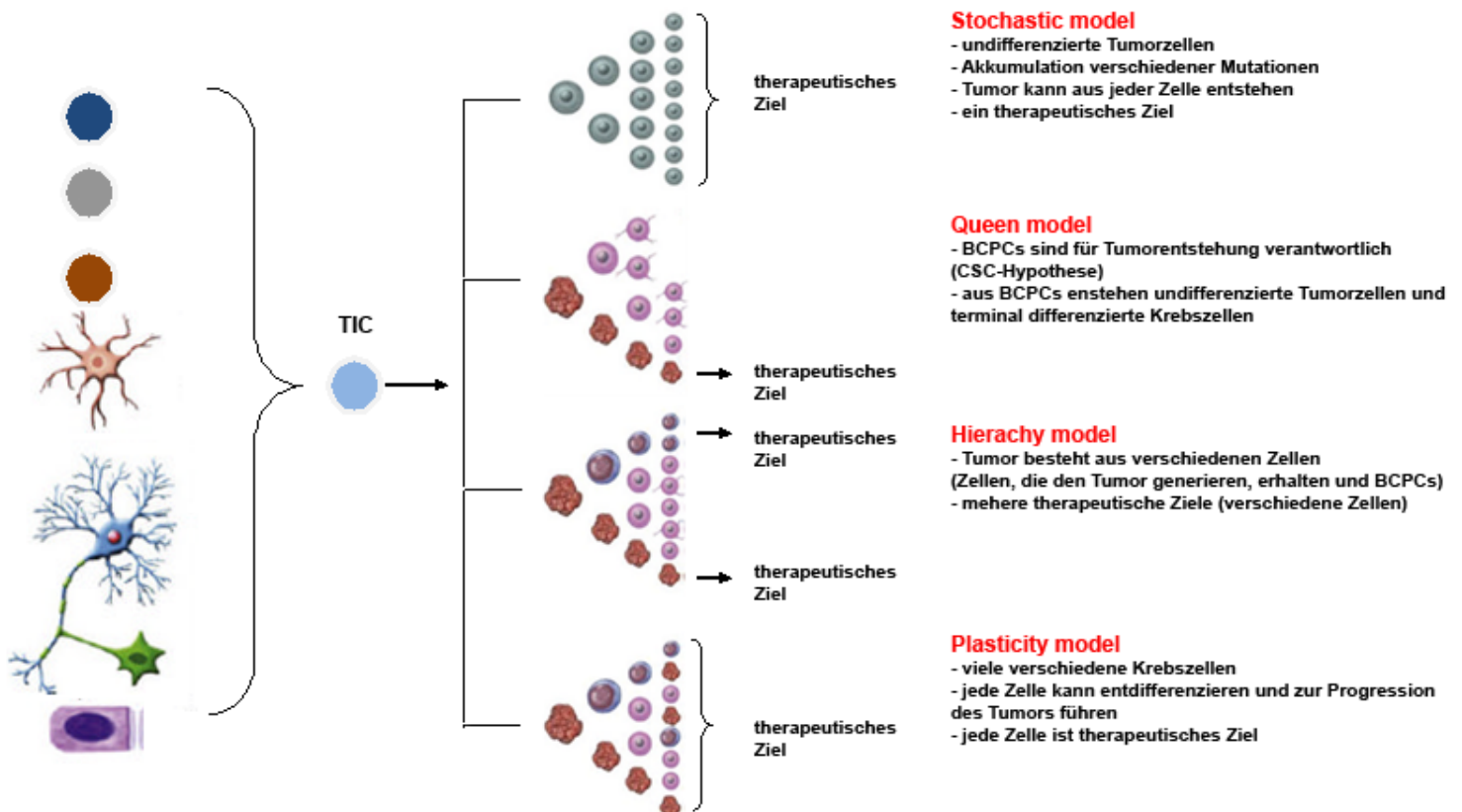
Das Glioblastoma multiforme ist ein sehr heterogener Tumor, der aus verschiedenen Zellpopulationen besteht, welche verschiedene genetische Aberrationen aufweisen. Gegenstand aktueller Forschung sind die sogenannten Krebsstammzellen (CSC; cancer stem cells) oder auch TIC (tumor initiating cells). Diese Zellen weisen Ähnlichkeiten mit normalen Stammzellen, wie Selbsterneuerung, Proliferation und Multipotenz auf (35). Aus ihnen können Astrozyten, Neurone sowie Oligodendrozyten generiert werden. Des Weiteren werden diese Zellen für die Radioresistenz von verschiedenen Tumoren verantwortlich gemacht. So steigt die Fraktion CD133- (Marker für neuronale und Hirntumorstammzellen) positiver Zellen im Glioblastom durch Radiotherapie deutlich an. Diese Zellen könnten somit den Ursprung einer Rezidivläsion darstellen (5). Durch



Transplantation CD133-positiver Stammzellen aus humanen Glioblastomen können in NOD/SCID-Mäusen Tumoren erzeugt werden (15). Neben CD133 wurden weitere Stammzellmarker durch die Isolierung von Tumorzellen aus Glioblastomen identifiziert. Nestin, ein Typ IV-Intermediärfilament kann in malignen Glioblastomen nachgewiesen werden. Die Expression von Nestin weist auf einen undifferenzierten Phänotyp der Tumorzellen hin (20). Ein weiterer Marker neuraler Stammzellen ist der Helix-loop-Helix Transkriptionsfaktor Olig2. Dieser wird auf oligodendrozytären Präkursoren während der Entwicklung zu Oligodendrozyten und auf verbleibenden Vorläuferzellen der SVZ (subventrikulären Zone) exprimiert. Überraschenderweise kann eine Expression von Olig2 jedoch in vielen diffusen Gliomen nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um Zellen, die GFAP-negativ, also nicht astrozytär differenziert sind (61). Somit konnte Olig2 auch in den Untersuchungen dieser Arbeit zur Identifizierung von neuralen Präkursoren in malignen Gliomen bzw. als Marker für eine mögliche Entdifferenzierung bei infizierten Astrozyten eingesetzt werden. Des Weiteren kann Musashi-1 nachgewiesen werden – ein Marker für ZNS-Progenitoren und neurale Stammzellen (46).

