

Aus dem Institut für Pathologie, Abteilung Neuropathologie
Direktor: Prof. Dr. med. Axel Pagenstecher

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

Entwicklung eines Astrozytom-Modells aus primären Astrozyten der Maus mit regulierbarer Proliferation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Katharina Nabila Pascale Krüger

aus Tübingen

Marburg an der Lahn, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: **25.11.2020**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan i.V. der Prodekan: Herr Prof. Dr. R. Müller

Referent: Herr Prof. Dr. A. Pagenstecher

Korreferent: Herr Prof. Dr. J. W. Bartsch

(evtl.) 2. Korreferent/in:

In allen Jahren, die es gedauert hat, diese Arbeit fertig zu stellen, haben mich einige besondere Menschen immer unterstützt. Ein großer Dank geht an meine Eltern, die für mich immer Ruhepol, Wegbereiter und Vorbilder waren und sind. Dann möchte ich noch Martin danken, der mir in allen Lebenslagen eine Stütze ist und mich glücklich macht.

Für alle Labormäuse

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis	12
Tabellenverzeichnis	17
1 Einleitung	18
1.1 Gehirntumore und die neue WHO-Klassifikation 2016	18
1.2 Glioblastoma multiforme (GBM)	18
1.2.1 Histologie der Glioblastome	21
1.2.2 Entstehung der Glioblastome	21
1.2.2.1 Primäres Glioblastom	21
1.2.2.2 Sekundäres Glioblastom	22
1.2.3 Molekulargenetik	22
1.2.3.1 Die Rolle des Tumorsuppressors p53	22
1.2.3.2 EGFR/PTEN/Akt/mTOR-Signalweg	23
1.2.3.3 Das Protoonkogen c-MYC	24
1.3 Modelle für die Entstehung des Glioblastoma multiforme	25
1.3.1 System der Tetracyclinabhängigen Genexpression (Tet-off-System)	26
1.3.2 Konstitutiv aktives myr-Akt	27
1.4 Die Zielsetzung der Arbeit	28
2 Material und Methoden	29
2.1 Molekularbiologie	29
2.1.1 Verwendete Substanzen und Verbrauchsmaterialien	29
2.1.2 Eingesetzte Kits	30
2.1.3 Genutzte Laborgeräte	30
2.2 Allgemeine Methodik	31
2.2.1 Luria Broth-Medium (LB-Medium)	31
2.2.2 LB-Agar-Platten	31
2.2.3 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	31
2.2.4 1x Natrium-Borat (SB)-Puffer	31

2.2.5	1x Phosphate Buffered Saline (PBS)	31
2.2.6	Agarosegelherstellung	32
2.2.7	DNA-Gelelektrophorese	32
2.3	Verwendete Plasmide	32
2.4	Plasmidklonierung	34
2.4.1	Restriktionsverdau	34
2.4.2	Gelaufreinigung	35
2.4.3	Ligation	35
2.5	Retrovirale Expressionsvektoren	36
2.5.1	Vervielfältigung	36
2.5.1.1	Z-kompetente Bakterien	36
2.5.1.2	Transformation	36
2.5.2	Plasmidpräparation	37
2.5.2.1	Mini-Plasmidpräparation	37
2.5.2.2	Maxi-Plasmidpräparation	38
2.5.2.3	Optische Dichte- (OD)-Messung	39
2.6	Zellkultur	39
2.6.1	Materialien und Methoden für die Zellkultur	39
2.6.1.1	Verwendete Verbrauchsmaterialien und Substanzen	39
2.6.1.2	Geräte und Sterilisation	40
2.6.2	Versuchstiere	41
2.6.3	Genotypisierung der Versuchstiere mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.6.3.1	DNA Extraktionsprotokoll	42
2.6.3.2	DNA-Amplifizierungsprotokoll	42
2.6.3.3	Primer	43
2.6.4	Primäre Astrozytenkulturen	43
2.6.4.1	Kulturmedium	43
2.6.4.2	Stock solution	43
2.6.4.3	Trituration solution	44
2.6.5	Virusherstellung	45
2.6.5.1	Phoenixzellen	45
2.6.5.2	Virusernte	46
2.6.6	Retrovirale Infektion (Transduktion) der p53-knock-out-Astrozyten	47
2.6.7	Ausselektionierung mittels Antibiotika	47

2.6.8	Beobachtung der retroviral transduzierten Astrozyten	48
2.6.8.1	In-vitro-Versuche: Zellauszählungen	48
2.6.8.2	Statistische Auswertung der in-vitro-Versuche	48
2.7	In-vivo-Versuche	49
2.7.1	Vorbereitung der Stereotaxie	49
2.7.2	Durchführung der Stereotaxie	49
2.7.3	In-vivo-Versuchsreihen	50
2.7.3.1	Gehirnsektionen	52
2.7.3.2	Tumorvolumenmessung	53
2.7.4	Magnetresonanztomographie (MRT)	54
2.7.5	Immunhistochemie (IHC)	54
2.7.5.1	IHC an Kryostatschnitten	56
2.7.5.2	IHC an Paraffinschnitten	57
2.7.5.3	Immunfluoreszenz	57
3	Ergebnisse	59
3.1	Genotypisierung der p53-knock-out-Mäuse	59
3.2	Herstellung des Plasmides pBabe-Hygro-myr-FLAG-Akt	60
3.3	Zellkulturen: Transfektionserfolg anhand von Green fluorescent protein (GFP)-Nachweis	60
3.4	Veränderungen des Phänotyps der retroviral transduzierten Zellen	61
3.5	Doxycyclin-Konzentration in vitro	62
3.6	Änderung der Zellproliferation durch Doxycyclin	63
3.6.1	ToM-Zellen	63
3.6.2	AToM-Zellen	65
3.6.3	Proliferation der p53-knock-out-, der transduzierten Akt- und GFP-Zellen	68
3.6.4	In-vitro-Regulation mit Tet-off-System	69
3.7	In-vivo-Versuche	69
3.7.1	AToM-Zellen induzieren Tumore	70
3.7.2	Tumorvolumenmessung	72
3.8	Magnetresonanztomographie (MRT) der Mäuse	75
3.9	Immunhistochemie	76

3.9.1	Herkunft und Immunantwort	77
3.9.2	Antikörper gegen CD45R/B220	79
3.9.3	Antikörperfärbungen des Proliferationsmarkers Ki67	80
3.9.4	Antikörperfärbungen gegen c-Myc	82
3.9.5	Antikörperfärbungen gegen phospho-Akt (Ser473)	83
3.9.6	Antikörperfärbungen gegen CD31	84
3.9.7	Zelldifferenzierung	86
3.9.8	Immunfluoreszenz mit α Ki67 und α c-Myc	89
3.10	Infiltration der Tumorzellen	91
4	Diskussion	94
4.1	Warum werden Gliommodelle benötigt?	94
4.2	Vorhandene Tumormodelle in der Grundlagenforschung	94
4.3	Vorteile des primären astrozytären Mausmodells	94
4.4	Viraler Vektor und Proliferationssteuerung	95
4.5	Onkogenes Potential der AToM-Zellen	95
4.6	Proliferationsinduktion durch c-Myc und Steuerung mit Tet-off- System in vitro	96
4.7	Tumorinduktion und Regulation durch das Tet-off-System in vivo	97
4.8	Ki67 und c-Myc-Nachweis in den induzierten Tumoren	98
4.9	Immunantwort auf die implantierten AToM-Zellen	99
4.10	Vergleich der induzierten Tumore mit humanen Gliomen	99
4.11	Aussichten	101
5	Zusammenfassung	103
6	Summary	104
7	Literaturverzeichnis	105
8	Anhang	122
8.1	Lebenslauf	122
8.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen	123

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α	anti
μ	mikro
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
ALV	Aviäres Leukosevirus
Aqua bidest	Aqua bidestillata
ATM	ataxia telangiectasia mutated
AToM-Zellen	myr-Akt-, pBabe-tTa- und TF-myc-Zellen
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein
BL6	Black 6
bp	Basenpaare
ca.	circa
CDK	Cyclin-dependent Kinases
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
E. coli	Escherichia coli
ECO	ecotropic
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
et al.	et alii / aliae
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green fluorescent protein

h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IDH1	Isocitrate Dehydrogenase 1
Ig	Immunglobulin
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
k-Ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L	Liter
LB	Luria Broth
LOH	Loss of heterozygosity
m	Milli
M	Molar
MAP	Mitogen-activated protein
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog
MdmX	Double minute 4 protein
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGMT	O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
ml	Milliliter
MMLV	Mouse Moloney murine leukemia virus
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MQ	destilliertes Wasser
mRNA	messenger-RNA
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
Myc	myelocytomatosis viral oncogene
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NZY-Broth	NZ amine und Yeast extract-Medium
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymeraseketten- reaktion)
pH	pondus Hydrogenii
PIK3	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKB	Proteinkinase B
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PTK2	Protein tyrosine kinase 2
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SB	Sodiumborat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TET	Tetracyclin
ToM-Zellen	myr-AKT-, pBabe-tTa- und TF-myc-Zellen
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.2.3.1: Reaktion des Tumorsuppressors p53 auf DNA-Schädigung, modifiziert nach Rassow (120), Eliaš (31) und Watabane (149)
- Abb. 1.3.1: Schematische Darstellung des Tet-off-Systems, modifiziert nach Baron (9), Böhner (14) und Leuchtenberger (82)
- Abb. 2.3a: Plasmidkarte pBABEhygro-myr-FLAG-AKT
- Abb. 2.3b: Plasmidkarte MIGRdeluxel TF-myc
- Abb. 2.3c: Plasmidkarte pBABEpuro tTA
- Abb. 3.1a: Genotypisierung der für die Herstellung der primären Astrozyten verwendeten Mäuse; Methode: KAPA PCR
- Abb. 3.1b: Kontrollverdau der Mini-Präparation pBABE-Hygro-myr-FLAG-Akt
- Abb. 3.3: Green fluorescent protein (GFP)-Expression bei Phoenix-Zellen 24 Stunden nach Transfektion
- Abb. 3.4a: Primäre P53-knock-out-Astrozyten, erster Tag in Kultur, Auflichtmikroskopie
- Abb. 3.4b: 1. Passage von Akt-transduzierten Astrozyten, 24 h nach Selektionbeginn, Phasenkontrastmikroskopie
- Abb. 3.4c: Akt-Zellen nach weiterer Transduktion mit pBABE-Ta-Virus, 2. Passage, Phasenkontrastmikroskopie
- Abb. 3.4d: Fluoreszenz-mikroskopischer Nachweis (GFP) von ToM-Zellen, 1. Passage
- Abb. 3.4e: Fluoreszenz-mikroskopischer Nachweis (GFP) von AToM-Zellen 6. Passage
- Abb. 3.5: Austestung verschiedener Doxycyclin-Konzentrationen bei AToM-Zellen ab 4. Passage
- Abb. 3.6.1a: Zellvermehrungsrate von ToM-Zellen Gruppe 1 ab 1. Passage
- Abb. 3.6.1b: Zellvermehrungsrate von ToM-Zellen Gruppe 1 ab 7. Passage nach Kryokonservierung in der 1. Passage
- Abb. 3.6.2a: Zellvermehrungsrate von AToM-Zellen Gruppe 1 ab 4. Passage
- Abb. 3.6.2b: Zellvermehrungsrate von AToM-Zellen Gruppe 2 ab 7. Passage
- Abb. 3.6.2c: Zellvermehrungsrate von AToM-Zellen Gruppe 3 ab 1. Passage
- Abb. 3.6.2d: Zellvermehrungsrate nach 22 Tagen Doxycyclinkarenz von AToM-Zellen Gruppe 2, 8. Passage

- Abb. 3.6.3: Zellproliferationsraten von p53-knock-out-Zellen, Akt-Astrozyten und GFP-Astrozyten ab 1. Passage
- Abb. 3.7.1a: Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 8, Schnitt 105
- Abb. 3.7.1b: Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 8, Schnitt 1
- Abb. 3.7.2a: Graphische Darstellung der Tumolvolumina nach Implantation von AToM-Zellen, Versuchsreihe II.
- Abb. 3.7.2b: Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 1; sichtbare Nekroseinseln
- Abb. 3.7.2c: Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Doxycyclin-behandeltes Versuchstier Nr. 9, Kryostat-Schnitt 40
- Abb. 3.7.2d: Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 6 ohne Doxycyclingabe, Kryostat-Schnitt 15
- Abb. 3.8a: cMRT Maus Nr. 5 mit implantierten AToM-Zellen der 8. Passage
- Abb. 3.8b: cMRT Maus Nr. 8 mit implantierten AToM-Zellen der 8. Passage
- Abb. 3.9a: Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 8, Schnitt 120, 20-fache Vergrößerung
- Abb. 3.9b: Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 5, Schnitt 45, 40-fache Vergrößerung
- Abb. 3.9.1a: Antikörper gegen GFAP, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 1, Paraffinschnitt 51
- Abb. 3.9.1b: Antikörper gegen CD8, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7, Schnitt 37
- Abb. 3.9.1c: Antikörper gegen MAC-1, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 6, Schnitt 34
- Abb. 3.9.1d: Antikörper gegen MAC-1, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 9, Schnitt 8
- Abb. 3.9.1e: Negativkontrolle
- Abb. 3.9.2a: Antikörper gegen CD45, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 4, Kryostat-Schnitt 13, 20-fache Vergrößerung
- Abb. 3.9.2b: Antikörper gegen CD45, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 5, Kryostat-Schnitt 7

- Abb. 3.9.3a: Antikörper gegen Ki 67, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 2, Schnitt 28
- Abb. 3.9.3b: Antikörper gegen Ki 67, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7, Schnitt 14
- Abb. 3.9.3c: Antikörper gegen Ki 67, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10, Paraffinschnitt 105, 40-fache Vergrößerung
- Abb. 3.9.3d: Antikörper gegen Ki 67, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 5, Schnitt 45, 40-fache Vergrößerung
- Abb. 3.9.3e: Antikörper gegen Ki 67, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7, Schnitt 16
- Abb. 3.9.3f: Antikörper gegen Ki67, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 2
- Abb. 3.9.4a: Antikörper gegen c-Myc, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 6, Schnitt 38, 40-fache Vergrößerung
- Abb. 3.9.4b: Antikörper gegen c-Myc, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7, Schnitt 69, 40-fache Vergrößerung
- Abb. 3.9.4c: Antikörper gegen c-Myc, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10, Paraffinschnitt 90, 40-fache Vergrößerung
- Abb. 3.9.4d: Negativkontrolle, Paraffinschnitt
- Abb. 3.9.5a: Antikörper gegen phospho-Akt, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 2, Schnitt 37
- Abb. 3.9.5b: Antikörper gegen phospho-Akt, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 6, Kryostat-Schnitt
- Abb. 3.9.5c: Antikörper gegen phospho-Akt, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 3, Kryostat-Schnitt
- Abb. 3.9.5d: Antikörper gegen phospho-Akt, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 5, Kryostat-Schnitt
- Abb. 3.9.6a: Antikörper gegen CD31, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 6, Schnitt 19
- Abb. 3.9.6b: Antikörper gegen CD31, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 6, Schnitt 23, 40-fache Vergrößerung
- Abb. 3.9.6c: Antikörper gegen CD31, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7

- Abb. 3.9.7a: Antikörper gegen Desmin, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10
- Abb. 3.9.7b: Antikörper gegen Desmin, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 6
- Abb. 3.9.7c: Antikörper gegen MAP-2, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10
- Abb. 3.9.7d: Antikörper gegen Neurofilament, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10
- Abb. 3.9.7e: Antikörper gegen Olig 2, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10
- Abb. 3.9.7f: Antikörper gegen sm-Actin, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10
- Abb. 3.9.7g: Antikörper gegen Vimentin, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 1
- Abb. 3.9.8a: Grün-fluoreszierende Ki67-Färbung mit Alexa Fluor (488) Goat Antikörper gegen rabbit IgG (H+L), Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10, Schnitt 108
- Abb. 3.9.8b: Rot-fluoreszierende c-Myc-Färbung mit Alexa Fluor (568) Goat Antikörper gegen rabbit IgG (H+L), Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10, Schnitt 109
- Abb. 3.9.8c: Graphische Bildzusammenfügung der Schnitte 108 (Abb. 3.9.8a) und 109 (Abb. 3.9.8b) mit Gefäßanschnitt als Orientierung
- Abb. 3.10a: HE-Färbung, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 3, Schnitt 40
- Abb. 3.10b: HE-Färbung, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 5, Schnitt 40, 40-fache Vergrößerung
- Abb. 3.10c: HE-Färbung, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 5, Schnitt 25
- Abb. 3.10d: HE-Färbung, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 3
- Abb. 3.10e: Antikörper gegen Ki67, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 3
- Abb. 3.10f: Antikörper gegen c-Myc, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7, 40-fache Vergrößerung

Abb. 3.10g: Antikörper gegen c-Myc, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7

Abb. 3.10h: Antikörper gegen Ki67, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.2:	Ausgewählte ZNS-Tumore mit Grading nach der neuen WHO-Klassifikation 2016 (88)
Tab. 2.1.1:	Verwendete Substanzen und Materialien
Tab. 2.1.3:	Verwendete Laborgeräte
Tab. 2.3:	Verwendete Plasmide
Tab. 2.5.2.1:	Verwendete Pufferlösungen bei Plasmidpräparation
Tab. 2.6.1.1:	Verwendete Materialien und Substanzen für die Zellkultur
Tab. 2.6.1.2:	Geräte und Sterilisation in der Zellkultur
Tab. 2.7.3:	Übersicht der in-vivo-Versuchsreihen
Tab. 2.7.5a:	Primärantikörper und verwendete Verdünnungen
Tab. 2.7.5b:	Sekundärantikörper und verwendete Verdünnungen
Tab. 2.7.5.3a:	Primärantikörper bei der Immunfluoreszenz
Tab. 2.7.5.3b:	Sekundärantikörper bei der Immunfluoreszenz
Tab. 3.7.1:	Tumorigenesis der verschiedenen Zelltypen

1 Einleitung

1.1 Gehirntumore und die neue WHO-Klassifikation 2016

Bei den Gehirntumoren werden primäre und sekundäre Tumore unterschieden. Die primären Tumore stammen von Neuroepithel, Meningen, Hirnanhangsdrüsen oder ektopen intrakraniellen Geweben ab. Bei den sekundären Tumoren handelt es sich um Metastasen durch Malignome anderer Ursprungslokalisationen (11, 53). Die Inzidenz der primären Hirntumore und Tumore des zentralen Nervensystems im Erwachsenenalter liegt bei ca. 22 Fällen auf 100.000 Einwohner, die Inzidenz der hirneigenen neuroepithelialen Tumore bei ca. 10 auf 100.000 Einwohner (112). Die größte Gruppe unter den primären, malignen, hirneigenen Tumoren repräsentieren mit etwa 80 % die Gliome (112).

Die WHO-Klassifikation teilt die Tumore nach Grad I bis IV ein (87, 88). Grad I umfasst Tumore mit niedriger Proliferation und sehr guten Heilungsaussichten, falls die Lokalisation eine vollständige operative Tumorresektion zulässt. Bei Grad II findet sich eine geringe proliferative Aktivität der Tumorzellen jedoch mit überwiegend diffusem infiltrativem Wachstumsverhalten. Rezidive sind häufiger und eine Progression zu höhergradigen Gliomen ist insbesondere bei Astrozytomen und Oligodendrogliomen typisch. Hirntumore des WHO Grades III zeigen histologisch deutliche Malignitätskriterien wie eine erhöhte Mitoserate und Kernatypien. Die Tumore neigen zudem zu einem invasiven Wachstumsverhalten. Bei Grad IV-Tumoren finden sich eine sehr hohe mitotische Aktivität, Nekrosen und eine Gefäßproliferation (87, 88). 2016 erschien die derzeit aktuelle WHO-Klassifikation der ZNS-Tumore. Hierbei wurden die histologischen Einteilungskriterien um molekulargenetische Marker erweitert. Diese Marker wie LOH1p19q (loss of heterozygosity des kurzen Arms des Chromosoms 1 (1p) und des langen Arms von Chromosom 19 (19q)) und der Mutationsstatus von IDH1 (Isocitrat-Dehydrogenase1) bei Gliomen sind mit unterschiedlichen Prognosen assoziiert und haben deshalb Bedeutung für die weiteren Therapieentscheidungen (34, 50, 88, 142).

1.2 Glioblastoma multiforme (GBM)

Das Glioblastoma multiforme (GBM) wird nach WHO-Grad IV eingeteilt und ist der häufigste primäre Hirntumor des Erwachsenen (20, 37, 112). Dieser klinisch hochmaligne, aggressive Tumor ist auch heute noch durch eine extrem schlechte Prognose gekenn-

zeichnet (53). Das aktuelle multimodale Therapiekonzept besteht aus einer möglichst weitgehenden operativen Tumorreduktion unter Vermeidung Resektions-bedingter, die Lebensqualität einschränkender neurologischer Defizite. Anschließend wird je nach MGMT-Status, Alter und Allgemeinzustand des Patienten entweder eine kombinierte Radiochemotherapie mit Lomustin und Temozolomid (56) oder eine alleinige Radiatio oder Chemotherapie durchgeführt (11, 58, 117). Auch werden zunehmend die sogenannten tumor treating fields (TTFs) in Kombination mit Temozolomid eingesetzt (19). Eine Heilung ist nicht möglich, die mittlere Überlebenszeit beträgt 12 bis 15 Monate, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei unter 3 % (107, 118).

Jede Altersklasse ist betroffen, jedoch tritt das Glioblastom vorwiegend im Alter zwischen 45 und 75 Jahren auf (87, 105, 107). Das GBM ist am häufigsten unilateral in der weißen Substanz der Großhirnhemisphären lokalisiert. Die klinischen Symptome variieren je nach Tumorlokalisierung und den Veränderungen in der Tumorumgebung. Am häufigsten sind Kopfschmerzen, Wesensveränderungen oder eine Übelkeit zu finden. Aber auch fokale neurologische Defizite oder epileptische Anfälle können Erstsymptome sein. Oft sind die Beschwerden auf das perifokale Ödem und eine Erhöhung des intrakraniellen Drucks teils mit nachweisbarer Stauungspapille zurückzuführen (18, 53, 105, 107).

	WHO grades
Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	II
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	III
Glioblastoma, IDH-wildtype	IV
Glioblastoma, IDH-mutant	IV
Diffuse midline glioma, H3-K27M-mutant	IV
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	II
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	III
Other astrocytic tumours	
Pilocytic astrocytoma	I
Subependymal giant cell astrocytoma	I
Pleomorphic xanthoastrocytoma	II
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	III
Ependymal tumours	
Subependymoma	I
Myxopapillary ependymoma	I
Ependymoma	II
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	II or III
Anaplastic ependymoma	II

Other gliomas	
Angiocentric glioma	I
Chordoid glioma of third ventricle	II
Choroid plexus tumours	
Choroid plexus papilloma	I
Atypical choroid plexus papilloma	II
Choroid plexus carcinoma	III
Neuronal and mixed neuronal-gliial tumours	
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	I
Gangliocytoma	I
Ganglioglioma	I
Anaplastic ganglioglioma	III
Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	I
Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	I
Papillary glioneuronal tumour	I
Rosette-forming glioneuronal tumour	I
Central neurocytoma	II
Extraventricular neurocytoma	II
Cerebellar liponeurocytoma	II
Tumours of the pineal region	
Pineocytoma	I
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	II or III
Pineoblastoma	IV
Papillary tumour of the pineal region	II or III
Embryonal tumours	
Medulloblastoma (all subtypes)	IV
Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	IV
Medulloepithelioma	IV
CNS embryonal tumour, NOS	IV
Atypical teratoid/rhabdoid tumour	IV
CNS embryonal tumour with rhabdoid features	IV
Tumours of the cranial and paraspinal nerves	
Schwannoma	I
Neurofibroma	I
Perineurioma	I
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)	II, III or IV
Meningeomas	
Meningeoma	I
Atypical meningioma	II
Anaplastic (malignant) meningioma	III
Mesenchymal, non-meningothelial tumours	
Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma	I, II or III
Haemangioblastoma	I

Tumours of the sellar region

Craniopharyngioma	I
Granular cell tumour	I
Pituitoma	I
Spindle cell oncocytoma	I

Tab. 1.2: Ausgewählte ZNS-Tumore mit Grading nach der neuen WHO-Klassifikation 2016 (88)

1.2.1 Histologie der Glioblastome

Glioblastome sind sehr zellreiche, polymorphe Tumore mit hoher Mitoserate, Nekrosen, verschiedensten Zelltypen und Riesenzellen (39). Die Bezeichnung Glioblastoma „multiforme“ beschreibt dieses sehr variable histologische Erscheinungsbild. Es werden primäre und sekundäre Glioblastome unterschieden (39, 106, 108). Eine histologische Differenzierung zwischen primärem GBM und sekundären Formen ist nicht möglich, es bestehen jedoch Unterschiede im molekulargenetischen Erscheinungsbild und dem Erkrankungsalter (50, 88, 91). Immunhistochemisch lässt sich in den Tumoren meist saures Gliafaserprotein (GFAP) nachweisen, was die astrozytäre Differenzierung der Glioblastome anzeigt. Es finden sich jedoch auch Glioblastome, die immunnegativ für GFAP sind (17). So wird in der neuen WHO Klassifikation das Glioblastom mit primitiver neuronaler Komponente (Glioblastoma PNET-like) aufgeführt (88). Diese Glioblastomentität weist primitive Zellen mit neuronaler Differenzierung und dem Verlust der GFAP-Expression auf. Zudem kann eine Amplifikation von *MYC* oder *MYCN* bestehen (7, 32, 88, 100).

1.2.2 Entstehung der Glioblastome

Die Ursprungszelle des Glioblastoms ist bislang nicht eindeutig identifiziert, sowohl undifferenzierte neuronale Stammzellen, als auch differenzierte Gliazellen werden diskutiert (1, 42, 132).

1.2.2.1 Primäres Glioblastom

Das primäre Glioblastom entsteht neu (de novo), d. h. es ist zuvor kein niedergradiges Gliom nachweisbar (90, 108). Nach molekulargenetischen Kriterien liegt beim primären GBM ein IDH-Wildtyp-Tumor vor (104). Häufig findet sich ein vollständiger Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 10 (40). Auch kommt es oft zu Amplifikation des EGF-Rezeptors (epidermal growth factor) (148). Weitere wichtige Veränderungen, die für ein primäres Glioblastom sprechen, sind Mutationen des PTEN-Gens (Phosphatase and Tensin homolog) und des TERT-Promotors (Telomerase Reverse Transcriptase) (6). Diese

Genmutationen gehen mit einer schlechteren Prognose einher (55). Klinisch sind die Tumore am häufigsten supratentoriell lokalisiert, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 62 Jahren. Es vergehen durchschnittlich 4 Monate vom Symptombeginn bis zur Diagnosestellung. Die primären Glioblastome sind mit 90 % die häufigste Entität der Glioblastome (50, 88).

1.2.2.2 Sekundäres Glioblastom

Das sekundäre Glioblastom entwickelt sich durch Progression eines niedriggradigen oder anaplastischen Astrozytoms und weist molekulargenetisch meist eine IDH-Mutation auf (103, 108, 122). Im Gegensatz zum primären Glioblastom finden sich häufiger ein chromosomaler Teilverlust mit Fehlen des langen Armes (q) des Chromosoms 10 und Mutationen des Tumorsuppressor-P53-Gens sowie des ATRX-Gens (ATP-abhängige Helicase) (90, 108, 113). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 44 Jahren (88, 107).

Trotz der molekulargenetischen Unterschiede sind bei beiden Glioblastomtypen dieselben Signalwege für Zellwachstum und Zellmigration (101) wie TP53/MDM2/p14arf-, p16INK4a/RB1- und der EGFR/PTEN/Akt- Weg von Bedeutung (15, 41, 73, 110).

1.2.3 Molekulargenetik

1.2.3.1 Die Rolle des Tumorsuppressors p53

Das Protein p53 stellt einen Tumorsuppressor dar, der durch verschiedenste Mechanismen wie z. B. Nährstoffmangel, Hypoxie, DNA-Schädigung, oxidativen Stress oder Onkogene aktiviert wird (8, 143). P53 bindet dann als Tetramer an die DNA und induziert die Zielgentranskription (92, 93). Das zelluläre Protein p14(19)^{ARF} bindet an den Komplex MDM2, auch als HDM2 bekannt (E3 ubiquitin-protein ligase mouse double minute 2 homologue) (77, 116). Dies führt unter physiologischen Bedingungen zu einer Ubiquitinierung von p53 (149). Dieser Komplex fungiert je nach eigenem Phosphorylierungsstatus als Antagonist von p53 (31, 43). Zusätzlich werden bei der Reaktion auf z. B. eine DNA-Schädigung die Kinasen ATM/ATR (Ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related) induziert. Diese Kinasen phosphorylieren das p53, so dass die negative Interaktion mit MDM2 nicht mehr möglich ist (68, 119). Zudem führt ATM zu einer Phosphorylierung von MDM2 und MDMX wodurch eine Bindung an die p53mRNA entsteht und ein positiver Effekt auf die p53-Expression auftritt (31). Mit diesen Mechanismen kann p53 in der Zelle akkumulieren und als aktives p53 über DNA-Bindung die Transkription verschiedener Zielgene bewirken. Als „Wächter des Genoms“ reguliert das aktive p53 so unterschiedliche intrazelluläre Prozesse wie die DNA-Reparatur, den Zellzyklus mit Zellarrest und die Apoptose (54, 144).

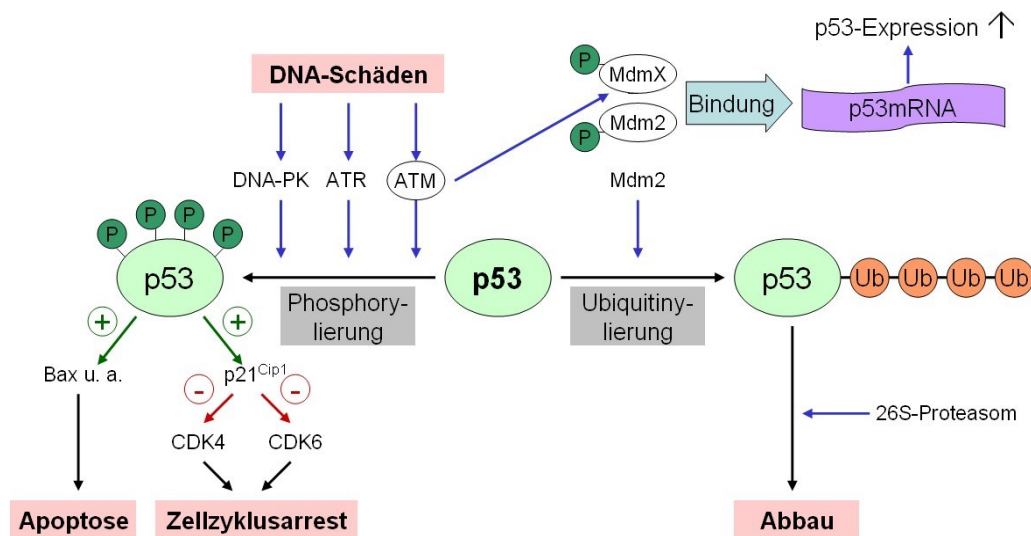


Abb. 1.2.3.1: Reaktion des Tumorsuppressors p53 auf DNA-Schädigung, modifiziert nach Rassow (120), Eliaš (31) und Watabane (149)

Zusätzlich werden extrazelluläre Prozesse wie etwa die Angiogenese beeinflusst (120). Durch diese Veränderungen ergibt sich die wichtige Rolle des p53-Verlustes in der Veränderung des Metabolismus von Krebszellen (5, 16).

Der so genannte „Warburg-Effekt“, die Zunahme der Glykolyse in Krebszellen (83), wird maßgeblich von p53 und dessen Regulationsmechanismen beeinflusst (144). Viele Tumorentitäten weisen p53-Genmutationen oder p53-Genverluste auf (8, 33, 65). Insbesondere das sekundäre Glioblastom zeigt mit 81 % häufig eine solche Mutation (88, 113). Diese genetische Aberration ist auch bereits in vielen niedriggradigen Astrozytomen nachweisbar (108). Eine weitere wichtige Veränderung ist die Methylierung bzw. Inaktivierung des p14ARF (alternate reading frame protein product of the CDKN2A locus), die ebenfalls vor allem in sekundären Glioblastomen vorkommt (149).

1.2.3.2 EGFR/PTEN/Akt/mTOR-Signalweg

Als weiterer wichtiger Signalweg ist die EGFR/PTEN/Akt/mTOR-Signalkaskade bei der Entstehung von Glioblastomen zu nennen. Die Amplifikation des EGFR (epidermal growth factor receptor) und Mutationen von *PTEN* (Phosphatase and Tensin homologe) sind bei primären Glioblastomen anzutreffen (65, 88, 135). Liegt eine EGFR-Amplifikation im Tumor vor, so zeigte sich in ca. 60 % der Fälle ebenfalls ein Verlust des Chromosoms 10 (79). Als Stimulus dienen Wachstumsfaktoren, die extrazellulär an EGFR binden und dadurch die Phosphoinositol-3-Kinasen (PI3K) aktivieren. Über Phosphorylierung des Membranphospholipids Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) an

Position 3 entsteht Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PIP3). PIP3 sorgt mit Hilfe von zwei weiteren Kinasen (PIP3-dependent kinases, PDKs) für eine zweifache Phosphorylierung und damit für eine Aktivierung der Proteinkinase B (AKT) (152). Über Phosphorylierung wirkt aktiviertes Akt antiapoptotisch (69). Hierfür sorgen eine Inaktivierung des Proteins BAD (Bcl-2-Antagonist of cell death) und eine Blockierung der Caspase 9 (151). Zusätzlich führt aktiviertes Akt zu einer Stabilisierung der mitochondrialen Struktur und damit wahrscheinlich zu einer Blockierung der Cytochrom C-Freisetzung, die ebenfalls an der Caspasenaktivierung beteiligt ist (69). Akt ist auch an der Phosphorylierung von p21^{Cip1} (CDK-Inhibitor 1) beteiligt (125). p21^{Cip1} spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklusarrest (72). Somit kann Akt die Zellproliferation positiv beeinflussen.

Über den Proteinkomplex aus RICTOR (Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin) und mTOR (mammalian target of rapamycin) ist Akt vier- bis fünffach aktiver als nach alleiniger Phosphorylierung durch PDK1 (128).

Durch alle diese Wirkmechanismen stellt Akt ein Protoonkogen dar. Das Tumorsuppressor Enzym PTEN (phosphatase and tensin homolog) antagonisiert die Effekte des Akt. PTEN dephosphoryliert PIP3 und das Protein PTK2 (Protein tyrosine kinase 2), das auch focal adhesion kinase (FAK) genannt wird (135). Somit kann PTEN die Zellinvasion, Migration und Invasion inhibieren. In Glioblastomen finden sich Mutationen des PTEN-Enzyms. Akt phosphoryliert noch viele weitere Proteine, unter anderem das Forkhead-Box-Protein O3 (FOXO3), das normalerweise die Proliferation hemmt (152). Akt hat über den EGFR/PTEN/Akt/mTOR-Signalweg viele Wirkmechanismen, beeinflusst entscheidend den Zellmetabolismus und ist damit als wichtiges Protoonkogen anzusehen.

1.2.3.3 Das Protoonkogen *c-MYC*

Ein wichtiges Protoonkogen in der Krebsentstehung ist *c-MYC* (32, 104). Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor mit Basic-Helix-Loop-Helix-Struktur (bHLH), so dass über verschiedene spezifische regulatorische Sequenzen die Transkription von Genen gesteuert werden kann (12). *c-MYC* ist in Krebszellen meist überexprimiert (36, 111). *MYC* bildet mit dem bHLH-Komplex MAX (myc-associated factor X) eine Verbindung (35). *MYC-MAX*-Komplexe fördern die Proliferation über Hochregulation von Genen.

Zusätzlich kann MAX sich mit dem durch das *MXD1*-Gen codierten Protein MAD (mitotic arrest deficient) binden. Die *MAD-MAX*-Komplexe ermöglichen im Gegensatz zu den *MYC-MAX*-Komplexen die Zelldifferenzierung und unterdrücken die Proliferation (13). Des Weiteren kann *c-MYC* den Ablauf des Zellzyklus beeinflussen, z. B. über Aktivierung von Cyclin E, einem Protein, das zusammen mit Cdk2 (Cyclin-dependent kinase 2) den Übergang der G1- in die S-Phase des Zellzyklus steuert. Gleichzeitig unterdrückt *c-*

MYC das p21^{Cip1} sowie p27^{Kip} und somit den Zellzyklusarrest (25). Durch c-MYC wird das p15^{INK4b}- Protein (Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B) inhibiert, das normalerweise den CyclinD/Cdk4-Komplex antagonisiert und somit ebenfalls an einem wichtigen Checkpoint am Übergang der G1- zur S-Phase eingreift (115, 147). Da nun die Unterdrückung des CyclinE/Cdk2-Komplexes aufgehoben ist, kann Retinoblastom Protein (RB) phosphoryliert werden, und die Transkriptionsfaktoren E2F können nicht mehr von RB inhibiert werden. Auch über diesen Weg wird die S-Phase erreicht. Zudem kann c-MYC den Tumorsuppressor PTEN inhibieren (52).

Diese Wirkmechanismen machen deutlich, dass die konstitutive Expression von c-MYC zu einem unkontrollierten Fortschreiten in die S-Phase führt und somit die Kontrolle des Zellzyklus einem ungehemmten Zellwachstum mit schneller Tumorprogression weicht (111). Ferner kann MYC die Translation über eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E) und eIF2 α (Eukaryotic Initiation Factor 2) einleiten, die Proteinbiosynthese bei erhöhter Zellproliferation wird somit ebenfalls gesteigert (130). MYC steigert aber nicht nur Proliferation und Proteinbiosynthese, es ist auch an der Induktion der Apoptose beteiligt (4, 76, 114).

Die Überexpression des Onkogens c-MYC ist bereits in niedriggradigen Astrozytomen nachweisbar (61). Die Funktionen von c-MYC im Zellzyklus und Zellwachstum machen die Relevanz bei der Tumorentstehung deutlich.

Zunehmend wird auch die Interaktion von c-MYC und IDH-1 bei Glioblastomen untersucht (22, 104, 123).

1.3 Modelle für die Entstehung des Glioblastoma multiforme

Für das Verständnis der Glioblastom-Entstehung und als Grundlage für mögliche Therapieansätze müssen in-vitro- und in-vivo-Modellsysteme etabliert werden. Es werden Xenograft- und Allograftmodelle verwendet, bei denen humane oder murine Glioblastomzelllinien z. B. in Nacktmäuse implantiert werden (70). Auch wurde versucht, durch Anhäufung genetischer Aberrationen in Keimbahnzellen oder somatischen Zellen glioblastomtypische Veränderungen hervorzurufen (44, 94).

Ein in-vivo-Modell sollte Tumore induzieren können, die im Hinblick auf infiltratives Wachstum und Polymorphie dem klinischen Erscheinungsbild des GBM möglichst ähnlich sind und dabei wenig immunreaktiv sind.

In früheren Arbeiten war es möglich, somatische Zellen so zu verändern, dass die Expression bestimmter Gene kontrolliert werden konnte. Retroviraler Gentransfer bietet die

Möglichkeit gezielte Modifikationen vorzunehmen (134). Das Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) System kann proliferierende Zellen von Mäusen infizieren. Hingegen befällt das Aviäre Leukosevirus (ALV) gezielt Zellen mit einem bestimmten Rezeptor (Plasmamembranrezeptor RCAS) (38, 59, 60). In Versuchen, dieses System der retroviralen gezielten Infektion zu nutzen, wurden transgene Mauslinien entwickelt und neuronale Progenitorzellen über einen solchen Gentransfer mit *k-Ras* und *Akt* zu Tumorzellen modifiziert, die zu glioblastomähnlichen Tumoren führten (59).

Bei Überexpression von c-MYC konnten ähnliche Effekte an differenzierten Astrozyten erzielt werden (80).

1.3.1 System der Tetracyclinabhängigen Genexpression (Tet-off-System)

In einem weiteren Ansatz sollte die Regulation des Tumorwachstums durch eine Proliferationssteuerung erfolgen. Hierfür wurde ein Tet-System für die Genexpression etabliert, das einen chimären Transaktivator tTA (48, 49), der sowohl an Tetracyclin als auch an bestimmte DNA-Sequenzen (TET-Responsive Elements) binden kann, enthält. Dieser Transaktivator wurde aus einem bakteriellen Tet-Repressor (tetR) und einer Aktivierungsdomäne aus dem Herpes-simplex-Protein 16 erzeugt. Das so entwickelte Tet-off-System reduzierte die Bindung zwischen TET an tTA und führte somit zu einer Inhibition der Genexpression (9).

Es wurden ein pBABE-puro-tTA und ein MIGRdeluxeI-TF-Myc-Plasmid kloniert und das Tet-off-System *in vitro* getestet. Hierbei zeigte sich eine gute Steuerbarkeit der Zellproliferation im Tet-off-System durch Tetracyclingabe.

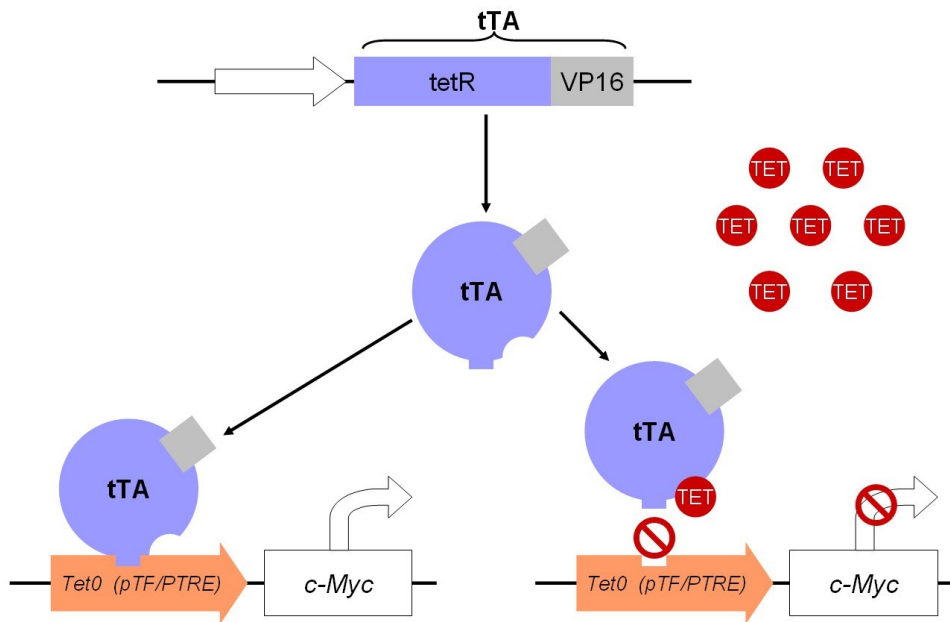


Abb. 1.3.1 Schematische Darstellung des Tet-off-Systems, modifiziert nach Baron (9), Böhner (14) und Leuchtenberger (82)

1.3.2 Konstitutiv aktives myr-Akt

Die Rolle des EGFR/PTEN/Akt/mTOR-Signalwegs wurde bereits unter 1.2.3.2 beschrieben. Da Akt in einigen humanen Glioblastomzelllinien wie z. B. in der Linie U251MG nachweisbar konstitutiv aktiv ist und vielfältig den Tumormetabolismus beeinflusst, erscheint die Verwendung eines konstitutiv aktiven Akt in einem astrozytären Tumormodell als geeigneter Ansatz (127).

1.4 Die Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, astrozytäre Tumorzellen der Maus mit steuerbarer Proliferation herzustellen und somit ein in-vivo-Tiermodell zu etablieren, das die relativ langsame Proliferationsrate menschlicher Gliome reproduziert. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die langsame Proliferationsrate mit dem Infiltrationsverhalten korreliert und welche weiteren Eigenschaften die induzierten Tumore aufweisen.

Folgende Fragen waren zu klären:

1. Ist die Proliferation der *c-myc*-transduzierten Zellen über das Tet-off-System in vitro und in vivo steuerbar?
2. Sind allein *myr-Akt*-modifizierte oder nur *c-myc*-modifizierte Zellen bereits in der Lage in vivo Tumore zu induzieren, oder ist dies nur mit Zellen, bei denen sowohl *myr-Akt* als auch *c-Myc* modifiziert wurden, möglich?
3. Kann in den induzierten Tumoren eine GBM-typische Polymorphie und Tumorzelldifferenzierung beobachtet werden?
4. Kann auch eine für humane GBM charakteristische Infiltration beobachtet werden, und korreliert diese gegebenenfalls mit der durch die Tet-off-Steuerung verlangsamten Proliferation?

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologie

2.1.1 Verwendete Substanzen und Verbrauchsmaterialien

Die im Folgenden genannten Substanzen und Materialien wurden im Bereich der molekularbiologischen Methodik verwendet.

Verwendete Substanzen	Firmenname, Firmensitz
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hess Oldendorf
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Fisher Scientific, Nidderau
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Casein Hydrolysat	Thermo Fisher, Carlsbad
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPS)	Promega, Madison
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Madison
Disodiumtetraborat (Borax)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Glycerin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
LB-Lennox	Thermo Fisher, Carlsbad
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Fluka, St. Louis
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Calbiochem (Merck), Darmstadt
Tris Base	Acros Organics, New Jersey
Xylencyanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Yeast Extract	Thermo Fisher, Carlsbad
2-(4-(2Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Thermo Fisher, Carlsbad
25xTAE	Ambion, USA

Verwendete Materialien	Firmenname, Firmensitz
Aluminiumfolie	Kobe, Marburg
Eppendorf Tubes Volumina 0,5 ml, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon Volumina 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Faltenfilter	Roth, Karlsruhe

PCR-Tubes 0,2 ml	Biozym, Hess Oldendorf
Pipettenspitzen 10 µL, 100 µL, 1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht
Rasierklingen	Unger
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zahnstocher	VESS, Köln

Tab. 2.1.1: Verwendete Substanzen und Materialien

2.1.2 Eingesetzte Kits

Zur Plasmidherstellung wurden die Kits QIAquick® Gel Extraction Kit und maxi Plasmid Purification Kit von QIAGEN, Hilden verwendet. Für die Genotypisierung der benötigten p53-knock-out-Versuchstiere wurde das KAPA Mouse Genotyping Kit von PEQLAB eingesetzt.

2.1.3 Genutzte Laborgeräte

Gerät	Firmennamen, Sitz
Automatisches Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem (HLC)	Kobe, Marburg
Brutschrank (Heraeus Typ B 6060)	Heraeus, Hanau
Horizontale Elektrophoresekammer (Gel casting system 11·14)	Thermo Fisher, Carlsbad
Horizontale Elektrophoresekammer (Easy-Cast Model B)	Owl Separation Systems, Portsmouth
Kühl-Mikrozentrifuge (5418)	Eppendorf, Hamburg
Kühl-Zentrifuge (5810-R)	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer (IKAMAG Pet-G)	IKA, Staufen
Mikrowelle (NN-T221 M)	Panasonic, Osaka
Mikrozentrifuge (5417-R)	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter Lab 850 (Blue line 14)	Schott®, Mainz
Photometer (Ultraspec 3100 pro)	Amersham Biosciences, Uppsala
Pipetten P2, P20, P100, P200, P1000	Gilson, Villiers le Bel
Präzisionswaage (Kern 440-47)	Kobe, Marburg
Schüttelinkubator (Infors HAT Aerotron)	Infors AG, Bottmingen
Thermocycler (Uno-Thermoblock)	Biometra, Göttingen
Thermodrucker (Digital Graphic Printer MP-D 897)	Sony, Shinagawa
Thermomixer (Comfort)	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator	Fisher Bioblock scientific, Illkirch Graf-fenstaden
Vortex-Mixer (M82)	IKA®, Wilmington
Zentrifugenröhrchen (PPCO 50 ml, 250 ml)	Nalgene, New York

Tab. 2.1.3: Verwendete Laborgeräte

2.2 Allgemeine Methodik

Im Folgenden werden die Herstellung von Medien und Pufferlösungen beschrieben.

2.2.1 Luria Broth-Medium (LB-Medium)

Um LB-Medium herzustellen, wurde 20 g LB-Lennox (Roth, Karlsruhe) in 1 L MQ-Wasser (im weiteren als MQ abgekürzt) aufgelöst und bei 121 °C für 15–30 Minuten autoklaviert. Nach dem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde das Medium bei 4 °C für mehrere Wochen zur Verwendung aufbewahrt.

2.2.2 LB-Agar-Platten

Für die Agar-Platten wurden von dem oben beschriebenen LB-Medium 100 ml mit 1 g Agar (Roth, Karlsruhe) mit einem Magnetrührer unter Erhitzen in Lösung gebracht, anschließend wurde das Agar-LB-Gemisch für 15–30 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Danach musste sich die autoklavierte Flüssigkeit unter 60 °C abkühlen, um das Ampicillin-Aliquot 100 mg/ml in einer Verdünnung von 1:1000 dazu pipettieren zu können. Im Anschluss wurden die Petrischalen in einer sterilen Werkbank mit jeweils 10 ml der Ampicillin-Agar-LB-Mischung gefüllt und waren bei 4 °C für ca. 6 Wochen zur weiteren Verwendung haltbar.

2.2.3 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer

Zum Ansetzen des 1x TAE-Puffers wurde der 25x TAE Stock, bestehend aus einer Packung TAE-Puffer (Ambion, USA), in 1 L Aqua bidest gelöst und nach 1:25 Verdünnung mit Aqua bidest verwendet.

2.2.4 1x Natrium-Borat (SB)-Puffer

Für die Herstellung des 1x SB-Puffers wurde der 20x SB-Stock verwendet, der aus 38,137 g Disodiumtetraborat (Borax), 950 ml Aqua bidest und 22 g Borsäure bestand. Dabei sollte der pH-Wert auf 8 eingestellt werden. Zu dieser Mischung wurde dann 1 L Aqua bidest hinzugefügt. Von dem entstandenen 20x SB-Stock wurden 50 ml mit 1 L Aqua bidest für die 1x SB-Puffer-Lösung benutzt.

2.2.5 1x Phosphate Buffered Saline (PBS)

Es wurde ein 10x PBS-Konzentrat mit 1 L Aqua bidest mit 80 g NaCl (Endkonzentration von 137 mM), 11,5 g (8,1 mM) Na₂HPO₄ und 2,0 g (1,47 mM) KH₂PO₄ zur PBS-Pufferherstellung angesetzt, der pH-Wert wurde mittels pH-Meter auf 7,4 eingestellt.

2.2.6 Agarosegelherstellung

Es wurden sowohl SB-Agarose- als auch TAE-Agarose-Gele für die Elektrophorese verwendet. Das 1%ige SB-Gel bestand aus 100 ml SB-Puffer-Lösung und 1 g Agarose, die Mischung wurde in der Mikrowelle kurz aufgekocht und anschließend mit 7 µl gekühltem Ethiumbromid (10 mg/ml) versehen. Das TAE-Gel wurde auf dieselbe Weise hergestellt, wobei die TAE-Pufferlösung zum Einsatz kam. Zur Geltaschenbildung wurde ein Kamm in die noch warme flüssige Gellösung eingelegt, nach Auspolymerisierung konnte das Gel zur Elektrophorese verwendet werden.