Während in frühen Passagen der infizierten Astrozyten der vorliegenden Arbeit nur die Expression von Nestin nachgewiesen werden konnte, kam es in späten Passagen auch zu einer Expression aller immunhistochemisch untersuchten Stammzellmarker. Auf das Muster und die Ausdehnung der Expression bei den verschiedenen Zelllinien wurde bereits in Kap. 3.10 eingegangen. Es ist wichtig zu betonen, dass die Zellen oft passagiert wurden, bevor eine Expression aller Stammzellmarker nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass es durch den Verlust des p53-Tumorsuppressors und der Überexpression der Onkogene Akt und c-Myc im Verlauf zu einer Expression neuraler Stammzellmarker kam. In verschiedenen Publikationen werden diese neuralen Stammzellen als mögliche Ursprungszellen primärer Hirntumoren propagiert. Es ist jedoch nicht geklärt, ob die sogenannten BCPC (brain cancer propagating cells) von transformierten neuralen Stammzellen (NSC), neuralen Progenitoren oder von maturen, spezialisierten Hirnzellen abstammen, die durch verschiedene Einflüsse entdifferenzieren und phänotypisch sowie funktional neuralen Stammzellen ähneln (35). Es bleibt zu erwähnen, dass es sich bei den infizierten Zellen

dieser Arbeit um differenzierte Astrozyten und nicht um subventrikuläre Präkusoren handelte, da diese in anfänglichen Passagen eine deutliche GFAP-Positivität aufwiesen. Bezüglich der Tumorzellentstehung aus TICs (tumor initiating cells) werden derzeit mehrere Theorien diskutiert, die in Abb. 4.1 dargestellt sind.



**Abb. 4.1. Derzeit diskutierte Theorien der Tumorentstehung aus TICs (35)**  
(tumor initiating cells)

Dass differenzierte Astrozyten in gliale Präkursoren konvertiert werden können, wurde bereits beschrieben (16). Anhand des Stammzellmarkers CD133 soll exemplarisch die Problematik der Bedeutung dieser neuen Marker beschrieben werden. Zunächst handelt es sich bei CD133 um einen Krebsstammzellmarker (CSC), der auch bei anderen Tumoren, wie Prostata-, Mamma- und Lungenkarzinomen (12) gefunden wird. Es handelt sich somit nicht um einen für primäre Hirntumoren spezifischen Marker. Nach Isolation CD133-negativer sowie -positiver Zellen aus humanen Tumoren haben beide Subpopulationen die Fähigkeit, Tumoren durch Implantation in das Hirn zu formieren

(111). Dies widerspricht früheren Annahmen bzw. Studien, in denen eine Proliferation *in vitro* und eine Tumorigenität *in vivo* nur bei CD133 positiven Zellen beobachtet werden konnte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Passagieren von CD133-negativen Zellen zu einer Expression von CD133, also zu einer Hochregulierung des Stammzellmarkers führen kann (108). Diese Ergebnisse weisen klar darauf hin, dass CD133 keine Voraussetzung für eine Tumorigenese zu sein scheint. Bei der Klassifikation bestimmter Zellen durch Stammzellmarker sollte es also nicht vorrangig um die Suche nach einer Ursprungszelle gehen, sondern vielmehr um die Identifikation bestimmter Subpopulationen in Glioblastomen, die für die Charakterisierung des Tumors wichtig sind bzw. wichtig sein könnten. So korreliert z.B. eine vermehrte CD133-Expression mit einer malignen Progression des Tumors bzw. einer schlechteren Prognose des Patienten (113). Die Stammzellforschung liefert womöglich wertvolle Informationen über zukünftige Therapieziele. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass es eine Vielzahl von möglichen, prognostisch wichtigen, Stammzellmarkern gibt und dass es sich bei primären Hirntumoren (besonders beim Glioblastoma multiforme) um eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren handelt. Es ist denkbar, dass jeder Tumor individuell ein anderes Spektrum von Stammzellmarkerexpression aufweist.

Auch die Frage der Ursprungszelle konnte durch die Entdeckung von Stammzellen nicht geklärt werden. Natürlich ist es vorstellbar, dass Glioblastome aus neuronalen Stammzellen entstehen. Andererseits kann es sich auch um differenzierte Zellen (z.B. mature Astrozyten) handeln, die durch Verlust von Tumorsuppressoren und die Überexpression von Onkogenen soweit entdifferenzieren, dass sie, wie diese Arbeit zeigen konnten, im Verlauf Stammzellmarker exprimieren. Für c-Myc in Kombination mit Oct3/4, Sox2, Klf4, konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass eine Überexpression zu einer Entdifferenzierung muriner Fibroblasten zu pluripotenten Stammzellen (iPS, induced pluripotent stem cells) führt (78). Die Expression verschiedener Stammzellmarker bei den infizierten Astrozyten dieser Arbeit, ist also am ehesten auf die Überexpression der Onkogene c-Myc und Akt und die Akkumulation von Sekundärmutationen im Verlauf der Passagen zurückzuführen.

Zusammenfassend konnten wir in den vorliegenden Untersuchungen die Option der Entdifferenzierung maturer Astrozyten durch Überexpression der Onkogene c-Myc und Akt zeigen. Wie bereits beschrieben, führte eine Überexpression von Akt allein zu einem sehr schnellen, die Überexpression von c-Myc zu einem etwas langsameren

Verlust der GFAP-Expression. Des Weiteren kam es womöglich zu einer Akkumulation verschiedener Sekundärmutationen, die wahrscheinlich die Expression von verschiedenen Stammzellmarkern im späten Verlauf der Passagen zur Folge hatte.

Die vorliegende Arbeit konnte weiter zeigen, dass die Expression von Stammzellmarkern nicht auf neurale Stammzellen beschränkt war. Dies klärt natürlich nicht die Frage der Ursprungszelle des Glioblastoms. Es muss vielmehr angenommen werden, dass die heterogene Gruppe der genetisch differnten Glioblastome verschiedener Subtypen bzw. Subpopulationen von Zellen entstammt (1). Es ist auch vorstellbar, dass das primäre Glioblastom aus neuronalen Stammzellen (6), das sekundäre jedoch aus entdifferenzierten matura Astrozyten entsteht. Diese theoretische Annahme findet in der Fachliteratur jedoch nur eine marginale Bestätigung, so dass der Ursprung des Glioblastoma multiforme ungewiss bleiben muss.

### 4.5 Handelt es sich bei den entstandenen Tumoren um eine Glioblastoma-ähnliche Läsion?

Wie in Kap. (3.11) ausführlich beschrieben, wurden die  $p53^{MA}$  stereotaktisch in das Hirn von Bl6- und Rag-2-knockout-Mäusen injiziert. Für diesen Versuch wurden verschiedene Passagen der  $p53^{MA}$  genutzt. Diese Zellen erschienen vielversprechend, da beide Onkogene überexprimiert wurden, sowie eine Immortalisierung und hohe Proliferationsrate nachgewiesen werden konnte. Die infizierten Astrozyten wurden, wie bereits beschrieben, stereotaktisch in das rechte Striatum injiziert. Das Striatum ist ein Teil der Basalganglien und gehört somit zum Großhirn. Dieser durch Koordinaten definierte Ort eignet sich zur Injektion einer größeren Menge von Zellen, da weder große Gefäße getroffen, noch ein Ventrikeleinbruch befürchtet werden muss. In einer ersten Operationsserie wurde das Experiment etabliert. Es gelang kein Nachweis eines Tumors, was jedoch auf die mangelnde Routine im Umgang mit den neuen Methoden zurückgeführt werden konnte. Es wurden 2 weitere Operationsserien durchgeführt in denen nach 21 Tagen Tumorformationen nachgewiesen werden konnten. Lassman et al. zeigten, dass durch Kombination aus einer Überexpression von Ras, c-Myc und Akt aus differenzierten Astrozyten in vivo Glioblastome entstehen können (57). Des Weiteren konnten sie nachweisen, dass c-Myc maßgeblich für die Entdifferenzierung der Astrozyten verantwortlich war. Wie auch in der vorliegenden Arbeit dargelegt,

beschrieben die Autoren die Transformation differenzierter Astrozyten (GFAP positiv) zu einem undifferenzierten Phänotyp mit Nestinexpression und nachweisbaren Charaktereigenschaften glialer Progenitoren.