2.2.7 DNA-Gelelektrophorese

Je nach hergestelltem Agarosegel wurde die Gelkammer mit 1x SB- oder 1x TAE-Puffer gefüllt, und das ausgehärtete Gel mit den entstandenen Kammern konnte beladen werden. Vor dem Auftragen wurden die Proben jeweils mit Loading Buffer, der aus 10 mM Tris (pH 7.6), 0,03 % Xylencyanol, 0,03 % Bromphenolblau, 60 % Glycerin und 60 mM EDTA bestand, versehen. Zum Größenvergleich diente ein 1 Kb Ladder Mix von Fermentas, der in die erste Kammer gegeben wurde. Zur Größenaufteilung liefen die Gele bei maximal 120 V (Volt) für 30–40 Minuten. Das in den Gelen enthaltene Ethidiumbromid diente zur Interkalation zwischen den DNA-Basenpaaren und ermöglichte hierdurch die Sichtbarmachung der DNA-Banden unter UV-Licht.

2.3 Verwendete Plasmide

Die eingesetzten Plasmide sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

pBABEpuro tTA	Konstrukt AG Pagenstecher
MIGRdeluxel TF-myc	Konstrukt AG Pagenstecher
pWZL-neo-Myr FLAG-Akt	Eilers et al., Würzburg
pBABE-Hygro	AG Stiewe, Marburg
pBABE-neo large	AG Stiewe, Marburg
pBABE-H2B-GFP	Eilers et al., Würzburg

Tab. 2.3: Verwendete Plasmide

Die vorhandene Genitacin- (G418) Resistenz im pWZL-neo-Myr FLAG-Akt wurde durch eine Hygromycin-Resistenz ersetzt. Um dies zu erreichen musste eine EcoRI-Schnittstelle von dem vorhandenen pBABE-neo large Plasmid in das pBABE-Hygro-Plasmid eingebracht und dann das pWZL-neo-Myr-FLAG-Akt zu pBABEhygro-myr-FLAG-AKT umkloniert werden.

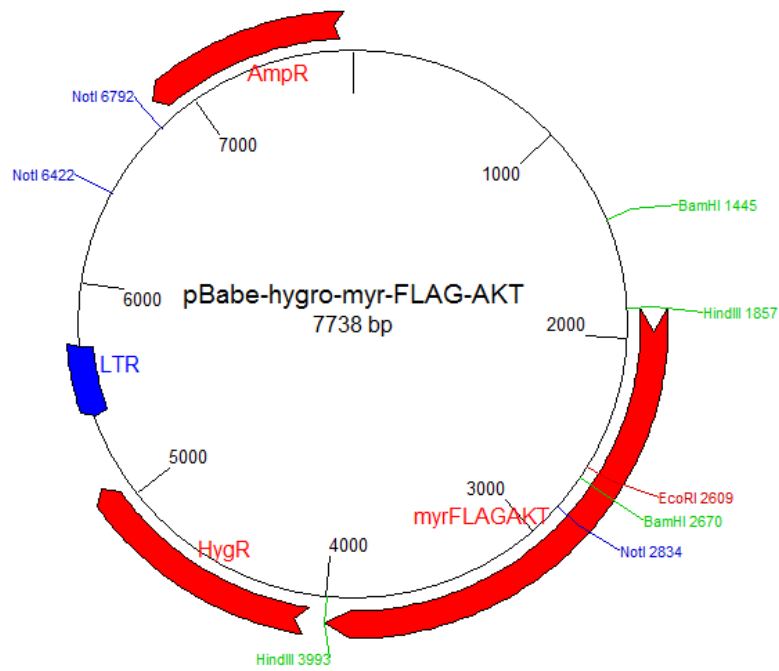


Abb. 2.3a: Plasmidkarte pBABEhygro-myr-FLAG-AKT

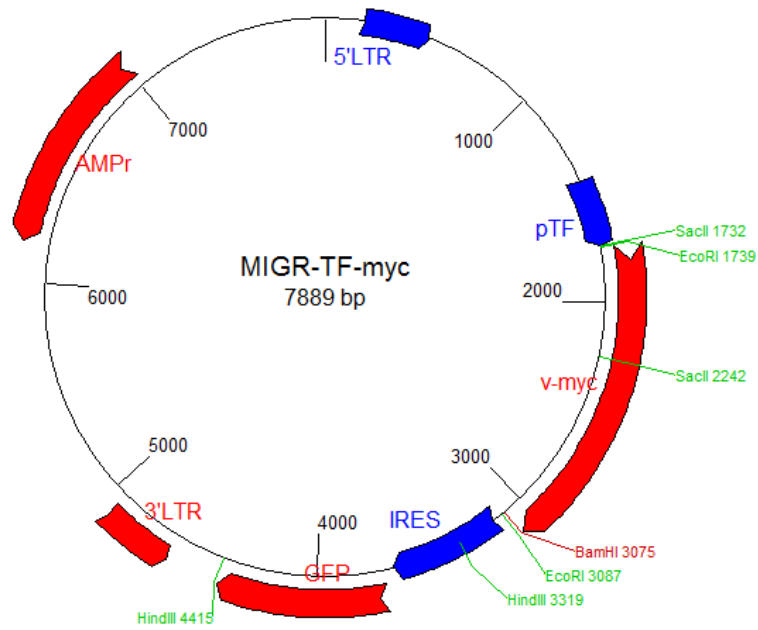


Abb. 2.3b: Plasmidkarte MIGRdeluxel TF-myc

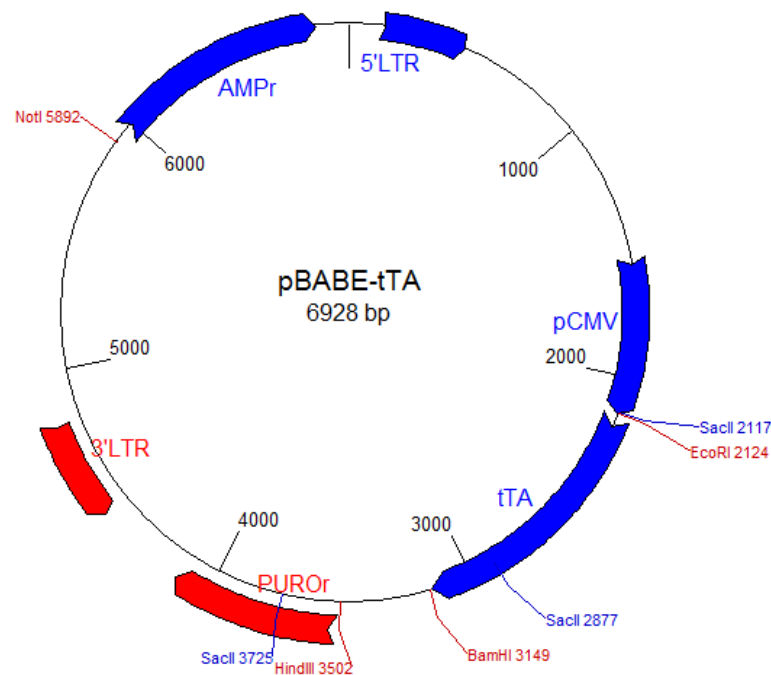


Abb. 2.3c: Plasmidkarte pBABEpuro tTA

2.4 Plasmidklonierung

Um rekombinante DNA zu erstellen, mussten zunächst kompatible Enden an Vektor und Insert mittels Restriktionsenzymen geschnitten werden. Die Plasmide pBABE-neo large und pBABE-Hygro wurden mittels der Restriktionsenzyme BamHI und HindIII geschnitten und die fehlende EcoRI Schnittstelle in das pBABE-Hygro-Plasmid ligiert.

2.4.1 Restriktionsverdau

Mit dem Restriktionsverdau wurden passende Plasmidstellen an Vektor und Insert erzeugt und die Klonierungsergebnisse überprüft.

Folgende Restriktionsenzyme wurden verwendet:

- BamHI (ER0051), Fermentas, St. Leon-Rot
- EcoRI (ER0271), Fermentas, St. Leon-Rot
- HindIII (ER0501), Fermentas, St. Leon-Rot

Folgende Puffer und alkalische Phosphatase wurden verwendet:

- Buffer BamHI, Fermentas, St. Leon-Rot
- Buffer R, Fermentas, St. Leon-Rot
- SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase), Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts

Restriktionsverdauansatz für pBABE-Hydro:		Restriktionsverdauansatz für pBABE-Neo-Large:	
MQ	14,5 µl	MQ	14,5 µl
Buffer BamHI	2,0 µl	Buffer BamHI	2,0 µl
DNA	0,5 µl	DNA	0,5 µl
BamHI	1,0 µl	BamHI	1,0 µl
HindIII	2,0 µl	HindIII	2,0 µl
= 20,0 µl Ansatz		= 20,0 µl Ansatz	

2.4.2 Gelaufreinigung

Nach dem Restriktionsverdau wurden die Plasmidbanden unter dem UV-Licht unter Verwendung einer Schutzbrille ausgeschnitten und das Gel nach Qiagen-Protokoll aufgereinigt. Hierzu wurde das Gelfragment gewichtsadaptiert mit Puffer QG aus dem Kit mit dreifachem Volumen in ein Tube bei 50 °C im Thermoblock inkubiert. Nach vollständiger Lösung entstand eine gelbe Färbung und es konnte Isopropanol hinzugegeben werden. Über eine Säule wurde dann mittels zweier weiterer Puffer die Plasmid-DNA gewonnen.

2.4.3 Ligation

Anschließend wurde mit der Formel für das Vektor-Insert-Verhältnis gerechnet:

$$((\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}) / \text{kb size of vector}) \times \text{molar ratio of insert} / \text{vector} = \text{ng of insert}$$

Die Ligation wurde wie folgt angesetzt:

MQ	14,2 µl
Buffer T4 Ligase	2,0 µl
Vektor pBABE-hygro	1,0 µl
Insert (aus pBABE-neo)	1,8 µl
Enzym T4 Ligase	1,0 µl
= 20,0 µl	

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Tag ein Verdau mit EcoRI durchgeführt. Danach wurden die Mini- und Maxi-Plasmidpräparationen nach Qiagen-Kit angeschlossen, siehe Kapitel 2.5.2.

Nach ausreichender Plasmidgewinnung des pBABE-hygro mit allen benötigten Schnittstellen erfolgte die Umklonierung des pWZL-neo-myr-FLAG-Akt-Plasmids mit Hilfe von EcoRI und HindIII nach dem gleichen Verfahren, siehe Kapitel 3.2.

Für den Ligationsansatz wurde der Vektor mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) behandelt, um ein Offenhalten der benötigten Schnittstelle nach Restriktionsverdau zu gewährleisten. Für den Ligationsansatz wurden molekularbiologische Empfehlungen verwendet (97).

2.5 Retrovirale Expressionsvektoren

Für die benötigten retroviralen Expressionsvektoren mussten das ligierte pBabe-Hygro-my-FLAG-Akt und die anderen Plasmide zunächst in einer ausreichenden Menge vorrätig sein.

2.5.1 Vervielfältigung

Für die Plasmidvermehrung mussten als erstes Z-kompetente Bakterien für die Transformation hergestellt werden, nach erfolgter Transformation konnten dann Mini- und Maxipräparationen der Plasmide stattfinden. Zur Durchführung dienten standardisierte Laborprotokolle und allgemeine Transformationshinweise (97).

2.5.1.1 Z-kompetente Bakterien

Für die Vervielfältigung der Plasmidkonstrukte wurden die Konstrukte in Z-kompetenten Bakterien des *E. coli* Stammes XL2 blue eingeschleust. Diese Bakterien wurden nach dem Standard-Protokoll des Z-Competent *E. coli* Transformation Kits (Zymo Research, USA) hergestellt und waren in 50 μ l Aliquots bei -80 °C für die Verwendung eingefroren.

2.5.1.2 Transformation

Für eine Transformation der Konstrukte in die XL2 blue Z-kompetenten Bakterien wurde ein Aliquot langsam auf Eis aufgetaut, und mit 1 μ l β -Mercaptoethanol (1.22 M), hergestellt aus 91,5 μ l Aqua ad injectabilia und 8,5 μ l des 14.3 M β -Mercaptoethanol, versetzt. Alle 2 Minuten wurde das Aliquot auf Eis vorsichtig gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation des β -Mercaptoethanol-Bakterien-Gemischs wurde der Ligationsansatz, ca. 5 μ l, je nach OD-Messung der einzelnen Konstrukte, dazugeben. Hierfür wurde ca. 300–330 ng DNA der einzelnen Plasmide eingesetzt. Nach erneutem Mischen des Aliquots erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend bekamen die Aliquots für 30 Sekunden einen Hitzeschock bei 42 °C ohne Rütteln im Thermoblock. Die so transformierten Bakterien erhielten nun 900 μ l des vorgewärmten NZY-Broth-Nährmediums. Dieses bestand aus 10 g Casein Hydrosylat (NZ amine), 5 g Hefe-Extrakt (Y), 5 g NaCl und 1 L MQ und wurde auf einen pH-Wert von 7,5 mittels 1 M NaOH eingestellt. Nach Autokla-

vierung dieser Lösung wurden vor Benutzung noch 12,5 ml autoklaviertes 1 M MgCl₂, 12,5 ml steril filtriertes 1 M MgSO₄ und 20 ml einer autoklavierten 20%igen Glukose dazu pipettiert und war als NZY-Broth-Nährmedium zur Verwendung bereit. Nachfolgend wurde die Bakterien-Plasmid-NZY-Broth-Lösung in ein großes Bakterien-Röhrchen überführt und für 1 Stunde bei 37 °C mit 225–250 rpm im Schüttler-Inkubator belassen. Nach der Inkubation wurde die Lösung mit einer sterilen Metallöse auf die Agarplatten im fraktionierten Verdünnungsausstrich aufgetragen. Die beimpften Agarplatten wurden dann bei 37 °C über Nacht bebrütet. Die Koloniebildung war am darauffolgenden Tag sichtbar und die einzelnen Kolonien konnten „gepickt“ werden. Bei 4 °C wurden die Platten gelagert. Der beschriebene Transformationsvorgang erfolgte nach dem XL2 blue MRF Protokoll.

2.5.2 Plasmidpräparation

Für die Vorkulturen wurden 3–7 Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und auf die enthaltenen Konstrukte überprüft. Hierfür wurde zu den einzelnen gepickten Kolonien jeweils 5 ml NZY-Broth-Nährmedium und 15 µl Ampicillin (100 mg/ml) hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator mit 280 rpm inkubiert.

2.5.2.1 Mini-Plasmidpräparation

Für die Plasmidpräparationen wurden die Mini- und Maxi-Kits der Firma Qiagen benutzt und nach deren Standprotokoll vorgegangen.

Puffer 1: resuspension buffer

50 mM Tris pH 8,0	2,5 ml
10 mM EDTA	1,0 ml
100 µg/ml RNase	1,0 ml
MQ	ad 50 ml

Puffer 2: Lysis buffer

200 mM NaOH	5 ml 2 mNaOH
1 % SDS	5 ml
MQ	ad 50 ml

Puffer 3: neutralization buffer (Ziel-pH-Wert 5,5)

3 M Kaliumacetat (potassium acetate)	14,72 g
Eisessig	5,5 ml
MQ	ad 50 ml

Tab. 2.5.2.1: Verwendete Pufferlösungen bei Plasmidpräparation

Von der Vorkultur, die über Nacht inkubiert worden war, wurde 1 ml für 5 Minuten bei 3800 g unter Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes

wurden 300 µl des Puffer 1 aus dem Maxi Plasmid-Purification-Qiagen-Kit® hinzugefügt und das Pellet in Lösung gebracht. Die enthaltene RNase diente zur Verdauung freier RNA-Moleküle. Anschließend wurde Puffer 2 mit 300 µl zur Zelllyse verwendet, das enthaltene NaOH denaturierte Plasmid-DNA, chromosomale DNA und Proteine. Das Tube wurde hierbei vorsichtig invertiert, um eine Durchmischung der Substanzen zu erreichen, ohne die genomische DNA zu fragmentieren bzw. von den Zellwänden zu scheitern. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 300 µl kaltem Puffer 3 zur Neutralisierung. Die Inkubation für weitere 5 Minuten erfolgte auf Eis. Die denaturierten Proteine und die genomische DNA präzipitierten. Bei einer Zentrifugation mit 20800 g bei 4 °C für 15 Minuten trennten sich die Plasmid- und die genomische DNA. Nach Überführen des Überstandes und Fällung der Plasmid-DNA mit 600 µl Isopropanol durch Vortexen für 10 Minuten, wurde das entstandene Plasmid-DNA-Pellet vom Überstand nach 30-minütiger Inkubationszeit auf Trockeneis und erneutem Zentrifugieren befreit und mit 300 µl 80%igem Ethanol gewaschen. Danach trocknete das Pellet im Thermoblock bei 37 °C und wurde danach mit 25 µl des 10 mM Tris pH 8,35 wieder gelöst.

Die resultierenden Plasmidansätze wurden anschließend durch spezifische Restriktionsenzyme verdaut und die Banden über ein Agarosegel aufgetrennt, um zu kontrollieren, ob wirklich die gewünschte Plasmid-DNA vervielfältigt wurde, siehe Kapitel 3.2.

2.5.2.2 Maxi-Plasmidpräparation

Von der Mini-Vorkultur wurde dann für die Maxi-Präparation über Nacht wie folgt eine Vorkultur im Schüttelinkubator bei 37 °C und 300 rpm angesetzt:

NZY-Broth (siehe Transformation)	150 ml
MgCl ₂ (1M)	1,875 ml
MgSO ₄ (1M)	1,875 ml
Glukose (20 %)	3,0 ml
Ampicillin (100mg/ml)	150 µl
Mini-Vorkultur	1,2 ml

Am nächsten Tag wurde die Vorkultur in einen Zentrifugationsbehälter überführt und für 20 Minuten mit 3220 g bei 4 °C abzentrifugiert, das entstandene Pellet wurde nach Standardprotokoll des Maxi Plasmid-Purifications-Kit (Qiagen, Hilden) präpariert und extrahiert. Nach den einzelnen Fällungs- und Waschschritten wurde das entstandene Plasmid-

DNA-Pellet getrocknet und bei 37 °C im Thermomixer in 150 µl 10 mTris (pH 8,35) resuspendiert. Anschließend erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung.

2.5.2.3 Optische Dichte- (OD)-Messung

Zur Bestimmung des DNA-Lösungsgehalts wurde die optische Dichte (OD) mit Hilfe eines Photometers gemessen. Bei diesem Verfahren wird die Extinktion von Lösungen bestimmt und mit dem Extinktionskoeffizienten kann dann die Konzentration ermittelt werden. Zur weiteren Verwendung der präparierten Plasmid-DNA wurde die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt und das Aliquot bei -20 °C gelagert.

Die Plasmidpräparationen wurden für folgende Plasmide durchgeführt:

Plasmide:	Resistenzen:
pBABEpuro tTA	Puromycinresistenz
MIGRdeluxel TF-myc	Markierung mit Green fluorescent protein (GFP)
pBABE-Hygro-Myr FLAG-Akt	Hygromycinresistenz
pBABE-H2B-GFP	Markierung mit GFP

2.6 Zellkultur

2.6.1 Materialien und Methoden für die Zellkultur

2.6.1.1 Verwendete Verbrauchsmaterialien und Substanzen

Für die Zellkultur wurden folgende in der Tabelle aufgeführten Materialien verwendet.

Material	Firmenname, Firmensitz
6-Well Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Eppendorf Tubes 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Feather Disposable Scalpel	Feather Safety Razor Co, Osaka, Japan
Nunc (Einfrierröhrchen) 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Skalpelklingen steril	Schreiber GmbH, Fridingen
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter 0,45 µm	Merck Millipore, Darmstadt
Zellkulturschalen Cellstar 10 cm	Greiner bio-one, Frickenhausen

Substanz	Firmenname, Firmensitz
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (+4,5 g/L D-Glucose)	Gibco, Eggenstein
DNase I	Roche, Grenzach
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, Steinheim
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 1x	Gibco, Eggenstein
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FBS/FCS (Fetal Bovine Serum)	PAA, Pasching, Österreich
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) 1x	Gibco, Eggenstein
Hygromycin	InvivoGen, Toulouse
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe
Objektträger	R. Langenbrink, Emmendingen
Objektträger Super Frost	R. Langenbrink, Emmendingen
PBS pH 7,4 (Phosphat Buffered Saline) 10x	Gibco, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Polybrene	Sigma-Aldrich, Steinheim
Puromycin	InvivoGen, Toulouse
Pursept	Schülke und Mayr GmbH, Norderstedt
Salzsäure 1 N	Sigma-Aldrich, Steinheim
Terralin Liquid	Schülke und Mayr GmbH, Norderstedt
Trypsin 2,5 %	Gibco, Eggenstein

Tab.2.6.1.1: Verwendete Materialien und Substanzen für die Zellkultur

2.6.1.2 Geräte und Sterilisation

Gerät (Bezeichnung)	Firmenname, Firmensitz
Absaugsystem (Model AC)	HLC-Biotech, Bovenden
Binokular (Model S72-ILST)	Olympus, Tokyo
Digitale Farbkamera (DFC 480)	Leica Microsystems, Wetzlar
Inkubator (Steri-Cult 200 Incubator)	Belotec, Göttingen
Inverses Phasenkontrastmikroskop (DMI 6000B/CTR-6000)	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühlzentrifuge (Centrifuge 5810-R)	Eppendorf, Hamburg
Mehrfachfluoreszenzmikroskop (DMR/ebq)	Leica Microsystems, Wetzlar
Pipetten P2, P20, P100, P200, P1000 (Pipetman)	Gilson, Villers-le-Bel
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	Integra Biosciences, Fernwald
Sterilisator (Steri 250)	Simon Keller AG, Burgdorf -CH
Sterilwerkbank (Steag-Sicherheitsbank	Steag-Laminarflow-Prozesstechnik, Pful-

Laminarflow)	lingen
Temperaturregler (Kelvitron A)	Heraeus Instruments, Wehrheim
Wasserbad (julabo SW-20C)	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zellzählkammer (Rosenthal-Fuchs-Kammer)	W. Schreck, Hofheim
Zentrifuge (Labofuge Ae)	Heraeus Sepatech, Hanau

Tab.2.6.1.2: Geräte und Sterilisation in der Zellkultur

Alle Verbrauchsmaterialien wurden entweder steril vom Hersteller verwendet oder bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Die verwendeten Lösungen wurden ebenfalls entweder bei 121 °C für 30 Minuten autoklaviert oder steril filtriert (0,45 µm Filter). Die Sterilwerkbank wurde vor Benutzung mit 1 % Pursept® (Schülke) desinfiziert, jegliche benutzte Arbeitsmaterialien wurden vor Verwendung auf der Arbeitsfläche mit Terralin Liquid® (Schülke) ebenfalls desinfiziert.

2.6.2 Versuchstiere

Die primären Astrozyten, die zu Tumorzellen differenziert werden sollten, mussten für unsere Experimente defizient für den Tumorsuppressor p53 sein.

Für knock-out-Mäuse muss über einen Vektor eine Genmutation für das zu inaktivierende Gen durch homologe Rekombination in das Erbgut embryonaler Stammzellen eingebracht werden. Durch diese Keimbahnmutation wird die Gentranskription gestört und etwa 40 % der Kodierkapazität von p53 entfallen (121). Durch diese Störung wird die Synthese von p53-Protein gehemmt. Nach Ausselektion werden die so veränderten Stammzellen in eine Maus über eine Blastozyste implantiert. Durch die biologische Kreuzung mit einer Wildtypmaus entsteht eine heterozygote Nachfolgegeneration. Die so generierten Tiere sind ebenfalls homozygot lebensfähig, zeigen jedoch eine deutliche Anfälligkeit für die Entstehung von Tumoren (63, 138). Wir verwendeten für unsere Experimente solche homozygoten p53-knock-out-Mäuse.

2.6.3 Genotypisierung der Versuchstiere mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur genetischen Identifikation von p53-knock-out-Tieren wurde das KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit der Firma PEQLAB verwendet. Dabei wurde nach dem DNA-Extraktions-, sowie dem DNA-Amplifikationsprotokoll unter Verwendung der Oligonukleotide der Firma Apar Bioscience (107, 108 und 109 siehe Primer) vorgegangen. Die im KAPA2G-Fast-Hot-Start-Protokoll empfohlenen Parameter wurden unter dem Programmnamen Programmp53HOT etabliert und durchgeführt. Die zu untersuchenden Mäuse waren zwischen 0 und 2 Tagen alt, sie wurden nummeriert und eine ca. 0,1 cm große Schwanzbiopsie wurde zur genetischen Untersuchung entnommen.

Um eine genetische Unterscheidung treffen zu können, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung spezifischer Genomsequenzen der Versuchstiere verwendet.

2.6.3.1 DNA Extraktionsprotokoll

Die Extraktion erfolgte in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube:

Bestandteile	Für 100µl Reaktionsvolumen	Endkonzentration
PCR-Water: MQ-Wasser	88 µl	
10x KAPA Express Extract Buffer	10 µl	1x
1 U/ µl KAPA Express Extract Enzyme	2 µl	2 U/rxn
Mouse tissue: tail	As required	2 mm section

Das hergestellte Lyse-Gemisch wurde dann für 10 Minuten im Thermocycler bei 75 °C inkubiert. Während dieses Schrittes wurden die Zellen lysiert und die Proteine und Kerne denaturierten, so dass nur noch die DNA zurückbleiben konnte. Zur Inaktivierung der KAPA Express Extract Protease erfolgte eine weitere Inkubation für 5 min bei 95 °C. Anschließend wurde die DNA-Suspension gevortext und zentrifugiert, nach Absaugen des Überstandes, blieb das DNA-Pellet im Tube.