An Stelle der Verwendung des Onkogens Ras, war die Grundlage dieser Arbeit jedoch der knockout des p53-Tumorsuppressors. Die Injektion der infizierten Astrozyten führte zu Tumoren verschiedener Größe, die vom Immunsystem des Tieres nicht erkannt oder attackiert wurden, welches durch eine Immunhistochemie für Mac-1, CD4 und CD8 bewiesen werden konnte. Hier zeigte sich nur eine geringgradige Infiltration von CD4-, CD8- und Mac-1-positiven Zellen, welches einen deutlichen Unterschied zu bereits etablierten Tumormodellen darstellt, in denen eine deutliche CD4/CD8-Infiltration beobachtet werden konnte (104). Die Größe bzw. die Malignität der entstandenen Tumoren hing ganz entscheidend von der Passage der injizierten p53<sup>MA</sup> ab. So konnte durch die Injektion einer 8. Passage im Gegensatz zu einer 3. Passage der p53<sup>MA</sup> größere Tumoren erzeugt werden. Bei einem dieser Tumoren konnte eine Infiltration in das umliegende Gewebe (Kalotte; siehe Kap. 3.11) nachgewiesen werden. Die höhere Malignität der infizierten Astrozyten einer höheren Passage ist wahrscheinlich auf eine Akkumulation bestimmter Sekundärmutationen im Verlauf der Passagen zurückzuführen. Leider konnte eine Infiltration von malignen Astrozyten in das Hirngewebe bei keinem Tumor nachgewiesen werden. Die Tumoren wuchsen verdrängend. Versuche, einzelne injizierte Zellen mit Hilfe eines Antikörpers gegen humanes c-Myc nachzuweisen, misslangen, da es zu einer unspezifischen Anfärbung von Neuronen des Maushirns kam und es somit nicht gelang, einzelne Zellen abzugrenzen. Auch in der HE-Färbung konnten keine suspekten, malignen Astrozyten in großer Entfernung von der Tumormasse nachgewiesen werden, welches gegen ein infiltratives Wachstum der injizierten p53<sup>MA</sup>-Astrozyten sprach.

Für die Etablierung eines geeigneten Glioblastoma multiforme-Modells gibt es, wie bereits in der Einleitung erwähnt, verschiedene Ansätze. Bis dato konnte allerdings kein Modell entwickelt werden, welches den diffus infiltrativen Charakter dieser Läsion reproduzieren ließ. Auch das in der aktuell vorliegenden Arbeit verwendete Modell konnte keinen Nachweis eines infiltrativen Wachstums erbringen. In der Literatur wird diskutiert, dass es sich bei der sichtbaren Tumormasse und den in das Hirngewebe infiltrierenden Zellen um zwei verschiedene Zellpopulationen handelt. Eine weitere Erklärung für das Misslingen einer Infiltration wäre das Fehlen einer bestimmten

Mutation bzw. Überexpression eines Gens, welches für den infiltrativen Charakter der Astrozyten dringend erforderlich ist. Dieses und die Suche der Ursprungszelle des Glioblastoms werden die Forschung in Zukunft beschäftigen müssen, um realistische Modelle zur Beschreibung und Erklärung dieser Läsion etablieren zu können.

#### 4.6 Aussichten

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass primäre Astrozyten durch den Verlust des Tumorsuppressors Tp53 und die Überexpression von c-Myc und Akt immortalisiert werden können. Es kam zu einer Expression von Stammzellmarkern im späten Verlauf der Passagen, was die Entdifferenzierung der Astrozyten zu einem eher undifferenzierten Phänotyp verdeutlichte. Durch den Knockout des p53 konnte bei diesem Modell ein anderer Ansatz verfolgt werden. Im Gegensatz zu vergleichbaren Modellen wurde eine Überexpression des Onkogens K-Ras in dieser Arbeit nicht benötigt. Durch einen p53 knockout und die Überexpression von c-Myc und Akt in den beschriebenen Astrozyten, gelang die Erzeugung von Tumoren, die jedoch ein verdrängendes und eben kein infiltratives Wachstum zeigten. Dieses Modell entspricht jedoch viel eher dem, was in humanen Glioblastomen beobachtet wird, da nicht K-Ras-, sondern p53-Mutationen in einem hohen Prozentsatz dieser Läsionen beobachtet werden kann (76). Es ist vorstellbar, dass weitere Mutationen bzw. die Überexpression weiterer Onkogene zu einem infiltrativen Wachstum führen können. Möglich wäre eine weitere Infektion der p53<sup>MA</sup>-Astrozyten mit bestimmten MMP (Matrix Metalloproteinasen). Besonders MMP 2 und 9 scheinen bei der Invasion des Glioblastoms in das Hirngewebe eine wichtige Rolle zu spielen (69). Natürlich kommt hierbei eine Reihe von verschiedenen Genen in Frage, welche für die Invasion und Infiltration des Glioblastoms verantwortlich sein könnten. Durch weitere virale Infektion der immortalisierten Zelllinie p53<sup>MA</sup> mit anderen, durch Plasmide vermittelte Onkogene, könnte die Invasivität der Astrozyten mit einem bestimmten Überexpressionsmuster in vitro und vivo untersucht werden. Dies eröffnet womöglich die Option, realistische, die Invasion imitierende Modelle für das Glioblastom zu entwickeln.

## **5. Summary**

The Glioblastoma multiforme is not only the most common but also the most aggressive brain tumor. The treatment of this disease involves chemotherapy, radiation, radiosurgery, corticosteroids, antiangiogenic therapy, and surgery. Nevertheless the patients' prognosis is very poor. Although there are some new therapeutic approaches median survival is only about 14 month.

Scientifically there are two different entities – the primary and secondary glioblastoma multiforme, which cannot be distinguished histologically. The tumor shows a rapid diffuse infiltrative growth, polymorphic nuclei, necrosis and angiogenesis. The primary glioblastoma develops de novo. Common mutations seen in primary glioblastomas are loss of heterozygosity of 10q, EGFR-amplification and deletion of p16INK4a. There is no evidence of a low-grade neoplasia in diagnostic imaging or histology. In contrast to that the secondary glioblastoma progresses from low-grade or anaplastic astrocytomas into a high-grade lesion. The mutation of the tumor suppressor p53 is often seen in those low-grade lesions.

As already mentioned the glioblastoma multiforme is a very aggressive type of cancer which affects middle-aged people. In order to understand the cancers origin, its metastasis, infiltration and migration good tumor models are needed. Furthermore understanding the tumor biology is also necessary to develop new therapeutic strategies. There have been various approaches in the past to develop a mouse model for the glioblastoma multiforme. Unfortunately they all were not able to show infiltrative growth in the brain, which is a strong characteristic of that lesion. Besides that there is a deep disagreement in the scientific community whether the glioblastoma multiforme originates from differentiated astrocytes or neural progenitors.

Holland EC et al. were able to create a promising glioblastoma model through gene transfer resulting in an overexpression of K-Ras and Akt in neural progenitors (41). Furthermore Lassman et al. published a similar tumor model with differentiated astrocytes that showed an undifferentiated phenotype through overexpression of c-Myc (57).



## *SUMMARY*

Following these tumor models this work wanted to create a glioblastoma model from differentiated astrocytes without the overexpression of K-Ras since the mutation of K-Ras is not a common mutation seen in glioblastoma multiforme.

P53 knockout astrocytes from newborn p53 knockout mice were cultured. The cultured astrocytes were infected with a supernatant from cultured Phoenix cells. After transfection with certain plasmids this cell line is capable of producing a retrovirus that is able to infect murine cells. As a result this work was able to create 3 different cell lines: Astrocytes that over expressed Akt, c-Myc or Akt and c-Myc. Through the overexpression of Akt cells were immortalized. In contrast to that c-Myc seemed to be responsible for a rapid growth and an undifferentiated phenotype of the cultures astrocytes. The cultures astrocytes were stained against Ki67, GFAP and against neural progenitor marker like Olig2, Nestin, Musashi-1, CD133 showing a loss of GFAP and a positive immunostaining for the progenitor marker in late cell passages. Using RNA Protection Assay this work was able to proof that our cultures astrocytes did not overexpress neuronal markers like for example neurofilament, synaptophysin or calbindin.

Furthermore stereotactic injection was used to place p53 knockout astrocytes that overexpressed Akt and c-Myc in the striatum of B16- and RAG2<sup>-/-</sup> mice. After 21 days animals were sacrificed, cryosections of the brains were made and the resulting tumor was stained with hematoxylin and eosin. To finish tumor sections were stained against CD4, CD8 and Mac-1 showing no infiltration of the immune system in the animals' brains.

## 6. Zusammenfassung

Bei dem Glioblastoma multiforme handelt es sich um den häufigsten primären Hirntumor. Es handelt sich um einen sehr malignen Tumor, der Menschen in mittlerem Alter betrifft und sich durch eine infauste Prognose auszeichnet. Trotz einer Kombination aus Operation, Radiatio und verschiedenen Ansätzen der Chemotherapie, versterben die meisten Patienten bereits im ersten Jahr nach Diagnosestellung.

Es wird zwischen primären und sekundären Glioblastomen unterschieden. Das primäre Glioblastom entwickelt sich völlig neu (*de novo*). Es gibt weder radiologische, noch histologische Hinweise auf einen vorausgegangenen weniger malignen Tumor. Häufige Mutationen sind EGFR-Amplifikation, Deletion des p16INK4a und LOH (loss of heterozygosity) von 10q. Im Gegensatz dazu, entwickelt sich das sekundäre Glioblastom durch Progression eines niedriggradigen oder anaplastischen Astrozytoms. Bereits in den niedrigmalignen Vorläuferläsionen kommt es häufig zu einem Verlust des Tumorsuppressors p53. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 45 Jahren. Das Glioblastom ist bevorzugt in den Großhirnhemisphären, insbesondere frontotemporal, lokalisiert. Makroskopisch zeichnen sich diese Tumoren durch eine bunte Schnittfläche aus. Charakteristisch sind gelbliche Nekrosen, Blutungen, grau-weiß aussehendes Tumorgewebe und diffuses infiltrierendes Wachstum. Rein histologisch können beide Tumorentitäten nicht voneinander unterschieden werden.

Um den Ursprung des Tumors und dessen Tumorbiologie sowie Infiltration und Migration besser verstehen zu können und um neue therapeutische Strategien zu entwickeln, werden gute Mausmodelle benötigt. In der Vergangenheit gab es einige gute Ansätze zur Entwicklung eines solchen Modells. Leider gelang es keinem Modell das infiltrative Wachstum im Gehirn nachzuempfinden, welches für die Läsion so charakteristisch ist. Desweiteren gibt es Unstimmigkeiten in der wissenschaftlichen Gemeinschaft bezüglich der Ursprungszellen des Glioblastoms. Es konnte bisher nicht herausgefunden werden, ob es sich bei diesen Zellen um differenzierte Astrozyten oder aber neurale Progenitoren handelt.

Holland et al. entwickelten ein vielversprechendes Glioblastom-Modell durch Gentransfer und eine daraus resultierende Überexpression von K-Ras und Akt in neuronalen Progenitoren (41). Des Weiteren publizierten Lassman et al. ein Modell mit differenzierten Astrozyten, die durch eine Überexpression von c-Myc einen undifferenzierten Phänotyp zeigten (57).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Glioblastom-Modells mit differenzierten Astrozyten jedoch ohne eine Überexpression von K-Ras, da dieses eine für das Glioblastoma multiforme eher untypische Mutation darstellt.