2.6.3.2 DNA-Amplifizierungsprotokoll

Bestandteile	Für 25 µl Reaktionsvolumen	Endkonzentration
PCR-Water: MQ-Wasser	5.25 µl	
2x KAPA2G Fast (HotStart) Genotyping Mix with dye (enthält: 1.5 mM MgCl ₂)	12.5 µl	1x
Primer 107	1.25 µl	0.5 µM
Primer 108	1.25 µl	0.5 µM
Primer 109	1.25 µl	0.5 µM
DMSO 50 % (Dimethylsulfoxid)	2.5 µl	0.1 µM
Template (DNA-Pellet 1:10 dilution)	1 µl	

Der PCR-Mix wurde dann nach PCR-cycling-Protokoll unter Programmp53HOT etabliert.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initial denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	
Annealing	60 °C	15 sec	40
Extension	72 °C	15 sec/kb	
Final extension	72 °C	1 min/kb	1

Anschließend wurden die DNA-Banden mittels DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die so bestimmten p53-knock-out-Mäuse wurden zur Herstellung primärer Astrozytenkulturen verwendet.

2.6.3.3 Primer

Für die Genotypisierung wurden folgende Oligonukleotide als Primer eingesetzt, die Sequenz erfolgte jedes Mal vom 5'- zum 3'-Ende:

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

Zur Amplifizierung des Wildtypallels (310 Basenpaare) dienten Primer Nr. 107 (107_Trp53wt_s) und Nr. 109 (109_Trp53_as). Die knock-out-Bande mit 451 Basenpaaren wurde mittels Primer Nr. 108 (108_PGKpolyA_p53KO_s) detektiert.

2.6.4 Primäre Astrozytenkulturen

Für die primären Astrozytenkulturen wurden neugeborene p53-knock-out-Mäuse, die maximal 1 Tag alt waren, verwendet.

2.6.4.1 Kulturmedium

Das verwendete Zellkulturmedium bestand aus 500 ml DMEM, 10 % (50 ml) FBS (Fetales Bovines Serum) und 1 % (5 ml) Penicillin/Streptomycin. Vor Verwendung des Kulturmediums wurde es im Wasserbad bei 37 °C erwärmt.

2.6.4.2 Stock solution

Die Stock solution wurde aus einem 2,5%igen Trypsin- und 1%igem DNase I Gemisch („TD-Gemisch“) mit HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) hergestellt. Hierfür wurden

300 µl TD-Gemisch auf 4,5 ml HBSS aufgefüllt. Die Endkonzentrationen lagen bei 0,15 % Trypsin und 0,0074 Units DNase I.

2.6.4.3 Trituration solution

Die Trituration solution enthielt 10 mg/ml DNase I (80 µl), die auf 8 ml DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) aufgefüllt wurde.

Nach Identifizierung der p53-knock-out-Mäuse wurden primäre Astrozytenkulturen hergestellt. Es wurden 0–1 Tag alte Tiere mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 eingesetzt. Die Tiere stammten alle aus der spezifizierten Pathogen-freien (SPF)-Einrichtung des Biomedizinischen Forschungszentrums der Universität Marburg.

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte wurden in steriler Umgebung unter ständigem vertikal Flow und mit autoklavierten und während der Präparation sterilisierten Besteck durchgeführt.

Die p53-knock-out-Jungtiere wurden mit Isofluran (Baxter, Unterschleißheim) narkotisiert, Kopf und Hals wurden desinfiziert und das Tier anschließend dekapitiert. Zur Fixierung des abgetrennten Kopfes diente eine gebogene Pinzette, mit einer kleinen Schere wurde die Kopfhaut von caudal nach rostral in der Sagittalebene eröffnet und die Kalotte frei gelegt. Diese wurden dann vom Foramen magnum ausgehend nach rostral aufgeschnitten und entfernt. Das Großhirn wurde in eiskaltes 1x HBSS überführt und unter ständiger Kühlung von den Meningen frei präpariert. Dies geschah unter einer Stereolupe mit zwei feinen Pinzetten und diente zur Verhinderung einer Fibroblastenkontamination der späteren Astrozytenkulturen. Die befreiten Kortexhälften wurden in eine zweite Kulturschale überführt. Unter einer sterilen Werkbank wurden mittels sterilem Skapell die Großhirnhemisphären zerkleinert und die Fragmente durch ein Sieb mit 40 µm großen Maschen ausgestrichen. Die entstandene Zellmasse wurde anschließend mit 600 µl Stock solution mit Hilfe einer 1ml-serologischen Pipette homogenisiert und für 8 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Trypsinierung mit 5 ml Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1300 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet konnte in 1 ml Trituration solution resuspendiert werden. Nach erneuter Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Zelllösung erneut zentrifugiert (5 min, 1300 g). Das so entstandene Zellpellet wurde vom Überstand befreit und mit 10 ml DMEM in einer 10 cm großen durchmessenden Kulturschale in Lösung gebracht und ausplattiert. Die Zellen verblieben für 48 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Danach wurden die gesetzten Zellen vorsichtig mit DPBS abgewaschen und mit neuem Kulturmedium bedeckt. Alle 2–4 Tage wurden die Zellen gewaschen und

das Medium wurde gewechselt. Nach ca. 7–10 Tagen erreichten die Zellen in der 10 cm Kulturschale eine Konfluenz von 70–80 %.

2.6.5 Virusherstellung

Um die Expressionsvektoren in die murinen p53-knock-out-Astrozyten transduzieren zu können, wurden Vektoren benötigt. Hierzu dienten Zellen der ekotropen Verpackungszelllinie Phoenix-ECO, diese stammten von der humanen, embryonalen Nierenzelllinie 293T ab. Zur Verwendung als retroviraler Expressionsvektor wurden spezifische Genfunktionen für die Virusvermehrung oder die Assemblierung des Virus entfernt. Durch die Transfektion der Vektoren mit den jeweiligen Konstrukten konnten die fehlenden Proteine zur Verpackung exprimiert und verwendet werden. Somit war die Herstellung eines retroviralen Virus möglich, der sich nicht selbst replizieren konnte, jedoch zur Infektion muriner Zellen führte. Diese Virusherstellung mittels Phoenixzellen war in vorangegangenen Studien durch das Nolan-Labor etabliert worden (51, 134).

2.6.5.1 Phoenixzellen

Die in Flüssigstickstoff gelagerten Phoenixzellaliquots, die ursprünglich freundlicherweise von der AG Stiewe, Marburg zur Verfügung gestellt worden waren, wurden nach langsamen Auftauen im Wasserbad mit 10 ml Kulturmedium (DMEM mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin) in Lösung gebracht und bei 300 g 5 Minuten abzentrifugiert. Nach Resuspensionierung mit 10 ml neuem Kulturmedium wurden die Zellen in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser überführt und ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂, und 95 % Luftfeuchtigkeit. Nach 4–7 Tagen war eine Konfluenz von 60–80 % erreicht und die Zellen waren zur Virusherstellung bereit. Hierfür wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA gelöst und mit Kulturmedium abzentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet aus Phoenix-Zellen wurde dann erneut mit 1 ml reinem Kulturmedium gelöst und in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt. Anschließend wurden 2x10⁶ Zellen ausplattiert und erreichten innerhalb von 24 Stunden die gewünschte Konfluenz von 70–80 %. 4 Stunden vor der Transfektion wurde erneut das Kulturmedium gewechselt. Als Methode für den Transfektionsprozess diente die Calciumphosphat-Präzipitation. Die Plasmide wurden mit CaCl₂ in einem Phosphatpuffer gemischt und lagerten sich zu unlöslichen Komplexen zusammen. Durch Adhäsion und Endozytose wurden die Komplexe aufgenommen. Jede Kulturschale der Phoenix-Zellen wurde mit nur einem Expressionsvektor transfiziert. Es wurden jeweils Ansatz A und B hergestellt. Ansatz A bestand aus 1 ml 2x HBS stock solution:

50 ml 2x HBS stock solution (pH 7,05)	Endkonzentrationen
2,8 ml mM NaCl 5M	280 mM NaCl
75 μ l Na ₂ HPO ₄ 1M	1,5 mM Na ₂ HPO ₄
2,5 ml HEPES 1 M	50 mM HEPES
40 ml Aqua bidest	
pH-Messung, bei Bedarf auf 7,05 mit NaOH 1M einstellen	
Ad 50 ml Aqua bidest, Sterile Filtration und bei 4 °C lagern	

Ansatz A wurde in einem 15 ml Falcon gefüllt. Ansatz B wurde wie folgt hergestellt:

Ansatz B

1,5 ml Eppendorf-Tube:

100 μ l CaCl₂ 2,5 M

40 μ l DNA-Maxipräparation (jeweils vom gewünschten Plasmid c = 1 μ l/ μ g)

860 μ l Aqua ad iniectabilia

Ansatz A wurde vorsichtig gevortext, während dieses Vorganges wurde Ansatz B tropfenweise in Ansatz A pipettiert. Die vermischten Ansätze wurden anschließend Tropfen für Tropfen vorsichtig auf die Phoenix-Zellen pipettiert. 15 Stunden nach Transfektion wurde ein Wechsel des Kulturmediums durchgeführt, hierbei wurde das Medium (7 ml) vorsichtig am Rand der Kulturschale auf die Zellen geben. Die Phoenix-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren transfiziert, die im Kapitel 2.3 aufgeführt sind. Diese Methodik wurde in vielen vorangegangenen Arbeiten bereits etabliert (28, 134). Als positive Erfolgskontrolle diente 24 Stunden nach der Transfektion die grüne Fluoreszenz einer Phoenix-Zell-Kulturschale mit pBABE-H2B-GFP. Dieses Plasmid wurde bei jeder Transfektion mitgemacht und zeigte bei einer Wellenlänge von 395 nm die grün fluoreszierenden Phoenix-ECO-Zellen.

2.6.5.2 Virusernte

Nach insgesamt 48 Stunden konnte der erste Virusüberstand geerntet werden. Hierzu wurde der retrovirale Überstand vorsichtig von den transfizierten Zellen abgenommen und über einen 0,45 μ m Filter steril filtriert. Als Virusernte-Tube dienten sogenannte Nunc-Tubes, die jeweils mit 1,5 ml filtrierter Virussuspension gefüllt wurden. Nach Abfüllung erfolgte das sofortige Schock-Frieren der Nunc-Tubes in flüssigem Stickstoff. Bei

-80 °C wurden die Virus-Tubes gelagert. Die transfizierten Phoenix-Zellen wurden erneut mit frischem Kulturmedium versehen. 72 h nach der Transfektion erfolgte die zweite Virusernte.

2.6.6 Retrovirale Infektion (Transduktion) der p53-knock-out-Astrozyten

Die p53-knock-out-Astrozyten enthielten entweder nacheinander folgende Konstrukte pBABE-Hygro-Myr FLAG-Akt, pBABEpuro tTA und MIGRdeluxel TF-myc, oder es wurden nur p53-knock-out mit Akt oder p53-knock-out mit c-Myc mit Promotor hergestellt. Die Transduktion durch die Retroviren wurde bei einer Konfluenz der p53-knock-out-Astrozyten von 60–70 % begonnen, es wurden nur Zellen der 0. oder 1. Passage zur Transduktion verwendet. Der zuvor gewonnene und bei -80 °C gelagerte Virusüberstand wurde bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und mit 5 µl Polybrene (4 mg/ml) versehen. Die Polybrene dienten hierbei zur Erleichterung einer erfolgreichen Transduktion durch die Verringerung der elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den Zellmembranen und der DNA. Die Polybrene-Virus-Lösung wurde dann mit 2 ml frischem Kulturmedium versetzt. Das Kulturmedium auf den Astrozyten wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 1xDPBS gewaschen. Anschließend wurde die Polybrene-Virus-Kulturmedium-Mischung (5 ml) langsam auf die Astrozyten verteilt. 15 h nach der Infektion erhielten die transduzierten Zellen weitere 5ml frisches Kulturmedium, um die toxische Wirkung der Polybrene zu reduzieren. Nach weiteren 24 h wurde das virushaltige Medium abgesaugt und die Zellen erhielten 10 ml frisches Kulturmedium mit dem jeweiligen ausselektionierenden Antibiotikum.

2.6.7 Ausselektionierung mittels Antibiotika

Die Ausselektionierung der transduzierten Astrozyten erfolgte hierbei mit Hygromycin 50 µg/ml (InvivoGen) für die *Akt*-transduzierten Zellen und mit Puromycin 1 µg/ml (InvivoGen) für die tTA-transduzierten Zellen. Da das Konstrukt MIGRdeluxel TF-myc keine ausselektionierende Antibiotikumresistenz erhielt, wurde der Transduktionserfolg optisch anhand der GFP-Fluoreszenz kontrolliert. Alle 48 h wurde das Kulturmedium mit den jeweilig benötigten Antibiotika gewechselt. Nach ca. 3 Tagen war der Transduktionserfolg zu sehen und die ausselektionierten Zellen wiesen eine Konfluenz von 30–60 % auf. Die Transduktionen erfolgten bei Zellen mit mehreren Konstrukten stets nacheinander. Vorversuche mit gleichzeitiger Transduktion mit verschiedenen Vektoren enthaltenden Viren zeigten keine brauchbaren Transduktionsraten. Bei jedem Transduktionszyklus wurde als Kontrolle eine Transduktion mit pBABE-H2B-GFP enthaltenem

Retrovirus als Kontrolle mitgemacht. Bereits 15 h nach der Transduktion war eine Fluoreszenz bei Erfolg sichtbar. Die Kontrollzellplatte enthielt hierbei die gleichen Zellen.

2.6.8 Beobachtung der retroviral transduzierten Astrozyten

Die transduzierten Zellen wurden über mehrere Wochen und Monate beobachtet. Nach erfolgreicher Transduktion mit allen 3 Konstrukten und unter ständiger antibiotischer Ausselektion war nach ca. 1 Woche eine Konfluenz von 60–70 % erreicht. Die MIGRdeluxel TF-myc transduzierten Zellen erhielten alle 48 h nach Transduktion frisches Doxycyclin 1,0 µg/ml (Sigma), das nicht zur Ausselektion, sondern zur Proliferations-supprimierung diente. Die transduzierten Zellen einer Kulturschale, somit die Zellen eines Mausindividuum, wurden dann in zwei Gruppen geteilt, eine mit Doxycyclin behandelte Gruppe und eine ohne Doxycyclin behandelte Gruppe. Die Gruppe ohne Doxycyclin erhielt ab Tag 0 kein Tetracyclin mehr und war somit ohne Proliferationsbremse.

2.6.8.1 In-vitro-Versuche: Zellauszählungen

Es wurden sowohl Zellen mit allen drei Konstrukten: *myr-Akt*, pBabe-tTa und TF-myc (im Weiteren als AToM-Zellen bezeichnet) sowie auch nur die pBabe-tTa mit TF-myc (im Weiteren als ToM-Zellen bezeichnet) ausgezählt. Die Zählung begann ca. drei Wochen nach kompletter Transduktion aller Zellen mit den jeweiligen Konstrukten. Die Zellgruppe ohne Doxycyclin und die mit Doxycyclin behandelte Zellgruppe wurden anhand von six well Platten alle vier Tage ausgezählt. Die einzelnen Wells erhielten immer wieder aus derselben Population eine definierte Zellzahl und es konnte somit ein Proliferationsverhalten der Zellen über die Zeit beobachtet werden. Um beurteilen zu können, ob die Zellproliferation durch ein enthaltenes Plasmid beeinflusst wird, wurden auch nur Zellen mit GFP, Akt oder ohne Konstrukt p53-knock-out-Zellen ausgezählt. Das Auszählen wurde mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer durchgeführt.

2.6.8.2 Statistische Auswertung der in-vitro-Versuche

Die ausgerechneten Zellzahlen wurden dann erfasst und mittels Excel statistisch ausgewertet. Für alle Versuchsreihen wurden Mittelwerte, Varianzen und Standardabweichungen berechnet. Die Standardabweichungen sind in allen Grafiken im Kapitel 3.6 mit dargestellt. Beim Vergleich der Zellproliferationsraten zweier Zellgruppen mit jeweils 6 Beobachtungen (Verwendung von six well Platten) wurden die Proliferationsraten 4 Tage später nach Einschalten der „Doxycyclin-Bremse“ zwischen beiden Zellgruppen statistisch bewertet. Hierbei wurde der t-Test Typ 3 (Welch-Test) für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben und nicht erforderliche gleiche Varianzen eingesetzt. Wenn zum Ausgangszeitpunkt die Proliferationsraten der zwei zu vergleichenden Zellreihen

deutlich unterschiedlich waren, konnte keine statistische Analyse der Unterschiede zwischen den beiden Zellreihen vorgenommen werden. Hier wurde in einigen Fällen der t-Test für abhängige Stichproben zum Vergleich der Zellproliferationsraten nur bei den Doxycyclin-regulierbaren Zellen zwischen zwei Zeitpunkten eingesetzt.

2.7 In-vivo-Versuche

Nachdem wir eine erfolgreiche Proliferationsregulation *in vitro* nachweisen konnten, die anhand der Zellzählversuche erfasst wurde, wurden die Zellen für Stereotaktische Implantationen in das murine Gehirn verwendet. Die verschiedenen transduzierten Zellen wurden Wildtyp-Mäusen implantiert.

2.7.1 Vorbereitung der Stereotaxie

Als Versuchstiere dienten hierbei Black 6 (BL6) Wildtyp Mäuse, die ca. 8 Wochen alt waren. Nachdem die ausgezählten Zellen 12 Tage ohne Doxycyclin ungebremst wachsen konnten, wurde die Zellkulturplatte mit PBS gespült und die Zellen vorsichtig mit 0,05 % Trypsin/EDTA abgelöst. Nach 5 min Abzentrifugation bei 300 g und erneuter Zellpelletlösung mit frischem Kulturmedium erfolgte die Zellauszählung mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer, nach erneuter zweimaliger Zentrifugation sollten als Endkonzentration in frischem PBS jeweils 10000 Zellen/ μ L enthalten sein. Pro stereotaktischer Operation wurden jeweils 80.000 Zellen eingesetzt. Die so vorbereiteten Zellen wurden auf Eis in einem Eppendorf-Tube gekühlt.

2.7.2 Durchführung der Stereotaxie

Nachdem das Versuchstier mittels Sauerstoff-Isofluran-Gemisch narkotisiert wurde, erfolgte die Fixierung an den sogenannten ear bars beidseits in der Stereotaxieeinheit. Die Schnauze der Maus lag während der gesamten Operation in der Narkosemaske. Die Atemfrequenz und Atemtiefe zeigten die Narkosetiefe an. Nach Kopffaarentfernung mittels eines Rasierers wurden die Schmerzreflexe der Maus durch Kneifen in die Hinterpfoten getestet. Die Isoflurankonzentration variierte je nach gewünschter Narkosetiefe der Tiere zwischen 1 und 3 %. Nach Befeuchtung der Augenlider mittels 0,9 % NaCl, um ein Austrocknen der Augen durch den Exophthalmus unter tiefer Narkotisierung während der Operation zu verhindern, erfolgte nach Reflexprüfung der invasive Eingriff. Die Kopfhaut wurde mit 75 % Ethanol desinfiziert und die Haut wurde von caudal nach rostral mittels chirurgischer Schere eröffnet. Alle verwendeten Operationsgeräte waren zuvor autoklaviert worden. Die eröffnete Kopfhaut wurde mittels Wundhaken nach lateral ge-

zogen und die Kalotte wurde mit den Suturen sagittalis und coronalis sichtbar. Die auf Eis gelagerten Zellen wurden mittels 200 μ l Pipette resuspendiert und in eine 10 μ l Hamiltonspritze aufgezogen. Hierbei war darauf zu achten, dass keine Luft in die Hamiltonpipette gelangte. Der Spritzenstempel der Hamiltonpipette wurde vorgeschoben und der erste Tropfen wurde verworfen. Nach dieser Präparation der Spritze, wurde die Hamiltonpipette in der Stereotaxieeinheit befestigt. Zur gezielten Injektion der Zellen wurde der Nullpunkt auf das Bregma, der Punkt des Zusammenlaufens der Sutura coronalis und Sutura sagittalis, gesetzt. Die Zellen sollten in das rechte Corpus Striatum injiziert werden, die Stereotaxieeinheit wurde mit der befestigten Hamiltonspritze hierfür wie folgt vom Bregma ausgerichtet:

X-Achse	2,0 mm (lateral dexter)
Y-Achse	0,6 mm (rostral)
Z-Achse	3,0 mm + 0,3 mm Tasche (ab Dura mater gerechnet)

Nach Einstellung auf das Bregma erfolgte die Koordinatenablesung, die jeweiligen genauen Koordinaten wurden im Operationsprotokoll der jeweiligen Maus festgehalten. Die Zielkoordinaten der Hamiltonspritze wurden berechnet und eingestellt. Nach Markierung mittels Farbstift erfolgte an der Kalotte die Bohrung mittels Stereotaxiebohrer (Aesculap, Tuttlingen). Es wurde so gebohrt, dass eine flache Kuhle entstand, in deren tiefsten Punkt gerade eben die Dura mater erreicht wurde. Nach Durchstechen dieser Schicht mit der Hamiltonkanüle erfolgte die Ermittlung der Z-Koordinate auf Dura-Ebene. Die Kanüle wurde 0,3 mm tiefer geschoben als die eigentliche Zielkoordinate im Corpus striatum, um eine kleine Zelltasche im Gehirn zu schaffen, danach wurde die Kanüle zurückgezogen und die Zellen wurden innerhalb einer Zeitspanne von 5 min langsam injiziert. Nach erfolgter Injektion wurde die Kanüle weitere 10 min intrakraniell im Zielgebiet belassen, damit die Zellen sich absetzen konnten. Danach erfolgte die vorsichtige Kanülenentnahme über weitere 5 min. Anschließend wurde die Kalotte steril abgetupft und die Wundränder der Kopfhaut adaptiert und mit sterilen Klammern verschlossen. Zur Markierung wurde die Maus mit einer Ohrstanze versehen und dann gewogen.

2.7.3 In-vivo-Versuchsreihen

Zur Etablierung des Systems verwendeten wir myr-*Akt*-transduzierte Zellen (Akt-Zellen), Astrozyten mit Tet-off-regulierbarer c-Myc-Produktion (ToM-Zellen) sowie myr-*Akt*-transduzierte Astrozyten mit zusätzlicher Tet-off-regulierbarer c-Myc-Produktion (AToM-Zellen). Es wurden vier in-vivo-Versuchsreihen mit den verschiedenen Zelltypen durchgeführt, diese sind in Tab. 2.7.3 dargestellt.

Versuchsreihe	I	II	III	IV
Anzahl der Versuchstiere (insgesamt 42)	12 Wild-Typ BL6-Mäuse	10 Wild-Typ BL6-Mäuse	12 Wild-Typ BL6-Mäuse	8 Wild-Typ BL6-Mäuse
Versuchstiere mit AToM-Zellen	8 Mäuse	8 Mäuse	8 Mäuse	8 Mäuse
Versuchstiere mit myr-Akt-Zellen	4 Mäuse	0 Mäuse	0 Mäuse	0 Mäuse
Versuchstiere mit ToM-Zellen	0 Mäuse	0 Mäuse	4 Mäuse	0 Mäuse
Versuchstiere ohne implantierte Zellen mit Doxycyclinbehandlung	0 Mäuse	2 Mäuse	0 Mäuse	0 Mäuse
Zellpassage der implantierten Zellen	10. Passage	8. Passage	8. Passage	5. Passage

Tab. 2.7.3: Übersicht der in-vivo-Versuchsreihen

Die erste Versuchsreihe diente als Vorversuch um festzustellen, ob die verwendeten Zellen in vivo Tumore induzieren und um den zeitlichen Versuchsablauf festzulegen. Aufgrund des in vitro beobachteten Wachstumsverhaltens entschieden wir uns, die regulierbaren AToM-Zellen vor der Stereotaxie 12 Tage ohne Doxycyclin im Medium zu kultivieren. Die myr-Akt-Zellen erhielten in diesem Zeitraum unverändert ihr Kulturmedium mit Hygromycin 50 µg/ml weiter, die ToM-Zellen bekamen nur Puromycin 1 µg/ml. Anschließend wurden die Zellen stereotaktisch implantiert. Um zu untersuchen, ob die Zellen in vivo Tumore induzieren, wurden die stereotaktisch operierten Mäuse in der ersten Versuchsreihe 10 Tage ohne Doxycyclinbehandlung gehalten. Anschließend sollten die 8 Versuchstiere mit implantierten AToM-Zellen in zwei Gruppen mit und ohne 2 mg/ml Doxycyclinrinkwassergabe für weitere 11 Tage beobachtet werden.

Aufgrund der in der ersten Versuchsreihe gemachten Beobachtungen, siehe Kapitel 3.7.1, wurde der zeitliche Versuchsablauf in den folgenden Versuchsreihen angepasst. Die Post-Stereotaxiezeit ohne Doxycyclin wurde bei den Mäusen mit implantierten AToM-Zellen auf 5 Tage verkürzt. Zudem erfolgte in der zweiten Versuchsreihe die Implantation einer früheren Zellpassage. Mit den Ergebnissen in der dritten Versuchsreihe entschieden wir uns in Versuchsreihe IV dann eine noch frühere Zellpassage zu verwenden. Insgesamt wurden 42 Versuchstiere für die Stereotaxie verwendet.