Diese Arbeit konzentrierte sich somit auf die Verwendung von p53-knockout Astrozyten. Diese wurden aus neugeborenen p53-knockout Mäusen gewonnen und kultiviert. Die kultivierten Astrozyten wurden mit einem Überstand von kultivierten und vorher transfizierten Phoenix-Zellen infiziert. Bei den Phoenix-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die nach einer Transfektion mit bestimmten Plasmiden fähig ist, einen Retrovirus zu produzieren, der wiederum für die Infektion anderer muriner Zellen zur Verfügung steht. Somit konnten in dieser Arbeit 3 verschiedene Zelllinien generiert werden: p53-knockout Astrozyten, die Akt, Myc oder Akt und Myc überexprimierten. Durch die Überexpression von Akt konnten die Zellen immortalisiert werden. Myc-überexprimierende Astrozyten zeigten ein rapides Zellwachstum und einen undifferenzierten Phänotyp. Verschiedene Passagen der Kulturen wurden immunhistochemisch gegen Ki67, GFAP und neurale Marker für Progenitoren wie Olig2, Nestin, Musashi-1 und CD133 gefärbt. Es kam zu einem Verlust des GFAP und einer positiven Immunhistochemie für die neuronalen Marker der Progenitoren in späten Passagen. Mit Hilfe eines RNA Protection Assay (RPA) konnte auf RNA-Ebene bewiesen werden, dass es sich bei den Kulturen um reine Astrozytenkulturen handelt, die auch im Verlauf späterer Passagen keine neuronalen Marker, wie Synaptophysin, Calbindin oder Neurofilament exprimierten. Im Verlauf der Arbeit injizierten wir stereotaktisch Myc und Akt überexprimierende p53 knockout-Astrozyten (p53<sup>MA</sup>) in das rechte Striatum von B16- und RAG2<sup>-/-</sup> Mäusen. Nach 21 Tagen wurden die Hirne der Tiere entnommen und Kryostatschnitte angefertigt. Durch eine HE-Färbung konnte das Tumorstadium nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Schnitte immunhistochemisch gegen CD4, CD8 und Mac-1 gefärbt. Es konnte keine Infiltration von Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon CH, Jackson EL, Li Y, Burns DK, Alvarez-Buylla A, Parada LF.** 2009. Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell*. **15**(1):45-56.
2. **Almendral JM, Sommer D, Macdonald-Bravo H, Burckhardt J, Perera J, Bravo R.** 1998. Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol*. **8**(5):2140-8.
3. **Amati B, Alevizopoulos K, Vlach J.** 1998. Myc and the cell cycle. *Front Biosci*. **3**:d250-68.
4. **Attardi LD, Jacks T.** 1999. The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. *Cell Mol Life Sci*. **55**(1):48-63.
5. **Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN.** 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**(7120):756-60.
6. **Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP.** 2007. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*. **67**(9):4010-5.
7. **Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H.** 1997. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol*. **94**(4):303-9.
8. **Bögler O, Nagane M, Gillis J, Huang HJ, Cavenee WK.** 1999. Malignant transformation of p53-deficient astrocytes is modulated by environmental cues in vitro. *Cell Growth Differ*. **10**(2):73-86.
9. **Bramanti V, Tomassoni D, Avitabile M, Amenta F, Avola R.** 2010. Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Front Biosci (Schol Ed)*. **2**:558-70.
10. **Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC.** 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. **282**(5392):1318-21.

11. **CBTRUS. Statistical Report.** 2002-2006; 2009'. Primary Brain Tumors in the United States. Central Brain Tumor Registry of the United States.
12. **Cheng JX, Liu BL, Zhang X.** 2009. How powerful is CD133 as a cancer stem cell marker in brain tumors? *Cancer Treat Rev.* **35**(5):403-8
13. **Chung R, Whaley J, Kley N, Anderson K, Louis D, Menon A, Hettlich C, Freiman R, Hedley-Whyte ET, Martuza R.** 1991. TP53 gene mutations and 17p deletions in human astrocytomas. *Genes Chromosomes Cancer.* **3**(5):323-31.
14. **Claassen GF, Hann SR.** 2000. A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(17):9498-503.
15. **Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM.** 2006. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* **66**(19):9339-44.
16. **Dai C, Celestino JC, Okada Y, Louis DN, Fuller GN, Holland EC.** 2001. PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. *Genes Dev.* **15**(15):1913-25.
17. **Dai C, Holland EC.** 2001. Glioma models. *Biochim Biophys Acta.* **1551**(1):M19-27.
18. **Daumas-Duport C.** 1992. Histological grading of gliomas. *Curr Opin Neurol. Neurosurg.* **5**(6):924-31.
19. **deCarvalho AC, Nelson K, Lemke N, Lehman NL, Arbab AS, Kalkanis S, Mikkelsen T.** 2009. Gliosarcoma Stem Cells Undergo Glial and Mesenchymal Differentiation In Vivo. *Stem Cells.* **28**(2):181-90.
20. **Dell'Albani P.** 2008. Stem cell markers in gliomas. Stem cell markers in gliomas. *Neurochem Res.* **33**(12):2407-15.
21. **Downward J.** 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol.* **10**(2):262-7.

22. **Eilers M.** 1999. Control of cell proliferation by Myc family genes. *Mol Cells.* **9**(1):1-6.
23. **el-Deiry WS.** 1998. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol.* **8**(5):345-57.
24. **Engelhard HH 3rd, Butler AB 4th, Bauer KD.** 1989. Quantification of the c-myc oncoprotein in human glioblastoma cells and tumor tissue. *J Neurosurg.* **71**(2):224-32.
25. **Eoli M, Menghi F, Bruzzone MG, De Simone T, Valletta L, Pollo B, Bissola L, Silvani A, Bianchessi D, D'Incerti L, Filippini G, Broggi G, Boiardi A, Finocchiaro G.** 2007. Methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and loss of heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival. *Clin Cancer Res.* **13**(9):2606-13.
26. **Fisher GH, Orsulic S, Holland E, Hively WP, Li Y, Lewis BC, Williams BO, Varmus HE.** 1999. Development of a flexible and specific gene delivery system for production of murine tumor models. *Oncogene.* **18**(38):5253-60.
27. **Flores DG, Ledur PF, Abujamra AL, Brunetto AL, Schwartzmann G, Lenz G, Roesler R.** 2009. Cancer stem cells and the biology of brain tumors. *Curr Stem Cell Res Ther.* **4**(4):306-13.
28. **Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC.** 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell.* **88**(4):435-7.
29. **Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H.** 2000. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest.* **80**(1):65-72.
30. **Fults D, Brockmeyer D, Tullous MW, Pedone CA, Cawthon RM.** 1992. p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. *Cancer Res.* **52**(3):674-9.
31. **Gao X, Kemper A, Popko B.** 1999. Advanced transgenic and gene-targeting approaches. *Neurochem Res.* **24**(9):1181-8.

32. **Gil-Benso R, Lopez-Gines C, Benito R, López-Guerrero JA, Callaghan RC, Pellín A, Roldán P, Cerdá-Nicolas M.** 2007. Concurrent EGFR amplification and TP-53 mutation in glioblastomas. *Clin Neuropathol.* **26**(5):224-31.
33. **Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Arjona D, Lomas J, Alonso ME, De Campos JM, Vaquero J, Isla A, Gutierrez M, Rey JA.** 2003. Promoter hypermethylation of multiple genes in astrocytic gliomas. *Int J Oncol.* **22**(3):601-8.
34. **Gresner SM, Rieske P, Wozniak K, Piaskowski S, Jaskolski DJ, Skowronski W, Sikorska B, Papierz W, Liberski PP.** 2007. Gliomas: association of histology and molecular genetic analysis of chromosomes 1p, 10q, and 19q. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* **67**(2):103-12.
35. **Hadjipanayis CG, Van Meir EG.** 2009. Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med.* **15**(11): 519–530.
36. **Hadjipanayis CG, Van Meir EG.** 2009. Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy. *J Mol Med.* **87**(4):363-74.
37. **Hartwell L.** 1992. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell.* **71**(4):543-6.
38. **Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI.** 2003. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**(25):15178-83.
39. **Hlobilkova A, Ehrmann J, Sedlakova E, Krejci V, Knizetova P, Fiuraskova M, Kala M, Kalita O, Kolar Z.** 2007. Could changes in the regulation of the PI3K/PKB/Akt signaling pathway and cell cycle be involved in astrocytic tumor pathogenesis and progression? *Neoplasma.* **54**(4):334-41.
40. **Hoffman B, Liebermann DA.** 2008. Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene.* **27**(50):6462-72.
41. **Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN.** 2000. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet.* **25**(1):55-7.
42. **Holland EC, Varmus HE.** 1998. Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(3):1218-23.

43. **Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H.** 2000. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res.* **60**(24):6868-74.
44. **Hui AB, Lo KW, Yin XL, Poon WS.** 2001. Detection of multiple gene amplifications in glioblastoma multiforme using array-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest.* **81**(5):717-23.
45. **Ishikawa T, Zhang SS, Qin X, Takahashi Y, Oda H, Nakatsuru Y, Ide F.** 2004. DNA repair and cancer: lessons from mutant mouse models. *Cancer Sci.* **95**(2):112-7.
46. **Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, Suzuki A, Nakamura Y, Sawamoto K, Ogawa Y, Toyama Y, Miyata T, Okano H.** 2000. Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci.* **22**(1-2):139-53.
47. **Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD, Yan H, Adamson C.** 2009. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol.* **3**:39-52.
48. **Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N.** 1999. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol.* **19**(8):5800-10.
49. **Khachigian LM, Field SL, Crouch R, Chesterman CN.** 1995. Platelet-derived growth factor A-chain synthetic peptide inhibits human glioma xenograft proliferation in nude mice. *Anticancer Res.* **15**(2):337-41.
50. **Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H.** 2007. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* **113**(3):295-302.
51. **Kleihues P, Ohgaki H.** 1999. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol.* **1**(1):44-51.
52. **Knobbe CB, Merlo A, Reifenberger G.** 2002. Pten signaling in gliomas. *Neuro Oncol.* **4**(3):196-211.



53. **Kondo S, Kondo Y, Li G, Silverman RH, Cowell JK.** 1998. Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2-5A antisense directed against telomerase RNA. *Oncogene*. **16**(25):3323-30.
54. **Koskinen PJ, Alitalo K.** 1993. Role of myc amplification and overexpression in cell growth, differentiation and death. *Semin Cancer Biol*. **4**(1):3-12.
55. **Koul D.** 2008. PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther*. **7**(9):1321-5.
56. **Lam PY, Di Tomaso E, Ng HK, Pang JC, Roussel MF, Hjelm NM.** 2000. Expression of p19INK4d, CDK4, CDK6 in glioblastoma multiforme. *Br J Neurosurg*. **14**(1):28-32.
57. **Lassman AB, Dai C, Fuller GN, Vickers AJ, Holland EC.** 2004. Overexpression of c-MYC promotes an undifferentiated phenotype in cultured astrocytes and allows elevated Ras and Akt signaling to induce gliomas from GFAP-expressing cells in mice. *Neuron Glia Biol*. **1**(2):157–163.
58. **Layfield LJ, Willmore C, Tripp S, Jones C, Jensen RL.** 2006. Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme: prognostic significance and relationship to other prognostic factors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. **14**(1):91-6.
59. **Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM.** 2002. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med*. **8**(10):1153-60.
60. **Ligon KL, Alberta JA, Kho AT, Weiss J, Kwaan MR, Nutt CL, Louis DN, Stiles CD, Rowitch DH.** 2004. The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. **63**(5):499-509.
61. **Ligon KL, Fancy SP, Franklin RJ, Rowitch DH.** 2006. Olig gene function in CNS development and disease. *Glia*. **54**(1):1-10.
62. **Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P.** 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. **114**(2):97-109.

63. **Lutz W, Leon J, Eilers M.** 2002. Contributions of Myc to tumorigenesis *Biochim Biophys Acta.* **1602**(1):61-71.
64. **Martelli AM, Faenza I, Billi AM, Manzoli L, Evangelisti C, Falà F, Cocco L.** 2006. Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis? *Cell Signal.* **18**(8):1101-7.
65. **Meek DW.** 2009. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer.* **9**(10):714-23.
66. **Meichle A, Philipp A, Eilers M.** 1992. The functions of Myc proteins *Biochim Biophys Acta.* **1114**(2-3):129-46.
67. **Moll UM, Schramm LM.** 1998. P53-an acrobat in tumorigenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* **9**(1):23-37.
68. **Murphy DJ, Junttila MR, Pouyet L, Karnezis A, Shchors K, Bui DA, Brown-Swigart L, Johnson L, Evan GI.** 2008. Distinct thresholds govern Myc's biological output *in vivo*. *Cancer Cell.* **14**(6):447-457.
69. **Nakada M, Okada Y, Yamashita J.** 2003. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Front Biosci.* **8**:e261-9.
70. **Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H.** 2000. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas *J Neuropathol Exp Neurol.* **59**(6):539-43.
71. **Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H.** 2001. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest.* **81**(1):77-82.
72. **Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Kishi M, Nakase H, Sakaki T, Konishi N.** 2005. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest.* **85**(2):165-75.
73. **Nozaki M, Tada M, Kobayashi H, Zhang CL, Sawamura Y, Abe H, Ishii N, Van Meir EG.** 1999. Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. *Neuro Oncol.* **1**(2):124-37.
74. **Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P.** 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* **64**(19):6892-9.

75. **Ohgaki H, Kleihues P.** 2005. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* **109**(1):93-108.
76. **Ohgaki H, Kleihues P.** 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* **170**(5):1445-53.
77. **Ohgaki H, Kleihues P.** 2009. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* **100**(12):2235-41.
78. **Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S.** 2007 .Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* **448**(7151):313-7.
79. **Orian JM, Vasilopoulos K, Yoshida S, Kaye AH, Chow CW, Gonzales MF.** 1992. Overexpression of multiple oncogenes related to histological grade of astrocytic glioma. *Br J Cancer.* **66**(1):106-12.
80. **Osaki M, Oshimura M, Ito H.** 2004 .PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* **9**(6):667-76.
81. **Park DM, Rich JN.** 2009. Biology of glioma cancer stem cells. *Mol Cells.* **28**(1):7-12.
82. **Pérez Castillo A, Aguilar-Morante D, Morales-García JA, Dorado J.** 2008. Cancer stem cells and brain tumors. *Clin Transl Oncol.* **10**(5):262-7.
83. **Piccirillo SG, Binda E, Fiocco R, Vescovi AL, Shah K.** 2009. Brain cancer stem cells. *J Mol Med.* **87**(11):1087-95.
84. **Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA.** 1998. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell.* **92**(6):713-23.
85. **Prasad G, Wang H, Agrawal S, Zhang R.** 2002. Antisense anti-MDM2 oligonucleotides as a novel approach to the treatment of glioblastoma multiforme. *Anticancer Res.* **22**(1A):107-16.