Somit erfolgte in den Versuchsreihen II bis IV nach einer Beobachtungszeit von 5 Tagen ohne Doxycyclinbehandlung dann für den einen Teil der stereotaktisch operierten Mäuse

die Doxycyclingabe über das Trinkwasser. Die anderen Versuchstiere erhielten reines Trinkwasser.

Die verwendete Doxycyclin-Konzentration betrug 2 mg/ml. Das Doxycyclin-haltige Trinkwasser wurde lichtgeschützt verpackt und alle 2 Tage gewechselt, um so die gewünschte Konzentration konstant zu halten und eine ausreichende Trinkmenge für die Mäuse zu gewährleisten.

Nach 21 Tagen wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt und dekapitiert. Die Gehirne wurden entnommen und Gehirnsektionen angefertigt. Die Gehirne der Versuchsreihen II und IV wurden vollständig aufbereitet und untersucht.

2.7.3.1 Gehirnsektionen

Nach 21 Tagen wurden die stereotaktisch operierten Mäuse mit Isofluran narkotisiert und nach Desinfizierung mit 75 % Ethanol dekapitiert. Nach Entfernen der Kopfhaut wurde die Kalotte ausgehend vom Foramen magnum eröffnet und das Gehirn mit einer Pinzette entnommen. Mit einer sterilen Rasierklinge wurde das freigelegte Gehirn frontal in 2 Hälften geteilt und jeweils auf vorgeschchnittene Korkuntersetzer mit TissueTec (Sakura Finetek, NL) aufgebracht. Das Gewebe wurde auf Korkplatten in Flüssigstickstoffgekühltem 2-Methylbutan (Merck, Darmstadt) schockgefroren. Nach dieser Prozedur konnten die gefrorenen Hirnhälften bei -80 °C gelagert werden und waren für die Anfertigung von Kryostatschnitten bereit.

Einige Gehirne wurden auch in Paraffin eingebettet, um weitere immunhistochemische Färbungen anzufertigen.

2.7.3.1.1 Kryostat- und Paraffinschnitte

Die bei -80 °C gelagerten gefrorenen Gehirnhälften wurden mittels Kryostat (Leica, Wetzlar) in 10 µm dicke Schnitte geschnitten. Bei -24 °C wurde das Gehirn für 30 bis 40 min im Kryostat äquilibriert und war anschließend für die Schnittpräparation bereit. Jeder Schnitt wurde auf einen Objektträger aufgezogen. Es wurden sowohl Superfrost Plus-Objektträger, die bei -80 °C zur weiteren Lagerung bereit standen, sowie unbeschichtete Objektträger, die zur direkten Hämatoxylin-Eosin-Färbung dienten, benutzt. Jeder 5. Schnitt der Gehirnhälften wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Für die Paraffinschnitte wurden die Hirnhälften in 4 % gepuffertem Formalin über Nacht fixiert (aus 37 % Formalin in PBS verdünnt). Danach wurden die Proben gewässert und

über eine aufsteigende Alkoholreihe (70, 96, 100 %) zum Xylol und anschließend in Paraffin im Autotechnicon zur Einbettung gebracht. Die Paraffinpräparate wurden mittels Leica Mikrotom geschnitten.

2.7.3.1.2 Hämatoxylin-Eosin (HE-)Färbung

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen wurde Hämalaun nach Mayer und 1 % Eosin verwendet.

Hämalaun nach Mayer	
Aqua bidest	1000 ml
Hämatoxylin	2 g
Natriumjodat	0,2 g
Aluminiumkaliumsulfat	50 g

Anschließend wurde die Lösung gut geschüttelt, es entstand eine blauviolette Farbe und die Lösung wurde für 24 Stunden stehen gelassen. Danach wurden 50 g Chlorhydrat und 1 g Zitronensäure dazu gegeben.

1 % Eosin	
Aqua bidest	1000 ml
Eosin	10 g
Essigsäure	10 Tropfen

Die Kryostatschnitte wurden direkt nach dem Schneiden im Kryostat mit 1 % PBS und dann mit Aqua bidest gewaschen. Danach wurden sie 5 Minuten lang in Hämalaun nach Mayer getaucht, anschließend erfolgte unter fließendem Leitungswasser 10 Minuten lang das Bläuen der Zellkerne. Als nächstes kamen die Kryostatschnitte für weitere 3 Minuten in 1 % Eosin und wurden mit Aqua bidest gespült. Das Zytoplasma stellte sich rötlich dar. Zur Entwässerung durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol (insgesamt 4 Minuten 70 %, 10 Minuten 96 %, 10 Minuten 100 % Ethanol, 10 Minuten Xylol). Die präparierten Schnitte wurden mittels Corbit Balsam mit einem Deckglas versehen und waren zur mikroskopischen Ansicht bereit. Die Paraffinschnitte wurden vor der HE-Färbung über zwei Xylolschritte und eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und dann wie oben beschrieben behandelt.

2.7.3.2 Tumolvolumenmessung

Um die Anzahl der Versuchstiere gering zu halten (129), erfolgte die Bestimmung anhand von HE-Schnitten, hierzu wurden die Hirnpräparate komplett aufgeschnitten. Die Tumorfleichen in den Schnitten wurden mit Hilfe eines Bamboo Tabs und dem Programm Image J ausgemessen. Aus den Tumorfleichen in den Schnitten und der Schnittdicke wurden Tumorteilvolumen bestimmt, die zum Gesamttumolvolumen aufsummiert wurden.

2.7.4 Magnetresonanztomographie (MRT)

Als post-stereotaktische Kontrolle und zum Verlauf des Tumorwachstums wurden die Mäuse 2 Tage nach Operation und 2 Tage vor Beendigung des Experimentes mit Isofluran narkotisiert und in ein 3-Tesla-Kleintier-MRT zur Bildaufnahme gebracht. Eine Bildgebung bei jeder Versuchsreihe war aus technischen Gründen nicht möglich.

2.7.5 Immunhistochemie (IHC)

Es wurden immunhistochemische Färbungen zum Nachweis der Reaktionen des umgebenden Hirngewebes auf die stereotaktisch implantierten Tumorzellen und zur Differenzierung des Tumors an Kryostat- und Paraffinschnitten durchgeführt. Alle Ergebnisse sind im Kapitel 3.9 dargestellt.

Eine Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper in den jeweiligen Verdünnungen findet sich in den Tab. 2.7.5a und b. Das darin verwendete „K“ steht für Kaninchen, die Abkürzung „m“ für monoklonale und „p“ für polyklonale Antikörper.

Antikörper (AK)	Wirt	Verwendete Verdünnung	Epitop	Klonalität	Firma, Sitz
α CD4 (L3T4)	Ratte	1:500	Detektion von MHC Klasse II restringierten T-Zellen und von T-Helferzellen	m	PharMingen, USA
α CD8a (Ly2)	Ratte	1:500	Detektion von MHC Klasse I restringierten T-Zellen und regulatorischen und zytotoxischen T-Zellen	m	PharMingen, USA
α CD 31 (PECAM-1)	Ratte	1:250; 1:500	Detektion von Plättchen vermittelter endothelialer Adhäsion, Angiogenese	m	PharMingen, USA
α CD 45 R/B220	Ratte	1:2000	Detektion von Glykoprotein der murinen B-Zellen	m	PharMingen, USA

α c-Myc (Y-69)	K	1:250; 1:500	Detektion von c-Myc-Expression in Tumorzellen	m	Abcam, Großbritannien
α Desmin	Maus	1:20	Detektion von Intermediärfilament des Zytoskeletts von Muskelzellen	m	Dako, Dänemark
α GFAP	K	1:1000	Detektion des sauren Gliafaserproteins, Intermediärfilament in Gliazellen	p	Dako, Dänemark
α Ki67 Klon SP6	K	1:200	Proliferationsmarker, Expression während G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus	m	Zyted, Deutschland
α Mac-1	Ratte	1:500	Detektion von Mikroglia, Komplementrezeptor auf Phagozyten	m	PharMingen, USA
α MAP-2	Maus	1:1000	Detektion von Mikrotubuliassoziertem Protein	m	Sigma, Japan
α Neurofilament	K	1:100	Detektion von Intermediärfilament von Nervenzellen	p	Sigma, Japan
α Olig 2	K	1:500	Detektion von Oligodendroglia	p	Chemicon Millipore, USA
α phospho-AKT (Ser 473)	K	1:50	Detektion von endogenen Akt-Level mit Phosphorylierung an Serin 473	ml	Cell signaling, USA
α sm-Actin	Maus	1:800	Detektion von Glattmuskelaktin	m	Progen, Deutschland
α Vimentin	Maus	1:1000	Detektion von Intermediärfilament der mesenchymalen Zellen	m	Chemicon Millipore, USA

Tab. 2.7.5a: Primärantikörper und verwendete Verdünnungen

Antikörper	Verdünnung	Firma, Sitz
Goat α Rat IgG (biotinyliert)	1:200	Vectastain Laboratories, USA
Goat α Rabbit IgG (biotinyliert)	1:200	Vectastain Laboratories, USA

Tab. 2.7.5b: Sekundärantikörper und verwendete Verdünnungen

2.7.5.1 IHC an Kryostatschnitten

In einer gekühlten Aceton-Methanol-Lösung (Riedel de Häen, Seelze) im Verhältnis 1:1 wurden die Kryostatschnitte für 45 Sekunden fixiert und danach bei Raumtemperatur für 10 Minuten getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen und dann zur Blockierung der endogenen Peroxidase in eine 0,3 % H₂O₂-PBS-Lösung für 10 Minuten getaucht. Nach einem erneuten Waschschrift in PBS erfolgte die Schnittumrandung mittels eines speziellen Fettstifts, eines sog. Liquid Blockers (Science Services, Japan). Im Anschluss wurden die präparierten Schnitte mit 2,5%igem Goat-Serum (Vectastain, USA) für 90 Minuten geblockt, um eine unspezifische Antikörperbindung und somit das Anfärben von unspezifischem Gewebe und Zellen zu verhindern. Danach wurde das Normalserum (Goat-Serum) mit 100 µl Primär-Antikörper-Verdünnung ausgetauscht. Als Verdünnungslösung diente 1%iges Goat-Serum. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und mit dem passenden Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnung erfolgte dabei ebenfalls mit 1%igem Goat-Serum. Zur Verstärkung des Sekundärantikörpers wurde ein Avidin-Biotin-Block der Schnitte durchgeführt. Dazu wurde das Vectastain ABC Kit (goat α rabbit) verwendet. Die Anwendung wurde nach dem Standard-Protokoll des Vectastain-Kits durchgeführt. Bei Maus-Primärantikörpern wurde mit dem Zytochem Plus HRP Polymer System von Zytomed Systems, das sowohl für Kryostatschnitte als auch Paraffinschnitte verwendet werden konnte, gearbeitet. Hierfür wurde nach dem laboretablierten und von Zytomed Systems empfohlenen Protokoll gearbeitet, siehe auch Kapitel 2.7.3.1.1. Nach Blocken der Schnitte erfolgten das erneute Spülen mit PBS und die Entwicklung mit Diaminobenzidin(DAB)-Lösung. Zur Sichtbarmachung oxidiert Diaminobenzidin mit der Peroxidase des Sekundärantikörpers zu einem braunen, unlöslichen Präzipitat. Die DAB-Lösung bestand dabei aus 0,1 % DAB, PBS und 10 µl 30%igem gekühltem H₂O₂. Nach einer 10-minütigen Entwicklungszeit wurde die Reaktion mit PBS abgestoppt. Die Schnitte wurden mit destilliertem Wasser gespült und anschließend für 30 Sekunden in Hämalauin gegengefärbt. Nach weiteren 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser waren die Kerne gebläut. Anschließend durchliefen die Objektträger die aufsteigende Alkoholreihe mit destilliertem Wasser und jeweils zweimal 70%-, 96%- und 100%igem Ethanol. Am Ende wurden die Schnitte für weitere 10 Minuten zur Entwässerung in Xylol gehalten. Mittels Corbit-Balsam erfolgte im Anschluss die Eindeckung mit Deckgläschen.

2.7.5.2 IHC an Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden über eine absteigende Xylol-Alkohol-Reihe entparaffiniert. Anschließend erfolgte ein 10-minütiges Bad in PBS. Danach kamen die Schnitte für 20 Minuten in eine 3%ige H₂O₂/PBS-Lösung. Nach erneutem Spülen mit PBS wurden die Schnitte zum Antigen-Retrieval in einen Citratpuffer (mM, pH 6,0) für 45 Minuten unter Hitze im Dampfgerar behandelt. Die Schnitte enthielten anschließend jeweils 4 Tropfen der Zyto Chem Plus Blocking Solution für 90 Minuten. Nach erneuter PSB-Spülung wurde das Zyto Chem Plus des HRP Polymer Systems als Post Block Reagents für weitere 20 Minuten auf die Schnitte getan. Anschließend konnten die Schnitte mit PBS gewaschen und mit DAB und Hämalun behandelt werden. Dieses Verfahren wurde bei α sm-Actin, α Vimentin, α MAP-2 und α Desmin verwendet. Die anderen Antikörper wurden auf den Paraffinschnitten wie auch auf den Kryostatschnitten ebenfalls mit Goat-Serum und dem ABC-Reagenz des Vectastain Kits verwendet.

Für den Nachweis von phospho-AKT (Ser 473) erfolgte die Prozedur mit tris-buffered saline (TBS) anstelle von PBS. Für den Nachweis von c-Myc (Y-69) wurde die Antigen-demaskierung mit Tris-EDTA durchgeführt. Beide Vorgehensweisen stammten aus den jeweiligen Herstellerprotokollen.

2.7.5.3 Immunfluoreszenz

Zur weiteren Darstellung der Tumorzellen wurde Immunfluoreszenz verwendet. Hierbei war eine Doppelfärbung bei Antikörpern aus dem gleichen Wirt nicht möglich. Die Färbungen wurden deshalb an Paraffinserienschnitten angefertigt.

Zur Immunfluoreszenz wurden die in Tab. 2.7.5.3a und b dargestellten Primär- und Sekundärantikörper verwendet.

Antikörper	Wirt	Verwendete Verdünnung	Epitop	Klonalität	Firma, Sitz
α Ki67 Klon SP6	K	1:200	Proliferationsmarker, Expression während G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus	m	Zytomed, Deutschland
α c-Myc (Y-69)	K	1:250; 1:500	Detektion von c-Myc-Expression in Tumorzellen	m	Abcam, Großbritannien

Tab. 2.7.5.3a: Primärantikörper bei der Immunfluoreszenz

Antikörper	Verdünnung	Firma, Sitz
Alexa Fluor (488) Goat α rabbit IgG (H+L)	1:2000	Invitrogen, USA
Alexa Fluor (568) Goat α rabbit IgG (H+L)	1:1000	Life technologies, USA

Tab. 2.7.5.3b: Sekundärantikörper bei der Immunfluoreszenz

Die Paraffinschnitte wurden wie bei der IHC über Xylol und eine absteigende Alkoholreihe bis 70 % Alkohol entparaffiniert. Anschließend erfolgte ein Waschen in PBS. Danach erhielten die Schnitte für 30 Minuten Goat-Serum. Das Goat-Serum enthält genügend endogene Proteine, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen und somit zu blockieren. Der Primärantikörper wurde ebenfalls über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem PBS-Spülen erfolgte in Dunkelheit die Inkubation mit Sekundärantikörper für 120 Minuten. Nach 3x 5 Minuten PBS Waschen erhielten die Schnitte für 2 Minuten zur Kerngegenfärbung 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 1:10000. Dieser Schritt diente zur Kerngegenfärbung. Nach erneutem Waschen mit PBS und Aqua bidest für jeweils 5 Minuten erfolgte das Eindeckeln der Objektträger mit Deckgläschen und Fluoromount. Die angefertigten Färbungen wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop befundet und fotografiert.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung der p53-knock-out-Mäuse

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mittels KAPA-PCR und den Primern 107, 108 und 109 (Material und Methoden 2.6.3). Die homozygote p53-knock-out-Maus wies ein Fragment mit 450 Basenpaaren (bp) auf. Die heterozygoten Individuen zeigten sowohl das 450 bp große Fragment als auch ein weiteres 310 bp großes Fragment. Als Referenz dienten eine knock-out-Kontroll-Probe und der DNA-Leiterstandard.

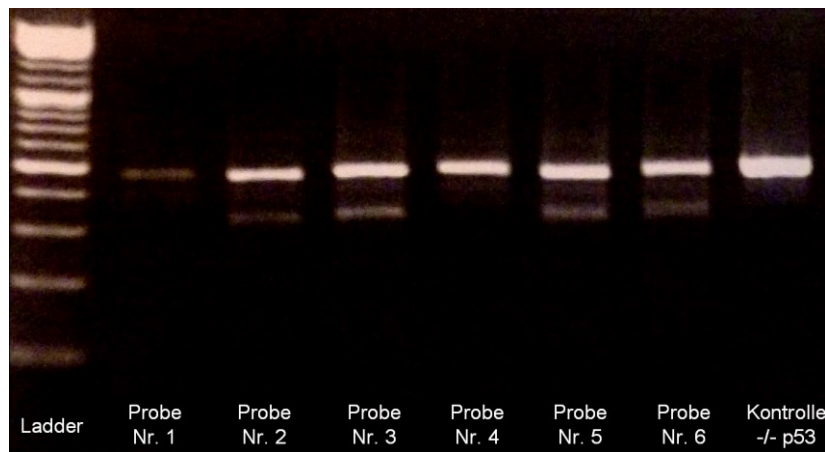


Abb. 3.1a: Genotypisierung der für die Herstellung der primären Astrozyten verwendeten Mäuse; Methode: KAPA PCR

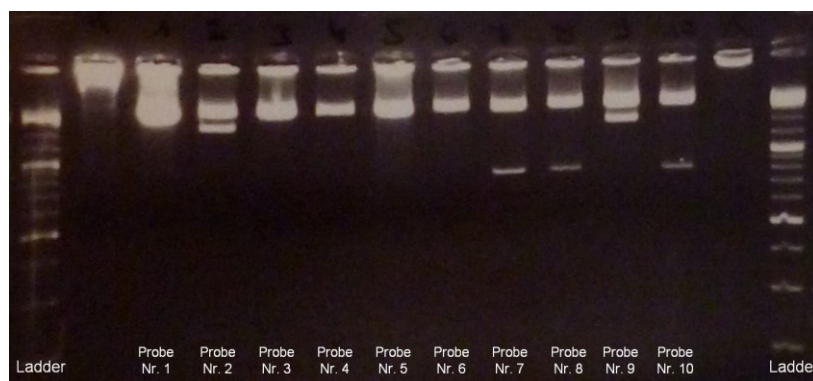


Abb. 3.1b: Kontrollverdau der Mini-Präparation pBABE-Hygro-myr-FLAG-Akt

Nach der Minipräparation zeigten die Kolonien der Nummer 7, 8 und 10 nach Restriktionsverdau mit HindIII jeweils ein zusätzliches 2300 bp großes Fragment. Diese Fragmente wiesen nur Kolonien mit vollständigem pBABE-Hygro-myr-FLAG-Akt-Plasmid auf.

Jede Maus, die für die primäre Astrozytenherstellung verwendet wurde, wurde vorab mittels KAPA PCR durch eine Schwanzprobe getestet.

3.2 Herstellung des Plasmides pBabe-Hygro-myr-FLAG-Akt

Für das Umklonieren wurde das pBabe-Hygro-Plasmid mit EcoRI-Schnittstelle verwendet. Von dem pWZL-neo-Myr-FLAG-Akt wurde die Geneticin- (G418-) Resistenz entfernt und durch eine Hygromycin-Resistenz ersetzt. Das erfolgreich klonierte Plasmid wurde für die Oligonukleotidkontrolle zu Seqlab Göttingen eingeschickt und die Sequenz auf Richtigkeit überprüft. Nach erfolgter Minipräparation des Plasmids wurde ein erneuter Restriktionsverdau mit HindIII zur Kontrolle durchgeführt. Da pBabe-Hygro-myr-FLAG-Akt zwei Restriktionschnittstellen für HindIII enthält, sollte bei dem Verdau ein 2300 bp großes Fragment entstehen. Die erstellte Plasmidkarte findet sich im Kapitel 2.3.

3.3 Zellkulturen: Transfektionserfolg anhand von Green fluorescent protein (GFP)-Nachweis

Die Herstellung der retroviralen Plasmidvektoren wurde anhand der parallel durchgeführten Calcium-Chlorid-Transfektion für GFP kontrolliert. Die jeweiligen Phoenix-ECO-Zellen derselben Charge erhielten das pBabe-H2B-GFP über den gleichen Vorgang der Transfektion. 24 Stunden nach der Transfektion konnte die GFP-Expression unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden. Die Effizienz der Transfektion wurde anhand der Auszählung einzelner Gesichtsfelder beurteilt, eine FACS-Analyse wurde nicht durchgeführt. Die Transfektionseffizienz variierte und lag hierbei zwischen 30 % und 60 %.

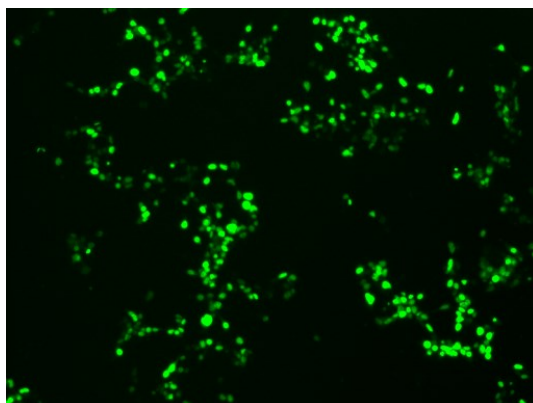


Abb. 3.3: Green fluorescent protein (GFP)-Expression bei Phoenix-Zellen 24 Stunden nach Transfektion

3.4 Veränderungen des Phänotyps der retroviral transduzierten Zellen

Die p53-knock-out-Astrozyten verändern nach der retroviralen Transduktion in der Zellkultur ihren Phänotyp. Dies konnten auch schon vorangegangene Arbeiten demonstrieren (119). Mit der Dauer in der Zellkultur und unter ständiger Selektion entwickelten sich die Zellen vom astrozytären Phänotyp weg, sie wurden zunehmend kleiner und boten eine Hyperchromasie der Kerne. Die Kern-Plasma-Relation verschob sich zugunsten des Kerns, ferner zeigten die Zellen eine Tendenz sich zusammen zu lagern (siehe Abb. 3.4a-c).

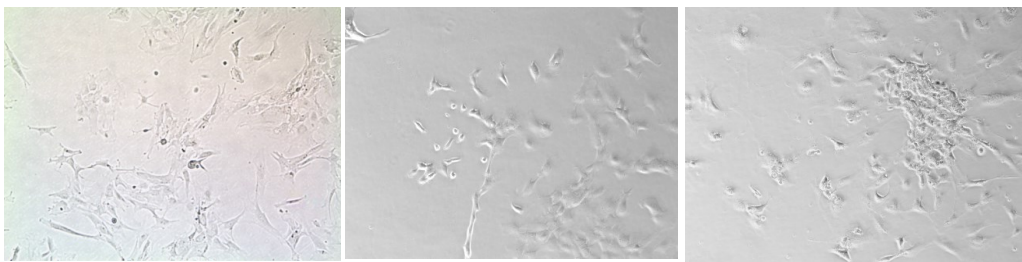


Abb. 3.4a: Primäre P53-knock-out- Astrozyten, erster Tag in Kultur, Auflichtmikroskopie

Abb. 3.4b: 1. Passage von Akt-transduzierten Astrozyten, 24 h nach Selektionsbeginn, Phasenkontrastmikroskopie

Abb.3.4c: Akt-Zellen nach weiterer Transduktion mit pBABE-Ta-Virus, 2. Passage, Phasenkontrastmikroskopie

Die Selektion mittels der jeweiligen Antibiotika begann 24 Stunden nach Transduktion. Bei erfolgreicher Transduktion lagen die Überlebensraten durch das Ausselektionsmedium zwischen 25 und 60 %. Die Transduktionskontrolle bei Viren mit MIGRdeluxel TF-myc konnte ebenfalls über die GFP-Expression erfolgen (siehe Abb. 3.4d-e). Je nach Passage fanden sich entweder astrozytär anmutende Zellen oder eher kleinere hyperchromatische Zellen.

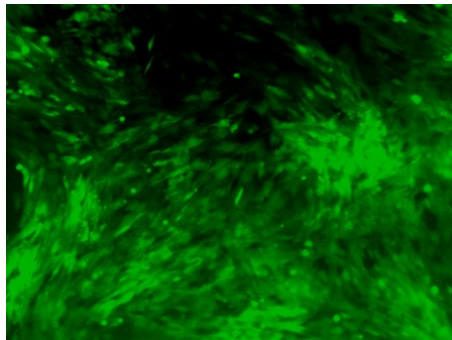


Abb. 3.4d: Fluoreszenz-mikroskopischer Nachweis (GFP) von ToM-Zellen, 1.Passage

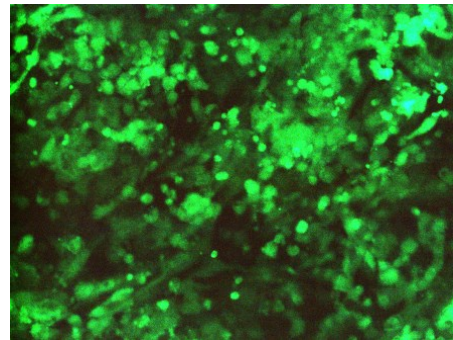


Abb. 3.4e: Fluoreszenz-mikroskopischer Nachweis (GFP) von AToM-Zellen 6. Passage

Diese Veränderungen des Zellphänotyps waren ein wichtiger Hinweis für die Entdifferenzierung der Zellen und sind mehrfach analysiert worden (119, 144, 145). Die p53-knock-out-Zellen mit *c-myc*-Transduktion zeigten ein kompaktes, kleineres Inselzellwachstum. Im Unterschied hierzu behielten die p53-knock-out-Astrozyten mit Akt-Überexpression über viele Passagen einen astrozytären Phänotyp mit eher großen Zellen und spindelzellartigen Zellausläufern bei. In allen transduzierten Zelltypen zeigten sich Veränderungen der Zellkerne mit hyperchromatischen Zellkernen und einer Verschiebung der Kern-Plasma-Relation in Richtung des Zellkerns.

3.5 Doxycyclin-Konzentration in vitro

Die Proliferation der retroviral transduzierten Zellen mit den pBABE-TA und MIGRdeluxel TF-myc-Plasmiden und damit die Funktion des Tet-off-Systems in vitro wurde anhand von Zellzählungen erfasst. Die benötigte Doxycyclin-Konzentration wurde vorab ausgetestet. Die getesteten Konzentrationen von 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml und 1,0 µg/ml zeigten vergleichbare Effekte. Bei den Versuchen in dieser Arbeit wurde 1,0 µg/ml eingesetzt.

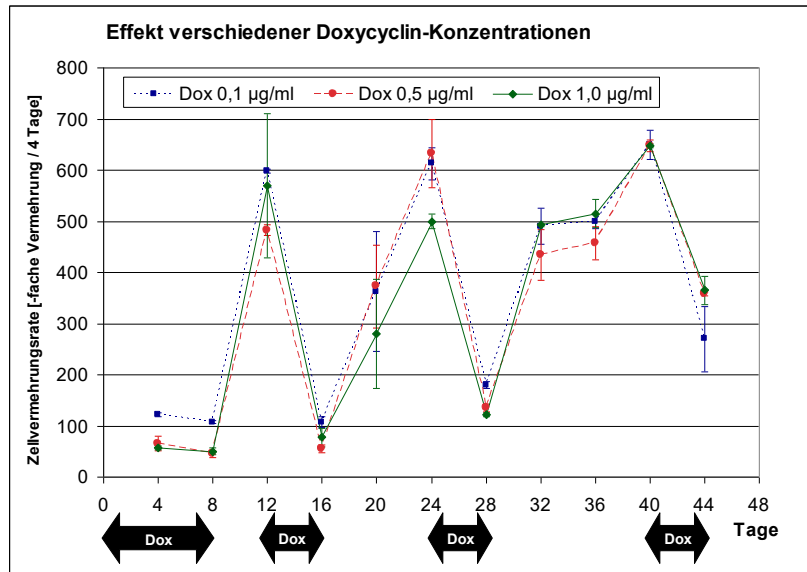


Abb. 3.5: Austestung verschiedener Doxycyclin-Konzentrationen bei AToM-Zellen ab 4. Passage

3.6 Änderung der Zellproliferation durch Doxycyclin

Der Einfluss des Doxycyclins auf die Zellproliferation wurde in mehreren in-vitro-Versuchen mit den verschiedenen Zellpopulationen untersucht. Nach erfolgreicher Transduktion erhielten die Zellen permanent Doxycyclin mit 1,0 µg/ml. Die Zellen einer Platte wurden anschließend in zwei Versuchsgruppen mit six-well-Platten aufgeteilt. Die eine Gruppe, bestehend aus sechs Unterversuchsgruppen, erhielt intermittierend Doxycyclin, die andere nicht. Alle vier Tage wurden die Zellen ausgezählt und 2000 Zellen des jeweiligen Wells erneut in Kultur gebracht. In den mit Doxycyclin behandelten Kulturen fanden sich nach derselben Zeit in der Zellzählung deutlich geringere Zellzahlen als in den unbehandelten Wells im Sinne einer deutlich geringeren Proliferation. Die Regulierbarkeit mit dem Tet-off-System konnte bei allen 6 AToM- und allen 4 ToM-generierten Populationen nachgewiesen werden.

3.6.1 ToM-Zellen

Die Zellen, die nur mit pBABE-tTA und MIGRdeluxel TF-myc transduziert worden waren (ToM-Zellen), wurden mit und ohne Doxycyclingabe untersucht. Die Zellen, die während der gesamten Dauer in Zellkultur mit Doxycyclin behandelt worden waren, zeigten im Vergleich zu den unbehandelten ToM-Zellen eine deutlich langsamere Proliferation. Die Unterschiede der Zellvermehrungsrate der behandelten und unbehandelten ToM-

Zellen nahmen im Verlauf des Untersuchungszeitraumes zu. Auch nach 16 Tagen kontinuierlicher Doxycyclingabe war die Proliferation der ToM-Zellen anhaltend supprimiert, die Zellproliferationsrate blieb durch die Tetracyclinregulation stabil (siehe Abb. 3.6.1a). Die Doxycyclin-unbehandelten ToM-Zellen der Gruppe 1 zeigten dagegen einen stetigen Anstieg der Zellvermehrungsrate.

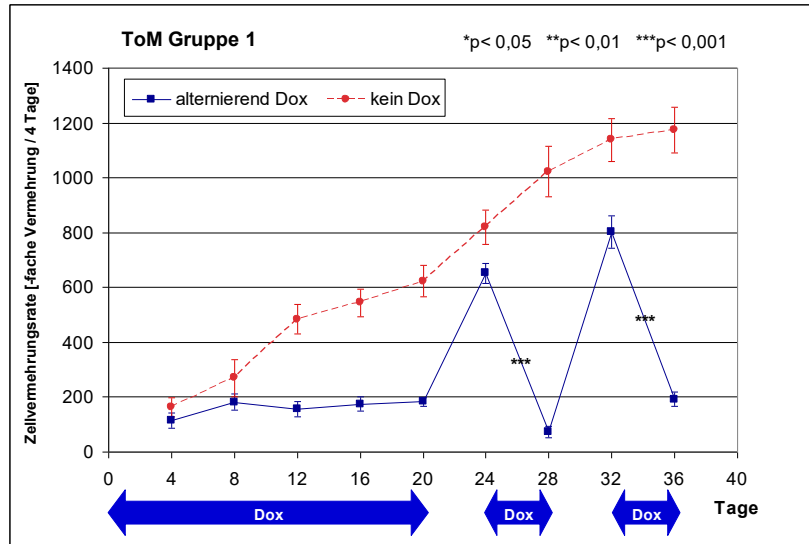


Abb. 3.6.1a: Zellvermehrungsrate von ToM-Zellen Gruppe 1 ab 1. Passage
y-Achse: Zellvermehrungsrate; x-Achse: Tage; blau: Gruppe mit intermittierender
Doxycyclingabe, rot: Gruppe ohne Doxycyclin

Eine Beschleunigung der Proliferation war bis zu einem bestimmten Maximum mittels Zellzählung zu beobachten.

Dies war bei dieser Zellgruppe bis Tag 36 mit Auszählungen zu erheben. Die Zellen konnten sich auf den Boden der Kulturschale absetzen und einen Zellrasen bilden. Eine exakte Zellzählung mit Fuchs-Rosenthal-Zählkammern war am Tag 40 nicht mehr möglich, da die Zellen sich pyknotisch zeigten und im Medium schwammen.

Da die Zellen der 1. Passage nach Transduktion ausgezählt wurden und die Zellkulturuntersuchungen in Abb. 3.6.1a am 36. Tag beendet wurden, war im Weiteren zu klären, ob die Regulation mittels Tet-off-System auch in höheren Zellpassagen funktioniert. Hierfür wurden Zellen der ToM Gruppe 1 in der 1. Passage kryokonserviert und dann nach dem Auftauen erneut über 6 Passagen mit Doxycyclin in Kultur belassen. Anschließend erfolgte die erneute Auszählung (siehe Abb. 3.6.1b). Die Zellen der 7. Passage (49 Tage in Kultur) waren ebenfalls regulierbar und dies über einen erneuten Beobachtungszeitraum

von 16 Tagen (siehe Abb. 3.6.1b). Die Annäherung der Zellproliferationsrate zur Doxycyclin-unbehandelten Gruppe erfolgte diesmal schneller. Die Versuchszellen waren vor der erneuten Testung alle mit Doxycyclin behandelt worden.

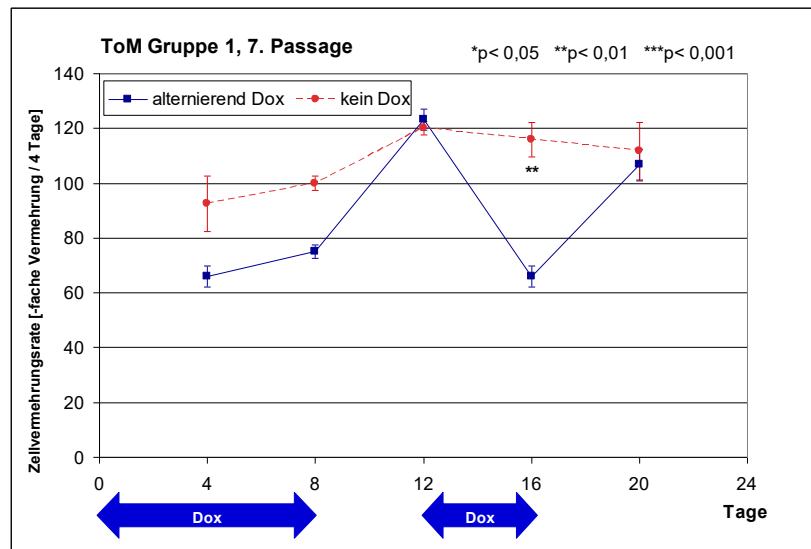


Abb. 3.6.1b: Zellvermehrungsrate von ToM-Zellen Gruppe 1 ab 7. Passage nach Kryokonservierung in der 1. Passage
y-Achse: Zellvermehrungsrate; x-Achse: Tage; blau: Gruppe mit intermittierender Doxycyclingabe, rot: Gruppe ohne Doxycyclin

Diese Ergebnisse konnten anhand weiterer ToM-Zellpopulationen, insgesamt 4 generierten ToM-Zellpopulationen, bestätigt werden.

3.6.2 AToM-Zellen

Die AToM-Zellen wurden ebenfalls in Zellkulturen untersucht. Auch dieser generierte Zelltyp zeigte ein gutes Ansprechen auf die Doxycyclingabe und damit eine Regulierbarkeit der Proliferation. Die Zellen waren nach 16 Tagen Doxycyclinkarenz immer noch regulierbar (siehe Abb. 3.6.2a). Die Proliferationsrate näherte sich zwischen Versuchstag 4 und 16 ohne Doxycyclingabe der Doxycyclin-unbehandelten Gruppe an. Dieser Effekt war in allen Untersuchungen zu beobachten und nicht davon abhängig, ob es sich um frühe oder späte Zellpassagen handelte. Jedoch wurde in höheren Zellpassagen schneller eine Annäherung der Proliferationsraten der Doxycyclin-behandelten und Doxycyclin-unbehandelten Gruppen gesehen.

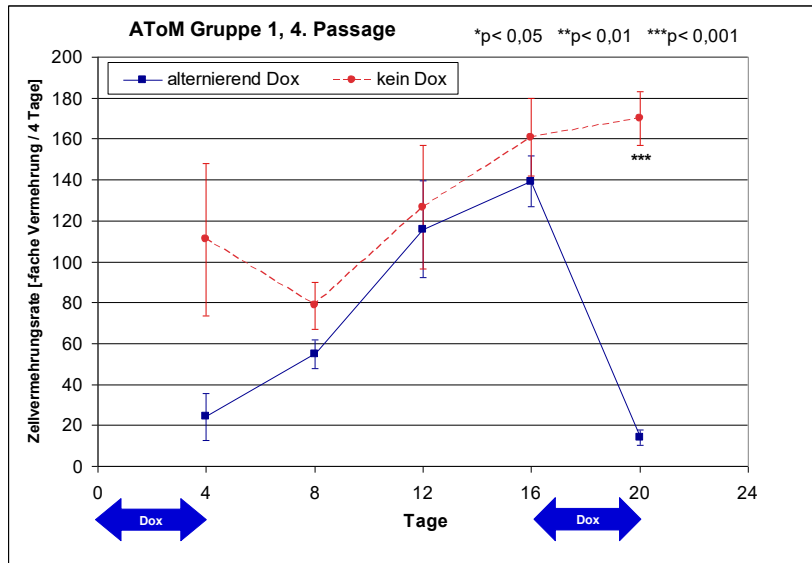


Abb. 3.6.2a: Zellvermehrungsrate von AToM-Zellen Gruppe 1 ab 4. Passage
y-Achse: Zellvermehrungsrate; x-Achse: Tage; blau: Gruppe mit intermittierender
Doxycyclingabe, rot: Gruppe ohne Doxycyclin

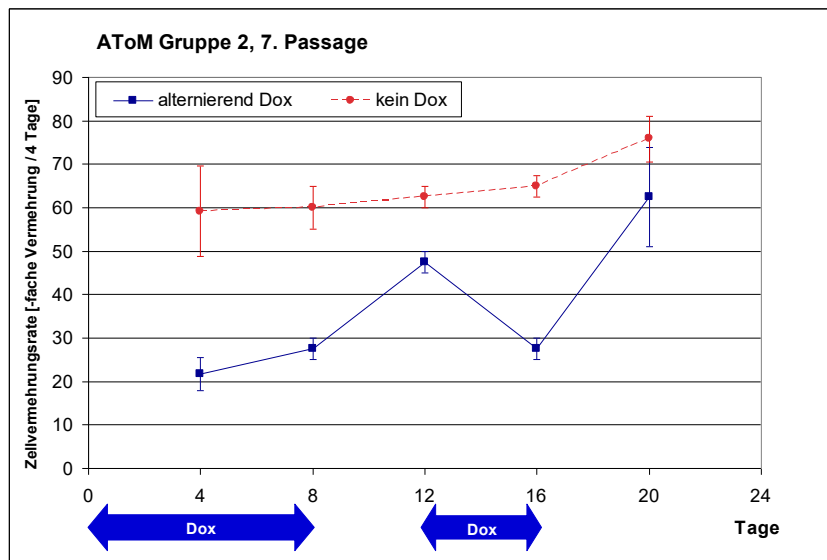


Abb. 3.6.2b: Zellvermehrungsrate von AToM-Zellen Gruppe 2 ab 7. Passage
y-Achse: Zellvermehrungsrate; x-Achse: Tage; blau: Gruppe mit intermittierender
Doxycyclingabe, rot: Gruppe ohne Doxycyclin

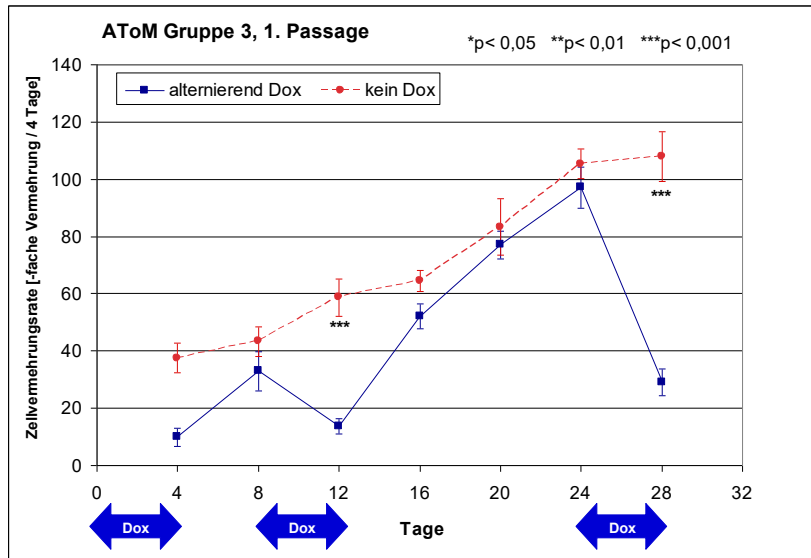


Abb. 3.6.2c: Zellvermehrungsrate von AToM-Zellen Gruppe 3 ab 1. Passage
y-Achse: Zellvermehrungsrate; x-Achse: Tage; blau: Gruppe mit intermittierender
Doxycyclingabe, rot: Gruppe ohne Doxycyclin

Im Weiteren war zu klären, ob die Regulierbarkeit durch das Tet-off-System auch nach längerer Doxycyclinkarenz bestehen bleibt. Hierzu wurden die AToM-Zellen der Gruppe 2 ab der 8. Passage (48 Tage in Kultur) über eine Dauer von 22 Tagen in Zellkultur belassen. In dieser Zeit wurde nur das Medium mit Hygromycin 50 µg/ml und Puromycin 1 µg/ml alle 4 Tage gewechselt. Anschließend wurde die Zellkultur ab Tag 22 in 2 Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe erhielt dann 1,0 µg/ml Doxycyclin in das Kulturmedium. Nach weiteren vier Tagen wurden die six-well-Platten ausgezählt. Dabei zeigte sich erneut ein deutlicher Unterschied in der Proliferationsrate (siehe Abb. 3.6.2d).

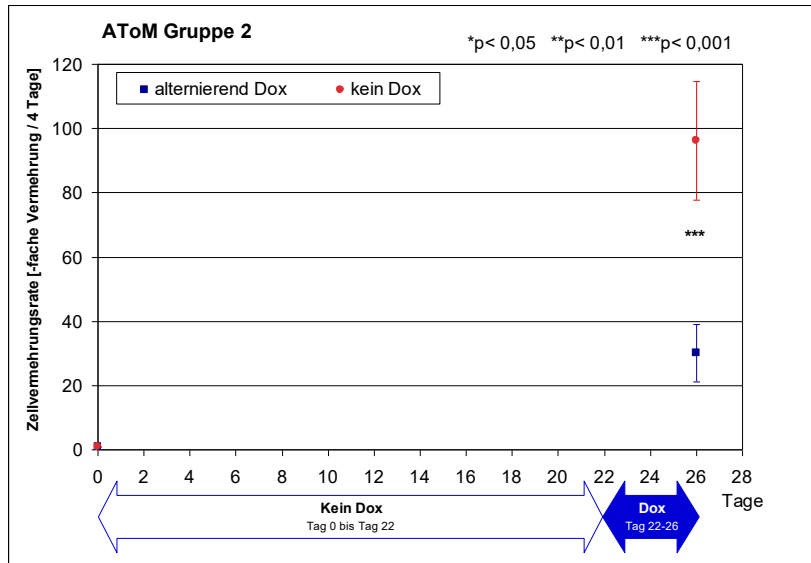


Abb. 3.6.2d: Zellvermehrungsrate nach 22 Tagen Doxycyclinkarenz von AToM-Zellen Gruppe 2, 8. Passage; y-Achse: Zellvermehrungsrate; x-Achse: Tage; blau: Gruppe nach 4-tägiger Doxycyclingabe, rot: Gruppe ohne Doxycyclin

3.6.3 Proliferation der p53-knock-out-, der transduzierten *Akt*- und GFP-Zellen

Ferner sollte untersucht werden, ob das Vorhandensein eines Plasmides per se die Zellproliferation verändert. Hierzu wurden aus der p53-knock-out-Population der späteren AToM-Gruppe 2 zunächst p53-knock-out-Zellen, dann transduzierte GFP- und Akt-Zellen im selben Zeitraum untersucht (siehe Abb. 3.6.3). Eine parallele Untersuchung der AToM-Gruppe 2 war aufgrund der hintereinander stattfindenden Transduktionsschritte mit den unterschiedlichen Retroviren nicht in derselben Passage mit derselben Zellpopulation möglich.

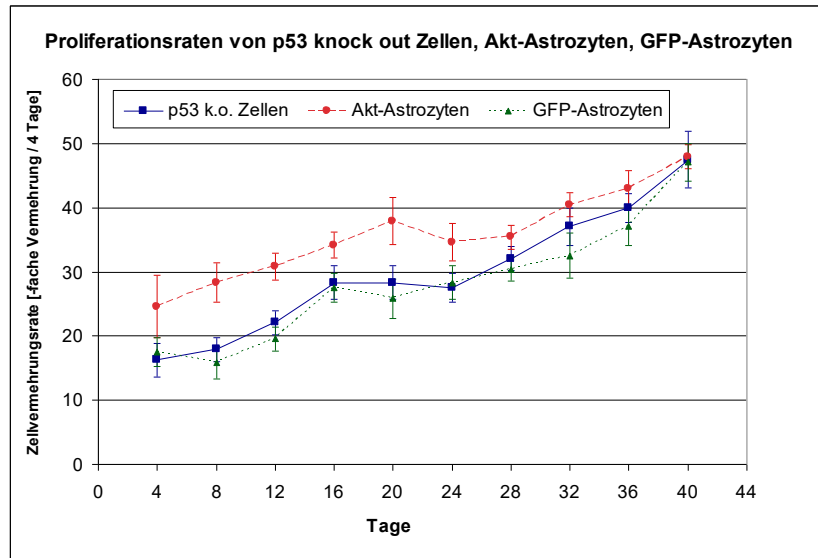


Abb. 3.6.3: Zellproliferationsraten von p53-knock-out-Zellen, Akt-Astrozyten und GFP-Astrozyten ab 1. Passage

Die anfänglich erhöhte Proliferation der *Akt*-transduzierten Zellen ist mit der antiapoptischen Wirkung von Akt zu begründen, die bereits in Kapitel 1.2.3.2 ausführlich beschrieben wurde (69, 125). Die Annäherung der Proliferationsraten der p53-knock-out-Zellen und der GFP-transduzierten Zellen über den Zeitraum von 40 Tagen ist durch die Anhäufung genetischer Aberrationen in der Zellkultur bei p53-Defizienz erklärbar (143). Alle Zelltypen zeigen jedoch im Gegensatz zu den AToM- und den ToM-Zellen insgesamt eine geringere Proliferationsrate. Die Bedeutung des *c-Myc* wird hier erneut klar. Somit fungiert *c-Myc* als wichtiges Onkogen in der Proliferationssteigerung und das konstitutiv aktive Akt ist als „Zellstabilisator“ anzusehen (69, 151).

3.6.4 In-vitro-Regulation mit Tet-off-System

Zusammenfassend belegen die in-vitro-Versuche der unterschiedlich transduzierten Zellen die Regulierbarkeit durch das Tet-off-System im Rahmen der zellbiologischen Ressourcen. Sowohl die p53-knock-out-Zellen, die nur mit pBABE-purotTA und MIGRdeluxel TF-myc transduziert (ToM-Zellen) worden sind, als auch die zusätzlich mit Akt versehenen AToM-Zellen sind durch Doxycyclingabe in vitro reproduzierbar regulierbar.

3.7 In-vivo-Versuche

Ob die in vitro regulierbaren Zelltypen auch in vivo regulierbar sind und ihr tumorigenes Potenzial umsetzen können, wurde in einer Reihe von Tierversuchen in vivo untersucht. Die in Zellkultur erfolgreich regulierbaren Zellen wurden über 12 Tage ohne Doxycyclin

kultiviert. Anschließend erfolgte die in Kapitel 2.7 beschriebene stereotaktische Implantation der Zellen in das Corpus Striatum der BL6-Mäuse.

3.7.1 AToM-Zellen induzieren Tumore

Es wurden sowohl reine myr-Akt-Zellen als auch ToM- und AToM-Zellen stereotaktisch eingesetzt. Die verwendeten BL6-Mäuse wurden nach 21 Tagen Beobachtungszeit in Narkose dekapitiert. Ausschließlich AToM-Zellen induzierten Tumore, während sich nach Implantation von myr-Akt-Zellen oder ToM-Zellen keine eindeutige Tumorigenese fand. Diese Zellen waren in einigen Fällen lediglich im Stichkanal nachweisbar.

In der ersten Versuchsreihe zeigten die AToM-Zellen in der 10. Passage ein ausgeprägtes makroskopisches Tumorwachstum. 11 Tage nach der Stereotaxie traten bei allen mit AToM-Zellen operierten Versuchstieren erste Hirndrucksymptome auf. Aufgrund dieser Entwicklung wurde der Versuch aus ethischen und Tierschutzgründen 12 Tage nach Stereotaxie frühzeitig abgebrochen und die Mäuse narkotisiert und dekapitiert.

Als Konsequenz aus den Ergebnissen dieser ersten Versuchsreihe wurde der Versuchsablauf geändert. Die Zeit nach Implantation der Zellen ohne Doxycyclin wurde von 10 auf 5 Tage verkürzt, und es wurden Zellen einer früheren Zellpassage (8. Zellpassage) verwendet. In früheren Arbeiten zeigte sich bereits ein makroskopisches Wachstum in früheren Zellpassagen (119).

In der zweiten Versuchsreihe (Versuchsreihe II, AToM II) entwickelten die Versuchstiere keine Hirndrucksymptome mehr. Sie zeigten den erwarteten Gewichtsverlauf mit zunächst Gewichtszunahme und einer 8 bis 10 Tage nach der Stereotaxie beginnenden Gewichtsabnahme. Die Gewichtsverläufe zwischen den Doxycyclin-behandelten und den unbehandelten Tieren unterschieden sich kaum. Die zwei Mäuse, die keine Zellen implantiert bekamen und Doxycyclin-haltiges Trinkwasser erhielten, zeigten keine Gewichtsabnahme oder sonstige Symptome. Das Tumorwachstum in Versuchsreihe II war in der Doxycyclin-behandelten Gruppe makroskopisch geringer ausgeprägt (siehe Abb. 3.7.2a).

In der dritten Versuchsreihe wurden dann erneut AToM-Zellen der 8. Passage sowie ToM-Zellen der 8. Passage implantiert. Die ToM-Zellen zeigten keine Tumorigenese. Trotz des identischen Versuchsablaufes mit Verwendung von Zellen der 8. Zellpassage

zeigte sich hier jetzt kein Unterschied im Tumorwachstum der Doxycyclin-behandelten und -unbehandelten Gruppen mehr. Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass bei einer hohen Zellpassage wie der 8. die Zellen unterschiedlich ansprechen können. Deshalb entschieden wir uns in Versuchsreihe IV (AToM IV) eine noch frühere Zellpassage (5. Zellpassage) der in vitro regulierbaren AToM-Zellen einzusetzen.