86. **Pusapati RV, Rounbehler RJ, Hong S, Powers JT, Yan M, Kiguchi K, McArthur MJ, Wong PK, Johnson DG.** 2006. ATM promotes apoptosis and suppresses tumorigenesis in response to Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(5):1446-51
87. **Que J, Lian Q, El Oakley RM, Lim B, Lim SK.** 2007. PI3 K/Akt/mTOR-mediated translational control regulates proliferation and differentiation of lineage-restricted RoSH stem cell lines. *J Mol Signal.* **2**:9.
88. **Reifenberger G, Collins VP.** 2004. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med.* **82**(10):656-70.
89. **Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP.** 1993. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res.* **53**(12):2736-9.
90. **Riemenschneider MJ, Reifenberger G.** 2009. Molecular Neuropathology of Gliomas. *Int J Mol Sci.* **10**(1):184-212.
91. **Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A.** 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **29**(5):402-12.
92. **Ruano Y, Mollejo M, Camacho FI, Rodríguez de Lope A, Fiaño C, Ribalta T, Martínez P, Hernández-Moneo JL, Meléndez B.** 2008. Identification of survival-related genes of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma multiforme. *Cancer.* **112**(7):1575-84.
93. **Santoni-Rugiu E, Falck J, Mailand N, Bartek J, Lukas J.** 2000. Involvement of Myc activity in a G(1)/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway. *Mol Cell Biol.* **20**(10):3497-509.
94. **Schmidt EV.** 1999. The role of c-myc in cellular growth control *Oncogene.* **18**(19):2988-96.
95. **Sergent-Tanguy S, Michel DC, Neveu I, Naveilhan P.** 2006. Long-lasting coexpression of nestin and glial fibrillary acidic protein in primary cultures of astroglial cells with a major participation of nestin(+)/GFAP(-) cells in cell proliferation. *J Neurosci Res.* **83**(8):1515-24.

96. **Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL.** 2002. PKB/Akt mediates cell cycle progression by phosphorylation of p27kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med.* **8**(10):1145-52
97. **Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB.** 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* **63**(18):5821-8.
98. **Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G.** 1998. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* **17**(17):5001-14.
99. **Suzuki T, Maruno M, Wada K, Kagawa N, Fujimoto Y, Hashimoto N, Izumoto S, Yoshimine T.** 2004. Genetic analysis of human glioblastomas using a genomic microarray system. *Brain Tumor Pathol.* **21**(1):27-34.
100. **Tamura M, Gu J, Danen EH, Takino T, Miyamoto S, Yamada KM.** 1999. PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem.* **274**(29):20693-703.
101. **Toth J, Egervari K, Klekner A, Bognar L, Szanto J, Nemes Z, Szollosi Z.** 2009. Analysis of EGFR gene amplification, protein over-expression and tyrosine kinase domain mutation in recurrent glioblastoma. *Pathol Oncol Res.* **15**(2):225-9.
102. **Varley JM, Evans DG, Birch JM.** 1997. Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *Br J Cancer.* **76**(1):1-14.
103. **Vazquez F, Sellers WR.** 2000. The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Biochim Biophys Acta.* **1470**(1):M21-35.
104. **Vetter M, Hofer MJ, Roth E, Pircher HP, Pagenstecher A.** 2009. Intracerebral interleukin 12 induces glioma rejection in the brain predominantly by CD8+ T cells and independently of interferon-gamma. *J Neuropathol Exp Neurol.* **68**(5):525-34.
105. **Vita M, Henriksson M.** 2006. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol.* **16**(4):318-30.

106. **Vousden KH, Lane DP.** 2007. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**(4):275-83.
107. **Vousden KH, Lu X.** 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer.* **2**(8):594-604.
108. **Wang J, Sakariassen PØ, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Bøe SO, Svendsen A, Prestegarden L, Røsland G, Thorsen F, Stuhr L, Molven A, Bjerkvig R, Enger PØ.** 2008. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer.* **122**(4):761-8.
109. **Warner BJ, Blain SW, Seoane J, Massagué J.** 1999. Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway. *Mol Cell Biol.* **19**(9):5913-22.
110. **Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Komine C, Yokoyama T.** 2003. Deregulation of the TP53/p14ARF tumor suppressor pathway in low-grade diffuse astrocytomas and its influence on clinical course. *Clin Cancer Res.* **9**(13):4884-90.
111. **Wu Y, Wu PY.** 2009. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev.* **18**(8):1127-34.
112. **Yahanda AM, Bruner JM, Donehower LA, Morrison RS.** 1995. Astrocytes derived from p53-deficient mice provide a multistep in vitro model for development of malignant gliomas. *Mol Cell Biol.* **15**(8):4249-59.
113. **Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, Lichter P, Unterberg A, Radlwimmer B, Herold-Mende CC.** 2008. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res.* **14**(1):123-9.
114. **Zhang L, Lee KC, Bhojani MS, Khan AP, Shilman A, Holland EC, Ross BD, Rehemtulla A.** 2007. Molecular imaging of Akt kinase activity. *Nat Med.* **13**(9):1114-9.
115. **Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen AJ, Perry SR, Tonon G, Chu GC, Ding Z, Stommel JM, Dunn KL, Wiedemeyer R, You MJ, Brennan C, Wang YA, Ligon KL, Wong WH, Chin L, DePinho RA.** 2008. p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature.* **455**(7216):1129-33.

116. **Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen AJ, Perry SR, Tonon G, Chu GC, Ding Z, Stommel JM, Dunn KL, Wiedemeyer R, You MJ, Brennan C, Wang YA, Ligon KL, Wong WH, Chin L, dePinho RA.** 2008. Pten and p53 converge on c-Myc to control differentiation, self-renewal, and transformation of normal and neoplastic stem cells in glioblastoma. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **73**:427-37.
117. **Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC.** 2001. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol.* **3**(11):973-82.

*Internetquellen*

118. **[http://de.wikibooks.org/wiki/Pathologie:\\_Tumoren\\_des\\_Nervensystems](http://de.wikibooks.org/wiki/Pathologie:_Tumoren_des_Nervensystems)**  
(September 2010)

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
ALV	Aviäre Leukosevirus
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATM	ataxia telangiectasia mutated
Bl6	Black 6
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin-dependent Kinases
cDNA	copy-Desoxyribonucleic Acid
CH <sub>3</sub> COOH	Essigsäure
CPM	Counts Per Minute
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DPM	Decays Per Minute
DTT	Dithiotreitol
ECO	Ecotropic