Eine tumorigene Wirkung der AToM-Zellen konnte in jeder Versuchsreihe nachgewiesen werden. Das Ansprechen auf die Doxycyclinbehandlung als Ausdruck für das Funktionieren des Tet-off-Systems in vivo konnte nur in Versuchsreihe II belegt werden. In der vierten Versuchsreihe konnten durch die Doxycyclinbehandlung deutlich kleinere, nur mikroskopisch nachweisbare Tumore erzeugt werden.

Die AToM-Zellen der 8. Passage induzierten ein deutliches makroskopisches Tumorwachstum im Gegensatz zur 5. Passage (siehe Abb. 3.7.1a und b). Jedoch zeigten die Tumore der 5. Passage einen differenten histologischen Phänotyp im Vergleich zu den Tumoren der 8. Passage. Die verschiedenen Morphologien wurden weiter immunhistochemisch untersucht.

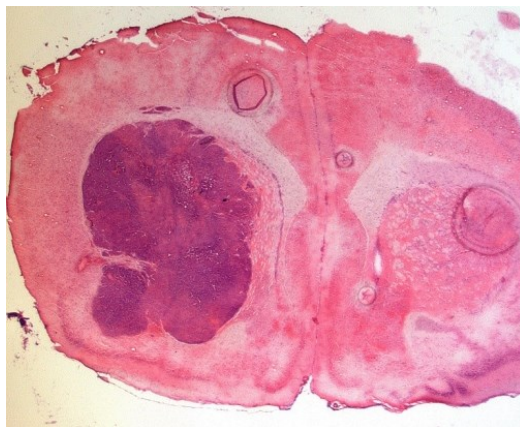


Abb. 3.7.1a: Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 8, Schnitt 105

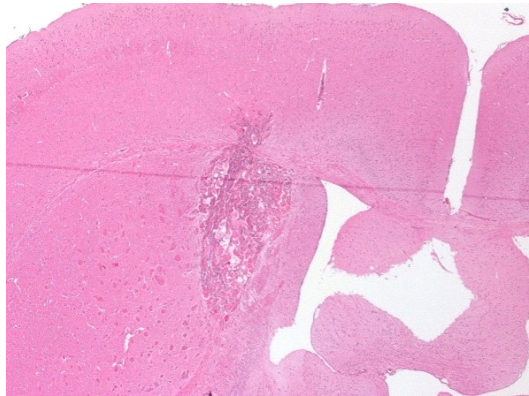


Abb. 3.7.1b: Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 8, Schnitt 1

Der tumorigene Effekt der AToM-Zellen war in allen Versuchen zu beobachten und auch in niedrigen Zellpassagen zumindest mikroskopisch klar zu erkennen. Die Tumore der BL6-Mäuse aus AToM-Zellen der Passage 8 in Versuchsreihe II und III zeigten teils Infiltrationen in die Kalotte und das Kleinhirn. Die Großhirnhemisphären mit dem makroskopisch sichtbaren Tumor wurden entnommen und standen für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die verwendeten Zelltypen und Zellpassagen und deren tumorinduzierenden Effekt.

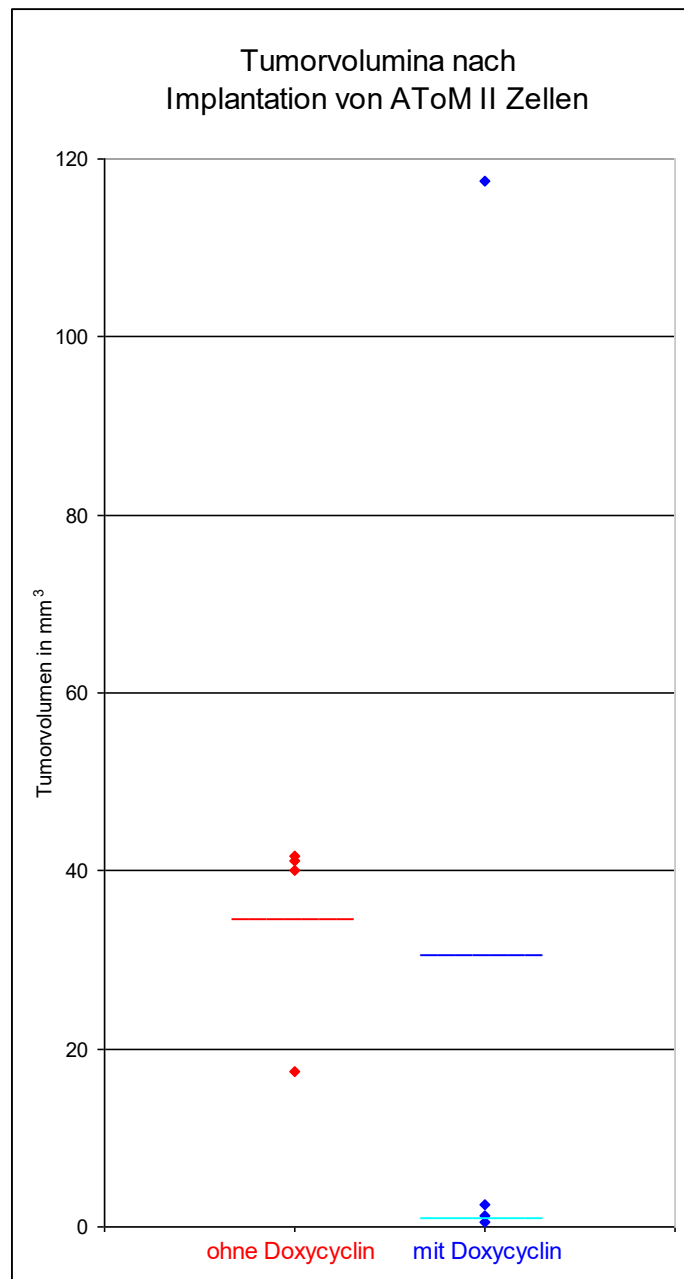
Zelltyp	Verwendete Zellpassagen	Tumorigenesis in vivo
Myr-Akt	10. Zellpassage	Nein
ToM	8. Zellpassage	Nein
AToM	10., 8. und 5. Zellpassage	Ja

Tab. 3.7.1: Tumorigenesis der verschiedenen Zelltypen

3.7.2 Tumolvolumenmessung

Die Frage ob die Tumorzellen auch in vivo die Regulation durch Doxycyclingabe beibehalten konnten, wurde mittels Volumenmessung der induzierten Tumore geprüft. Dazu wurden Kryostatschnitte der Hirne angefertigt. Die kompletten Großhirnhemisphären wurden in einer Schichtdicke von 10 µm aufgeschnitten, auf Objektträger aufgezogen und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Mittels Bamboo Tab wurden die Tumorflächen in den Kryostatschnitten ausgemessen. Aus benachbarten Tumorflächen und der Schnittdicke wurden die Tumorteilvolumina errechnet, die zum Gesamttumolvolumen addiert wurden. In der Volumenanalyse der AToM II-Tumore waren deutliche Größenunterschiede zwi-

sehen Doxycyclin-behandelten Mäusen und Doxycyclin-unbehandelten Mäusen zu sehen. Die Volumina sind in Abb. 3.7.2a dargestellt.



Dox	Tumorvolumen [mm ³]	Kein Dox	Tumorvolumen [mm ³]
Hirn 1	117,43*	Hirn 2	40,05
Hirn 3	1,21	Hirn 4	41,12
Hirn 5	0,54	Hirn 6	41,64
Hirn 7	2,54	Hirn 8	17,40

Abb. 3.7.2a: Graphische Darstellung der Tumorvolumina nach Implantation von AToM-Zellen, Versuchsreihe II. Rot: 4 Mäuse ohne Doxycyclingabe. Blau: 4 Mäuse mit Doxycyclinbehandlung. Rote Linie: Mittelwert für Mäuse ohne Doxycyclingabe. Blaue

Linie: Mittelwert für Mäuse mit Doxycyclinbehandlung. Hellblaue Linie: Mittelwert für Mäuse mit Doxycyclinbehandlung ohne Hirn 1.

Maus Nr. 1 (siehe Abb. 3.7.2b) der Doxycyclin-behandelten Gruppe hat trotz 2 mg/ml Doxycyclin im Trinkwasser einen extrem großen Tumor entwickelt, der zudem histologisch ausgeprägte Nekrosen und ein stark verdrängendes Tumorwachstum aufwies, wie in keinem der anderen Fälle nachweisbar. Dies lässt sich nur damit erklären, dass die implantierten Zellen im Mausindividuum Nr. 1 nicht auf die Doxycyclingabe angesprochen haben oder das Doxycyclin in dieser Maus den Tumor nicht erreicht hat. In allen anderen Mäusen waren deutliche Unterschiede bei den Tumorumfängen der Doxycyclin-behandelten (Nr. 3, Nr. 5, Nr. 7) und Doxycyclin-unbehandelten (Nr. 2, Nr. 4, Nr. 6, Nr. 8) Versuchsgruppe festzustellen. Die Ursache des unkontrollierten Tumorwachstums bei Maus Nr. 1 konnte nicht abschließend geklärt werden.



Abb. 3.7.2b: Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 1; sichtbare Nekroseinseln

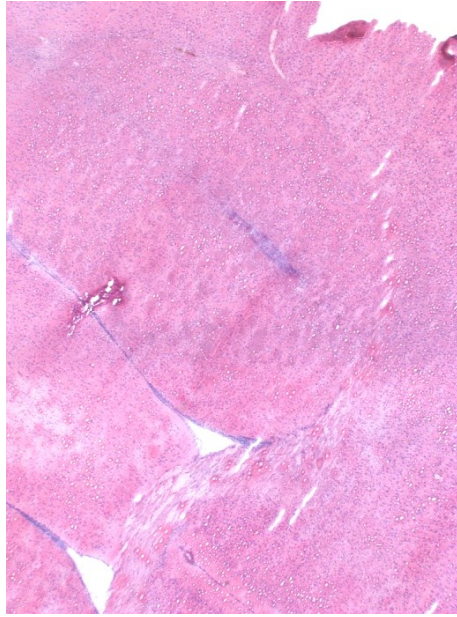


Abb. 3.7.2c: Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Doxycyclin-behandeltes Versuchstier Nr. 9, Kryostat-Schnitt 40

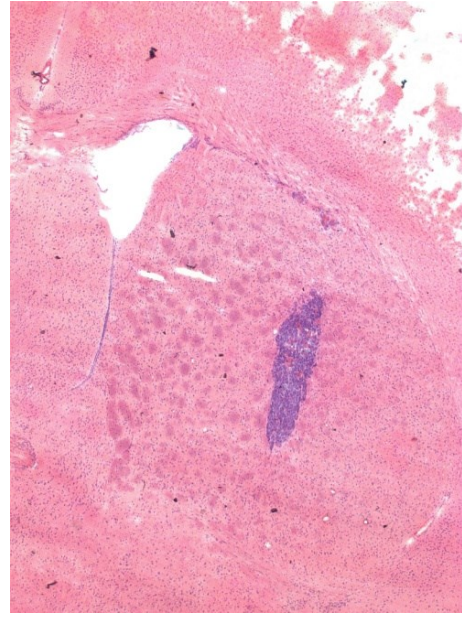


Abb. 3.7.2d: Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 6 ohne Doxycyclingabe, Kryostat-Schnitt 15

Die unterschiedlichen Tumorgrößen fanden sich auch in der Stereotaxie der Tumorzellen der 5. Passage (siehe Abb. 3.7.2c und d). Aufgrund der Verzerrungen, in den in diesen Fällen auch angefertigten Paraffinschnitten, war jedoch eine Flächenbestimmung und Volumenanalyse wie in AToM II-Versuchsreihe nicht möglich.

3.8 Magnetresonanztomographie (MRT) der Mäuse

Zur Überprüfung des Tumorverhaltens und Tumorwachstums wurden am 2. und 19. Tag postoperativ MRT-Bilder angefertigt. Bei Zellen der 8. Passage konnte nach 19 Tagen im MRT ein deutliches Tumorwachstum bildmorphologisch nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.8a und b), was bei den Zellen der 5. Passage nicht der Fall war.

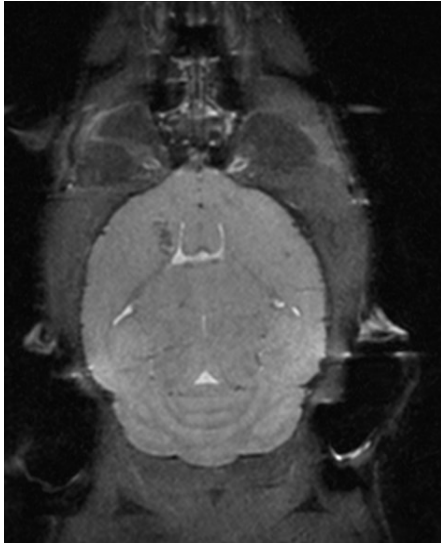


Abb. 3.8a: cMRT Maus Nr. 5 mit implantierten AToM-Zellen der 8. Passage

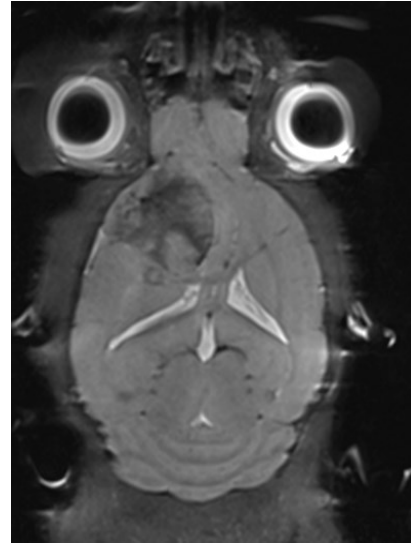


Abb. 3.8b: cMRT Maus Nr. 8 mit implantierten AToM-Zellen der 8. Passage

Der große Tumor der Maus Nr. 8 war klinisch von einem Gewichtsverlust von 3 g, ca. 10 % des Ausgangsgewichts, begleitet. Die Mäuse wurden jeden Tag inspiziert, um mögliche Hirndruckzeichen zu detektieren und bei klinischer Verschlechterung einen vorzeitigen Experimentenabbruch aus ethischen und Tierschutzgründen zu indizieren. Bei allen Versuchen zeigten die Tiere durchgehend ein gutes Nahrungsaufnahmeverhalten und zunächst eine Gewichtszunahme. Da die Versuchstiere zu Versuchsbeginn alle 8 Wochen alt waren, war dies zu erwarten. Nach 10 bis 14 Tagen traten bei den Mäusen, die stereotaktisch die Zellen der 8. Passage implantiert bekommen hatten, Gewichtsverluste auf. Diese variierten von 2 bis 10 % des Anfangsgewichts am 21. Versuchstag. Die Mäuse, denen Zellen der 5. Passage implantiert wurden, zeigten keine Gewichtsabnahme in Bezug zum Ausgangsgewicht. Somit konnte der Gewichtsverlust zwar als Indiz für ein ausgeprägtes Tumorwachstum genommen werden, ein signifikanter Unterschied zwischen Doxycyclin-behandelten und Doxycyclin-unbehandelten Mäusen war aber nicht nachweisbar.

3.9 Immunhistochemie

Der Ablauf der Färbungen und die verwendeten Antikörper sind in Kapitel 2.7.5 bereits ausführlich dargestellt worden. Zunächst wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbungen) der Kryostatschnitte für die erste histologische Befundung und die Volumenbestimmung angefertigt.

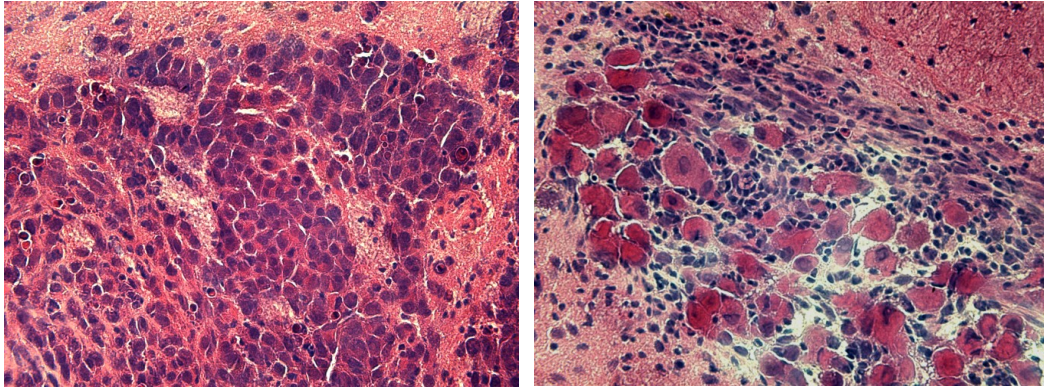


Abb. 3.9a: Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 8, Schnitt 120, 20-fache Vergrößerung

Abb. 3.9b: Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 5, Schnitt 45, 40-fache Vergrößerung

In der HE-Färbung sind die morphologischen Unterschiede der Tumorzellen von der 5. und 8. Passage sichtbar. Trotz Verwendung der gleichen Plasmidtransduktionen bei Zellen der 8. und 5. Passage zeigen sich deutliche Unterschiede in der Tumorzeldifferenzierung. Die Zellen der 8. Passage imponieren kleiner mit intensiver Kernfärbung, während die Zellen der 5. Passage deutlich größer sind (siehe Abb. 3.9a und b).

Zur weiteren Spezifizierung der Tumorzellen wurden verschiedene Färbungen sowohl an Tumorkryostatschnitten der 8. und 5. Passagen als auch an Paraffinmaterial der 5. Passage angefertigt.

3.9.1 Herkunft und Immunantwort

Zunächst waren die Fragen der Immunreaktivität und der Zellherkunft zu klären. Wie schon mehrfach gezeigt, verlieren die generierten AToM-Zellen zunehmend die Immunreaktivität für das saure Gliafaserprotein Glial fibrillary acidic protein (GFAP) (3, 119). Dies konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Nur noch wenige Zellen im Tumor präsentieren sich GFAP-positiv (Abb. 3.9.1a und b). In der unmittelbaren Tumorumgebung zeigte sich eine reaktive Astrozytose. Diese Reaktion war sowohl für Zellen der 8. und als auch der 5. Passage gleich ausgeprägt.

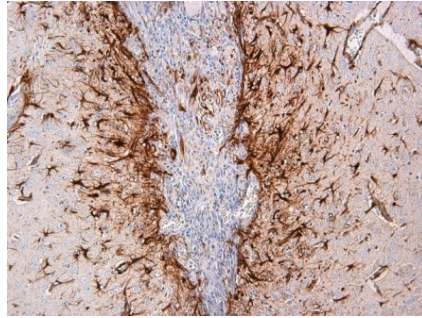
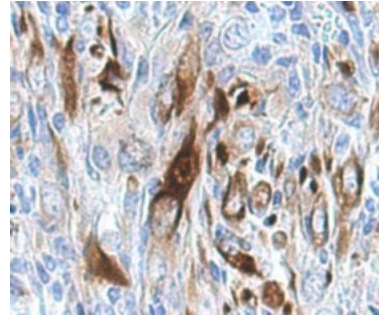


Abb. 3.9.1a: Antikörper gegen GFAP, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 1, Paraffinschnitt



Ausschnitt aus Abb. 3.9.1a

51

Ob mit der reaktiven Astrozytose zudem eine Einwanderung von Entzündungszellen aufgetreten war, wurde mittels Antikörperfärbungen für CD4- und CD8-Rezeptoren (Cluster of differentiation 4 und 8) sowie für Makrophagen-1-Antigen (MAC-1) geprüft. In den gefärbten Hirnschnitten beider verwendeten Zellpassagen waren nur wenige Entzündungszellen in der Tumorumgebung nachweisbar. Damit hatten die implantierten Tumorzellen das Immunsystem der Maus kaum aktiviert, was für eine erfolgreiche Etablierung des Tumormodells eine wichtige Voraussetzung darstellt. Die Abb. 3.9.1b, c und d präsentieren exemplarisch die Antikörperfärbungen für CD8- und MAC-1. Hier zeigt sich eine nur geringe Immunzelleinwanderung bei fehlender Makrophagenaktivierung.

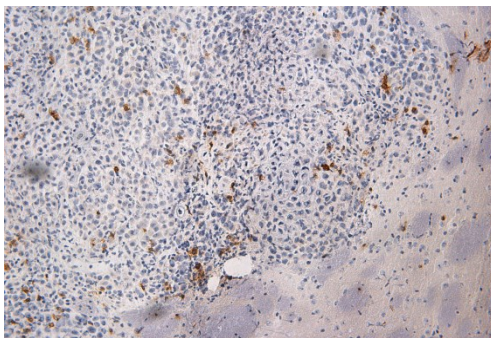


Abb. 3.9.1b: Antikörper gegen CD8, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7, Schnitt

37

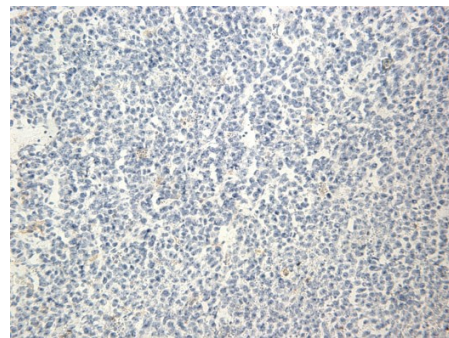


Abb. 3.9.1c: Antikörper gegen MAC-1, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 6, Schnitt 34

34

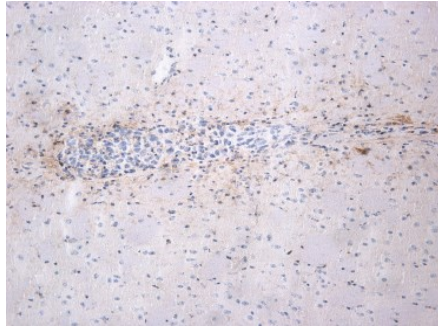


Abb. 3.9.1d: Antikörper gegen MAC-1, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 9, Schnitt 8

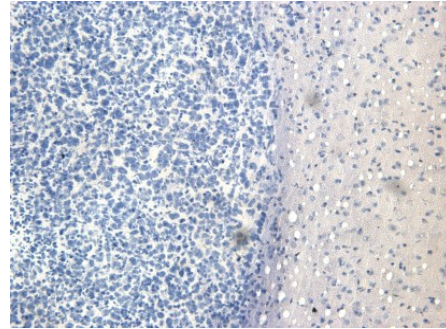


Abb. 3.9.1e: Negativkontrolle

3.9.2 Antikörper gegen CD45R/B220

Mit diesem Antikörper wird das membranständige Protein CD45R-Antigen detektiert. Es besitzt eine Tyrosin-Phosphatase-Aktivität. Es wird auf allen B-Zellen in allen Entwicklungsstadien, aktivierten B-Zellen und auch auf Unterarten von T- und NK-Zellen exprimiert. Es fungiert als Pan-B-Zellmarker. In den durchgeführten Färbungen waren die Tumoren der 8. Passage alle immunnegativ für dieses Antigen, die Tumore der 5. Passage zeigten teils positive Zellen (siehe Abb. 3.9.2a und b). Eine eindeutig positive Immunreaktivität war in keinem Tumor zu sehen, somit war keine relevante Immunantwort festzustellen.

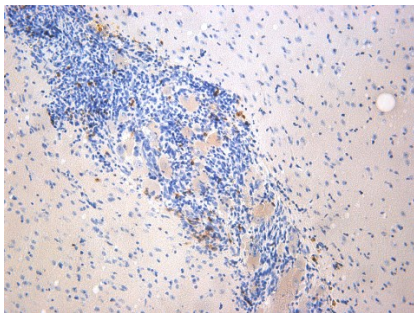


Abb. 3.9.2a: Antikörper gegen CD45, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 4, Kryostat-Schnitt 13, 20-fache Vergrößerung

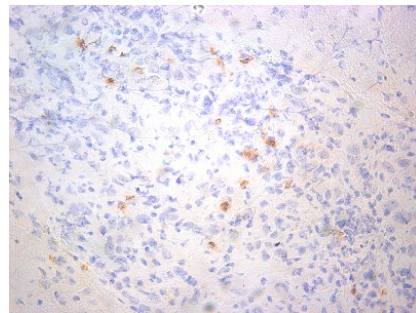


Abb. 3.9.2b: Antikörper gegen CD45, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 5, Kryostat-Schnitt 7

3.9.3 Antikörperfärbungen des Proliferationsmarkers Ki67

Um die Proliferationsaktivität *in vivo* zu beurteilen (65), wurden sowohl Kryostat- als auch Paraffinschnitte mit dem Antikörper Ki67 Klon SP6 von Zytomed gefärbt. Bei Ki67 handelt es sich um ein Protein, das die Proliferationsbereitschaft wiedergibt. Zellen in der G0-Phase des Zellzyklus produzieren kein Ki67. Bereits in vorangegangenen Arbeiten waren frühe und späte *in-vitro*-Passagen von transduzierten und auch Wild-Typ-Zellen mittels Ki67-Antikörper angefärbt und beurteilt worden (119). Hierbei zeigte sich, dass das Fehlen der p53-Funktion entscheidend für die Proliferationsbereitschaft der p53-defizienten Astrozyten im Vergleich zu Wildtyp-Kulturen war (119).