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
et al.	et alii / aliae
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
F (1/2)	Filial-(Generation)
FACS	fluorescence activated cell sorting
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s <sup>2</sup> )
FBS	Fetal bovine serum
G (1/2)	gap
Gadd45	Growth Arrest and DNA Damage
GAP43	Growth Associated Protein 43
GAR	goat anti rabbit
GBM	Glioblastom
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green fluorescent protein
GSCs	Glioblastoma stem cells
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HCl	Salzsäure
Ig	Immunglobulin
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
KO	Knockout
KON	Kontrolle
K-Ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

l	Liter
LB	Luria Broth
LOH	Loss of heterozygosity
M	Molar
M-(Phase)	Mitose
m	Milli
MA	Myc/Akt
MAP	Mitogen-activated protein
μ	Mikro
MDM	Murine Double Minute
mg	Milligram
MBP	Myelin-basisches Protein
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGMT	O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase
min	Minuten
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMLV	Mouse Moloney murine leukemia virus
mRNA	messenger-RNA
MSCV	Murine Stem Cell Virus
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
Myc	myelocytomatosis viral oncogene
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaJO <sub>3</sub>	Natriumiodat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF68	Neurofilament 68
NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetat
nm	Nanometer
NTP	Nukleosid-Triphosphat
OD	Optische Dichte
P-32	Phosphor-32
pH	pondus Hydrogenii

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PIK3	Phosphatidylinositol-3-kinase
RAG-2	Recombination activating gene 2
RB1	Retinoblastom-Gen 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PLP	Proteolipidprotein
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
PK	Proteinase K
PKB	Proteinkinase B
PL-32	ribosomales Protein L-32
PLP	Proteolipid-Protein
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RPA	RNase Protection Assay
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S	synthesis
SB	Sodiumborat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
siRNA	small interfering Ribonucleic Acid
s.o.	siehe oben
SPF	spezifiziert Pathogen-freie
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA

## *ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS*

TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase
tRNA	transfer-RNA
Trp53	Transformation related protein 53
U	Units
u.a.	unter anderem
UTP	Uridine-5'-triphosphate
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
W	Watt
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Verteilung histologischer Subtypen primärer ZNS-Gliome (11).	1
Abb. 1.2. Zellreiche, undifferenzierte Tumoren (Glioblastoma multiforme)	3
Abb. 1.3. Glioblastoma multiforme (Histologische Präparate)	3
Abb. 1.4. Schematische Darstellung der genetischen Veränderungen bei der Entstehung des primären und sekundären Glioblastoms.	4
Abb. 1.5. Aktivierung von p53 via p14(19) <sup>ARF</sup>	6
Abb. 1.6. Zielgene von aktiviertem p53	7
Abb. 1.7. Wichtige Zielgene von aktiviertem Akt (PKB).	8
Abb. 2.1. Schematische Darstellung eines Objektträgers	28
Abb. 3.2. Ko-Transfektion der Phoenix-Zellen.	49
Abb. 3.3. Ko-Infektion der Tp53 knockout-Astrozyten.	50
Abb. 3.4. Ko-infizierte Tp53 knockout- Astrozyten.	50
Abb. 3.6. GFAP-Expression von p53 <sup>KON</sup> - und Bl6 Wildtyp-Astrozyten.	55
Abb. 3.7. GFAP-Expression infizierter Astrozytenkulturen und p53 <sup>KON</sup> -Kulturen verschiedener Passagen.	58
Abb. 3.8. Ki67-Expression von Bl6-Wildtypastrozyten (1. Passage).	60
Abb. 3.9. Ki67-Expression infizierter Astrozytenkulturen und p53 <sup>KON</sup> -Kulturen verschiedener Passagen.	63
Abb. 3.10. Errechnete Anzahl der Kulturplatten.	66
Abb. 3.11. Anzahl der Astrozyten pro Kulturplatte.	67
Abb. 3.12. Genexpression verschiedener Astrozytenkulturen.	70
Abb. 3.13. Genexpression verschiedener Astrozytenkulturen der 12. Passage.	70
Abb. 3.14. Quantitative Analyse der autoradiographischen Banden von humanem c-Myc aus Abb. 3.12 und 3.13.	72

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.3.15. Quantitative Analyse der autoradiographischen Banden von GFAP aus Abb. 3.12. und 3.13. _____	72
Abb. 3.16. Expression von neuronalen (Stammzell-)markern. _____	75
Abb. 3.17 A. HE-Färbung eines Tumors. _____	77
Abb.3.17 B. Infiltration der Kalotte. _____	77
Abb. 3.18. HE-Färbung verschiedener Tumoren (Pfeile). _____	78
Abb. 4.1. Derzeit diskutierte Theorien der Tumorentstehung aus TICs _____	91

## 10. Danksagung

„Man muss noch Chaos in sich haben, um einen tanzenden Stern gebären zu können.“

Friedrich Nietzsche (Werk: Also sprach Zarathustra)

Ich habe bei all der Freude, diese Arbeit vollendet zu haben, nicht aus den Augen verloren, dass mich auf diesem Weg viele Menschen begleitet und unterstützt haben. Daher möchte ich diese Gelegenheit nutzen, um mich zu bedanken.

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Professor Dr. A. Pagenstecher, der mich mit einem so spannenden und interessanten Thema betraute und mir mit seinem Fachwissen zur Seite stand. Zuletzt auch durch private Gespräche wurden Sie, Herr Prof. Pagenstecher, zu einem wertvollen Wegbegleiter.

Ich danke Ginette Bortolussi, meinen Kollegen und allen Mitarbeitern der Abteilung, die mein Forschungsprojekt durch ihre Ideen und Kritik bereicherten und mir stets hilfreich zur Seite standen. Besonders danke ich auch Alessandra Avezzù (Arbeitsgruppe M. Eilers), die mir den Umgang mit den Phoenix-Zellen im IMT näher brachte.

Ich danke Steffen Lerche, der mein Durchhaltevermögen und meinen Ehrgeiz schulte und mir schon früh beibrachte, dass nur in einem gesunden Körper auch ein gesunder Geist wohnt.

Ich danke meinen Freunden, die mir stets Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit bestärkt und unterstützt haben. Ich danke besonders dir, Tanja, für die sportliche Wegbegleitung.

Und nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die die emotionalen und finanziellen Grundsteine für meinen Weg gelegt haben. Ich weiß, dass ich mich immer auf euch verlassen kann – ihr seid ein Geschenk des Himmels.

## **11. Verzeichnis akademischer Lehrer**

### **Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren**

Aigner, Aumuller, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bien, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Dodel, Donner-Banzhoff, Dukatz, Eilers, Ellenrieder, Fendrich, Feuser, Geks, Gress, Gudermann, Hasilik, Heinis, Hertl, Höffken, Hoffmann, Hofmann, Holland, Kann, Kill, Klose, Koolman, Kuhn, Langer, Lill, Lohoff, Maisch, Mann, Meier, Mennel, Michl, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Nimsky, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Plant, Printz, Rausch, Renz, Richter, Roeper, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schneider, Schofer, Schu, Seitz, Sesterhenn, Seyberth, Skwara, Steinfeld, Steiniger, Sure, Tackenberg, Teymoortash, Vogelmaier, Vogt, Wagner, Waldegger, Walters, Weihe, Werner, Westermann, Wulf, Wündisch, Zettl.

### **Meine akademischen Lehrer in Basel waren die Damen und Herren**

Bruder, Bubendorf, Dirnhofer, Frank, Hopfer, Jundt, Lugli, Meyer, Obermann, Terracciano, Tornillo, Tzankov.