Sowohl die Tumore der Doxycyclin-behandelten als auch der unbehandelten Gruppen aus allen untersuchten Passagen (5. und 8.) waren immunpositiv für Ki67. In höheren Passagen nahm die Ki67-Immunreaktivität zu, so zeigten Tumorzellen der hier verwendeten 8. Passage mehr immunpositive Zellkerne für Ki67 als die der 5. Passage. Damit ist die Proliferation in der 8. Zellpassage höher als in der 5. Passage. Die Tumorzellen der 8. Passage waren bis zu 70 % immunreaktiv für Ki67. Es können auf diese Weise also Tumorzellen mit unterschiedlichen Proliferationsverhalten erzeugt werden. So konnten sowohl astrozytäre Tumore, die langsamer proliferieren (wenig Ki67 Immunreaktivität in den Tumoren der 5. Passage) als auch schnell wachsende Tumore mit hoher Immunexpression von Ki67 (Tumore der 8. Passage) generiert werden.

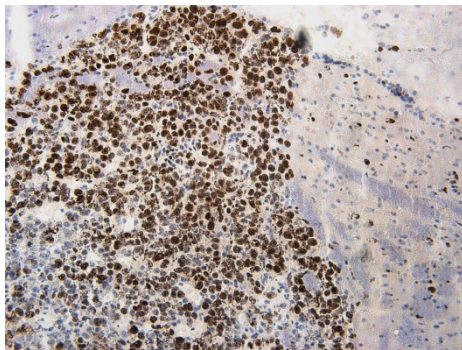


Abb. 3.9.3a: Antikörper gegen Ki 67, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 2, Schnitt 28

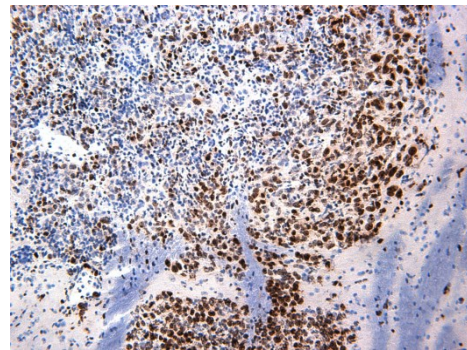


Abb. 3.9.3b: Antikörper gegen Ki 67, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7, Schnitt 14

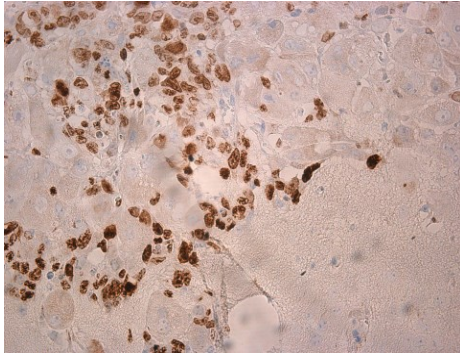


Abb. 3.9.3c: Antikörper gegen Ki 67, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10, Paraffinschnitt 105, 40-fache Vergrößerung

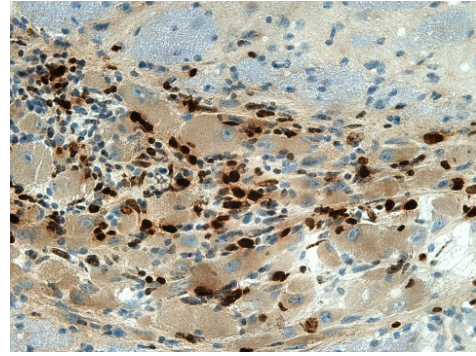


Abb. 3.9.3d: Antikörper gegen Ki 67, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 5, Schnitt 45, 40-fache Vergrößerung

Erstaunlich war, dass die großen Tumorzellen der AToM IV Reihe keine positive Immunreaktivität für Ki67 zeigten, somit befanden sie sich in der Ruhephase des Zellzyklus. Dies kann als Differenzierungskriterium gewertet werden.

Bei den Tumoren der Doxycyclin-behandelten Tiere lagen die Ki67-exprimierenden Zellen vor allem im Tumorrandbereich (Abb. 3.9.3b und Abb. 3.9.3e), während die Ki67-positiven Zellen der Doxycyclin-unbehandelten Tumore überall im Tumor zu finden waren (Abb. 3.9.3f). Die Häufung der „proliferationsstarken“ Zellen im Randbereich bei den Doxycyclin-behandelten Tumoren könnte ein Indiz für eine beginnende Infiltration in das umgebende Gewebe sein.

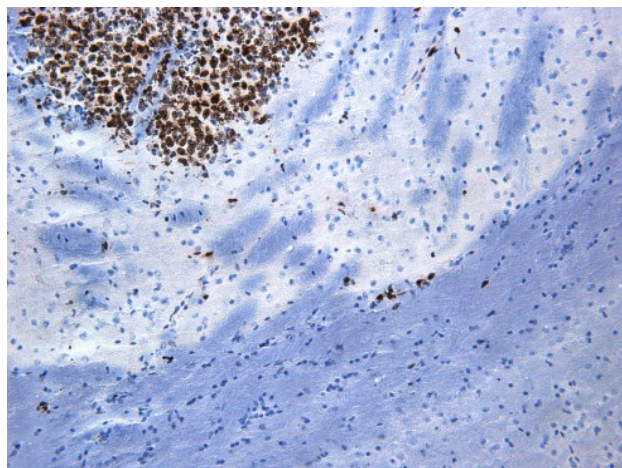


Abb. 3.9.3e: Antikörper gegen Ki 67, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7, Schnitt 16

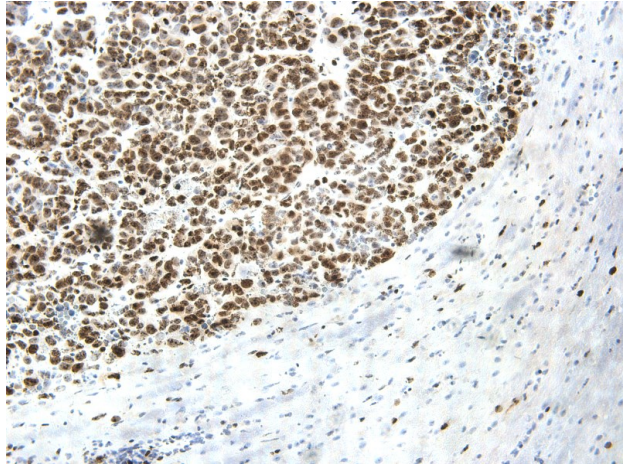


Abb. 3.9.3f: Antikörper gegen Ki67, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 2

3.9.4 Antikörperfärbungen gegen c-Myc

Die transduzierten Zellen sollten auch in vivo auf das enthaltene c-Myc getestet werden. Hierfür wurde der Antikörper gegen c-Myc (Y-69) verwendet. Die Tumorzellen zeigten eine hohe Expression des c-Myc, diese war bei den Tumorzellen der Doxycyclin-unbehandelten Tumore (Abb. 3.9.4a) stärker ausgeprägt, wohingegen die Tumorzellen bei den Doxycyclin-behandelten Tieren schwächer reagierten (Abb. 3.9.4b).

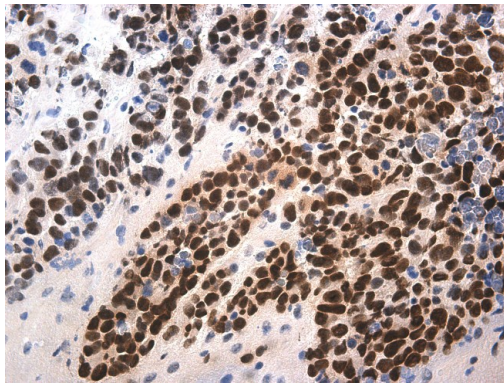


Abb. 3.9.4a: Antikörper gegen c-Myc, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 6, Schnitt 38, 40-fache Vergrößerung

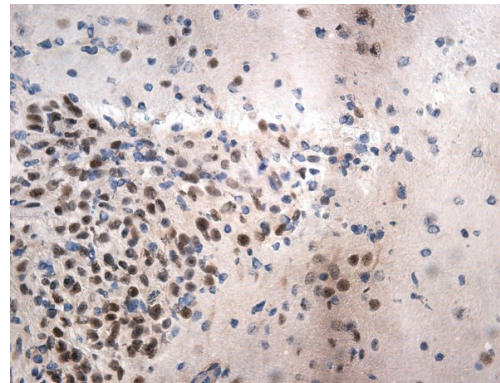


Abb. 3.9.4b: Antikörper gegen c-Myc, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7, Schnitt 69, 40-fache Vergrößerung

Die Unterschiede bei der c-Myc-Expression der Doxycyclin-behandelten und Doxycyclin-unbehandelten Tumore sind ein Hinweis für das Funktionieren des Tet-off-Systems in vivo sowohl in Tumoren aus der 5. als auch aus der 8. Zellpassage.

Bei den c-Myc (Y-69) Färbungen der Tumore der 5. Passage fiel zudem auf, dass die großen Tumorzellen nicht immunpositiv für c-Myc waren. Somit hatten sich aus den in-vitro-Tumorzellen der 5. Passage einige Zellen weiter differenziert (Abb. 3.9.4c). Die c-Myc- und Ki67-negativen Zellen zeigten eine positive Immunreaktion für das als Differenzierungsmarker fungierende Intermediärfilament Desmin (Abb. 3.9.7a).

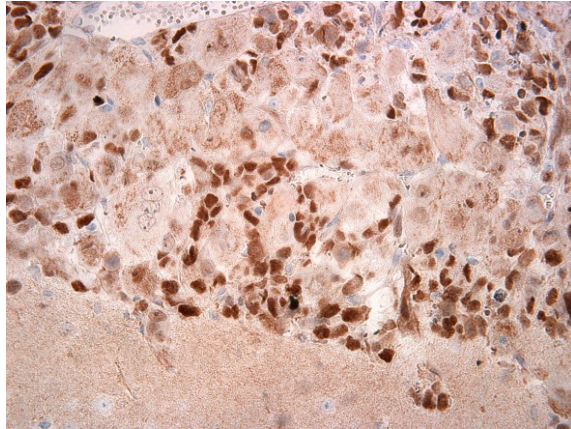


Abb. 3.9.4c: Antikörper gegen c-Myc, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10, Paraffinschnitt 90, 40-fache Vergrößerung

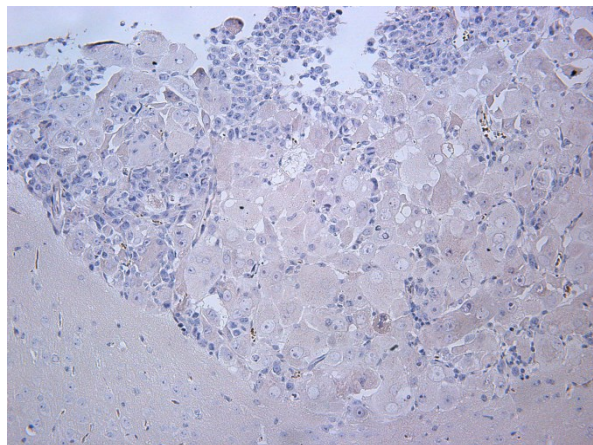


Abb. 3.9.4d: Negativkontrolle, Paraffinschnitt

3.9.5 Antikörperfärbungen gegen phospho-Akt (Ser473)

Das konstitutiv aktive myr-Akt sollte ebenfalls in vivo nachgewiesen werden. Dafür diente der Antikörper phospho-AKT (Ser 473), der zur Detektion von Akt mit Phosphorylierung an der Serinstelle 473 angewendet wird. Die Tumore aller Zellpassagen zeigten eine vermehrte Expression von Akt (Abb. 3.9.5a-d).

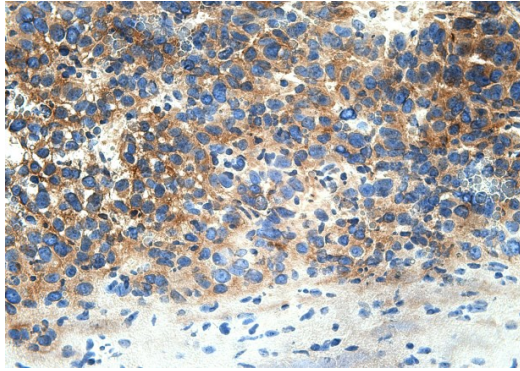


Abb. 3.9.5a: Antikörper gegen phospho-Akt, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 2, Schnitt 37

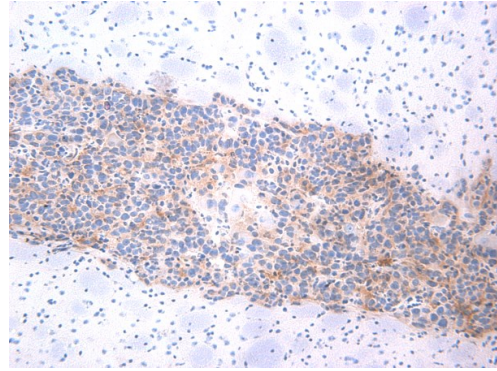


Abb. 3.9.5b: Antikörper gegen phospho-Akt, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 6, Kryostat-Schnitt

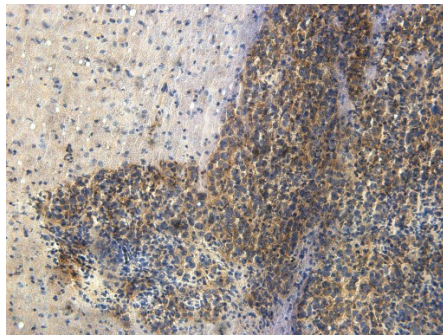


Abb. 3.9.5c: Antikörper gegen phospho-Akt, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 3, Kryostat-Schnitt

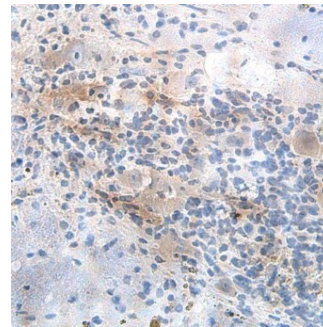


Abb. 3.9.5d: Antikörper gegen phospho-Akt, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 5, Kryostat-Schnitt

3.9.6 Antikörperfärbungen gegen CD31

Mittels Antikörper gegen CD 31 wurde versucht die Angiogenese in den entstandenen Tumoren nachzuweisen. Eine Immunreaktivität als Hinweis für Blutgefäßbildung war nur in den Doxyxclin-unbehandelten Tumoren der 8. Passage mit diesem Antikörper nachweisbar (Abb. 3.9.6a und b). Da bei der Begutachtung der Schnitte keine qualitativen Unterschiede zu sehen waren, wurde auf eine Quantifizierung verzichtet. In den Doxycyclin-behandelten Tumoren der 8. Passage war keine vermehrte Blutgefäßbildung im Vergleich zum normalen Hirngewebe zu eruieren (Abb. 3.9.6c).

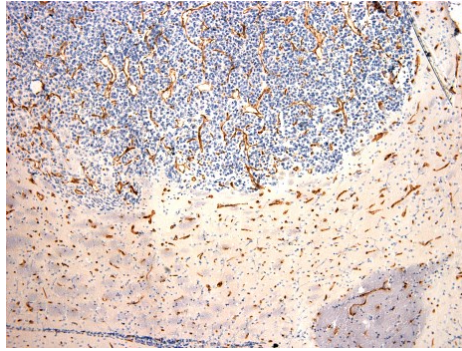


Abb. 3.9.6a: Antikörper gegen CD31, Versuchsreihe II,
Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 6,
Schnitt 19

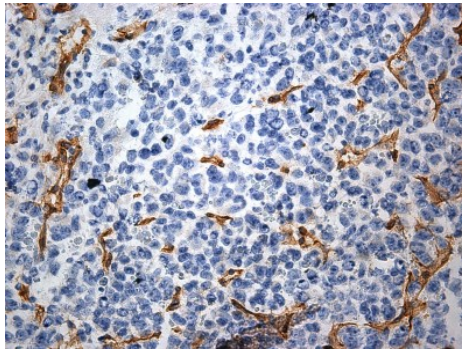


Abb. 3.9.6b: Antikörper gegen CD31, Versuchsreihe II,
Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 6,
Schnitt 23, 40-fache Vergrößerung

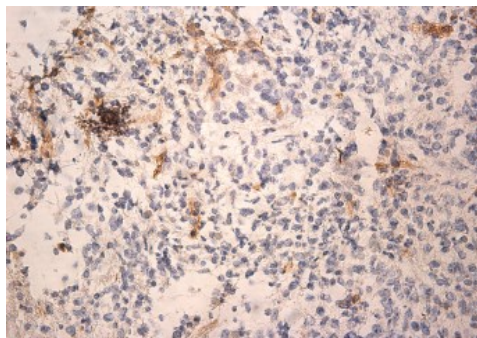


Abb. 3.9.6c: Antikörper gegen CD31, Versuchsreihe II,
Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7

3.9.7 Zelldifferenzierung

Zur Erfassung der Zelldifferenzierung wurden Antikörper für Desmin, MAP-2, Neurofilament, Olig2, sm-Actin und Vimentin eingesetzt. Ein besonderes Interesse galt dabei den großen c-Myc- und Ki67-negativen Tumorzellen der induzierten Tumore aus der 5. Zellpassage. Nur die großen Tumorzellen der AToM IV-Reihe zeigten sich immunpositiv für Desmin, die kleinen Tumorzellen waren hingegen Desmin-negativ. Die Desmin-positiven Zellen waren für MAP-2 immunnegativ. Zur weiteren Einordnung der generierten Tumorzellen diente ein Antikörper gegen Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor (OLIG2), die Immunreaktion fiel bei allen Färbungen negativ aus. Bei humanen Gliomen wird häufig eine positive Immunreaktion für diesen Transkriptionsfaktor beobachtet (84).

Die Vimentin-Antikörperfärbungen zum Nachweis einer mesenchymalen Herkunft waren negativ. Die immunhistochemischen Färbungen gegen Neurofilament zeigten eine ubiquitäre Färbung. Bis auf eine minimale Immunreaktion zwischen den großen Tumorzellen der 5. Passage, waren die Färbungen gegen sm-Actin negativ. Bei den Zellen der 5. Passage war eine Differenzierung zu großen Desmin-positiven Zellen (siehe Abb. 3.9.7a), aufgetreten, die sich nur in der Versuchsreihe der AToM IV-Zellen fand.

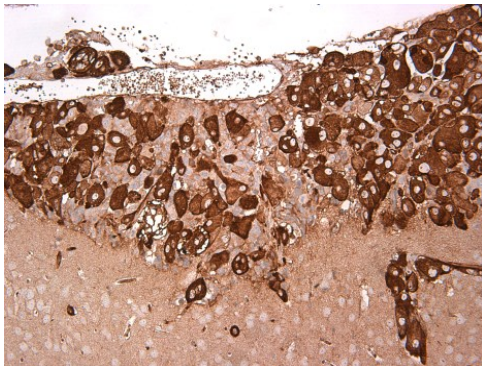


Abb. 3.9.7a: Antikörper gegen Desmin, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10

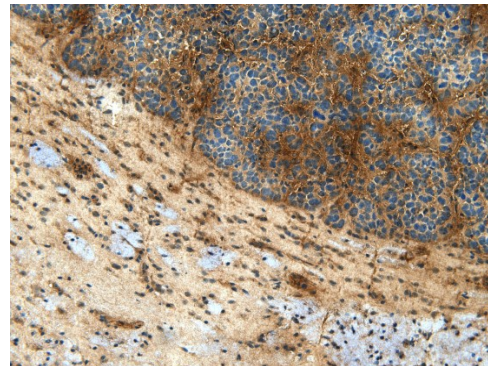
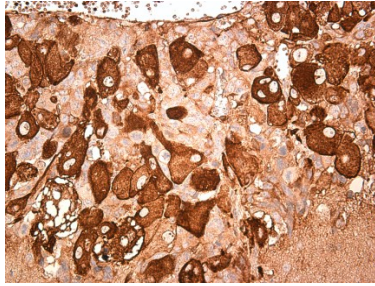


Abb. 3.9.7b: Antikörper gegen Desmin, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 6



Nur die großen Tumorzellen der AToM IV-Reihe zeigten sich immunpositiv für Desmin, die kleinen Tumorzellen waren hingegen Desmin negativ.

Ausschnittvergrößerung 40x aus Abb.

3.9.7a

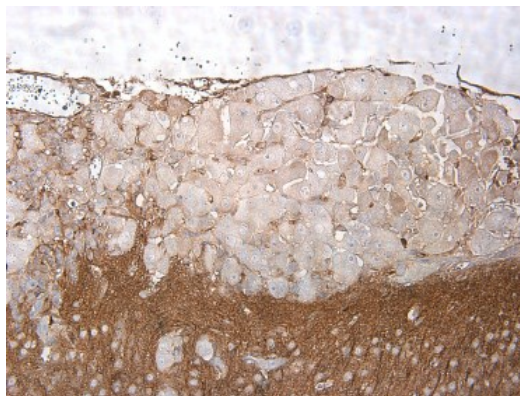


Abb. 3.9.7c: Antikörper gegen MAP-2, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10. Die Desmin positiven Zellen sind für MAP-2 immunnegativ.

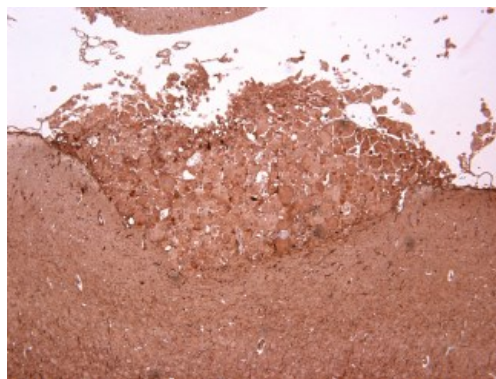


Abb. 3.9.7d: Antikörper gegen Neurofilament, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10. Die Neurofilamentfärbung zeigte eine globale Anreicherung und konnte nicht gewertet werden.

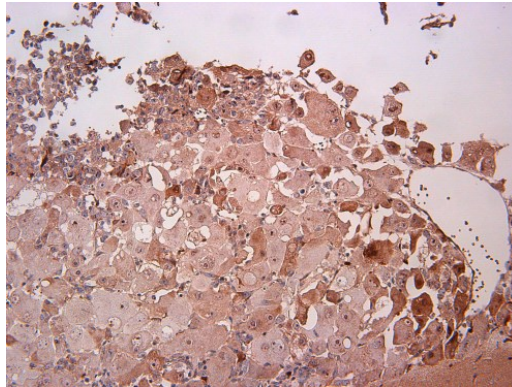


Abb. 3.9.7e: Antikörper gegen Olig 2, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10. Die Detektion der Oligodendroglia mit Olig2-Antikörper fiel ebenfalls bei allen Färbungen negativ aus. So waren die Tumorzellen nicht weiter zu oligodendroglialen Tumorzellen differenziert.

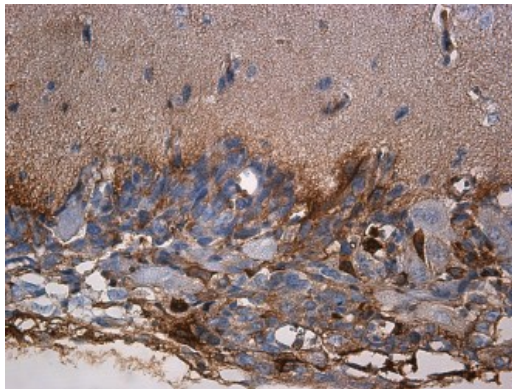


Abb. 3.9.7f: Antikörper gegen sm-Actin, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10. Glattnuskelaktin fand sich etwas zwischen den großen Tumorzellen der 5. Passage, sonst waren die Färbungen immunnegativ für sm-Actin.

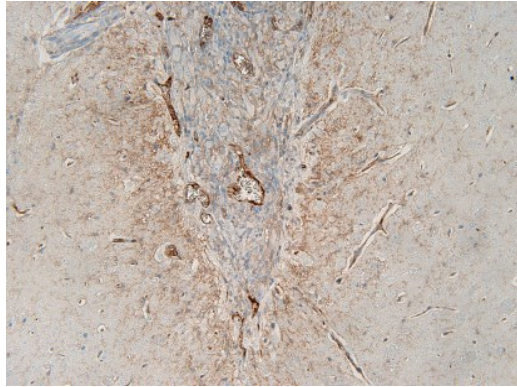


Abb. 3.9.7g: Antikörper gegen Vimentin, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 1. Auch die Vimentin-Färbungen blieben negativ.

3.9.8 Immunfluoreszenz mit α Ki67 und α c-Myc

Zur Verifizierung, dass die proliferativen Ki67 positiven Zellen auch die mit *c-myc* transduzierten Tumorzellen sind, wäre eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung sinnvoll gewesen. Da jedoch beide valide funktionierenden Antikörper Ki67 und c-Myc (Y-69) aus dem gleichen Wirt, dem Kaninchen stammten, war dies nicht möglich. Es wurden exemplarisch zwei benachbarte Schnitte, also Serienschnitte, des Tumors Nr. 10 AToM IV getrennt angefärbt. Als Orientierungsmarke diente ein deutlich erkennbares Blutgefäß, das sowohl in der grün-fluoreszierenden Ki67-Färbung mit Alexa Fluor (488) Goat α rabbit IgG (H+L) als auch in der rot-fluoreszierenden c-Myc-Färbung mit Alexa Fluor (568) Goat α rabbit IgG (H+L) deutlich zu erkennen ist. Das so entstandene Zellverteilungsmuster ist nahezu identisch. Die Befunde wurden zur Veranschaulichung grafisch zusammengesetzt, Abb. 3.9.8c. Die proliferativen Ki67-Zellen sind auch die immunpositiven für c-Myc.

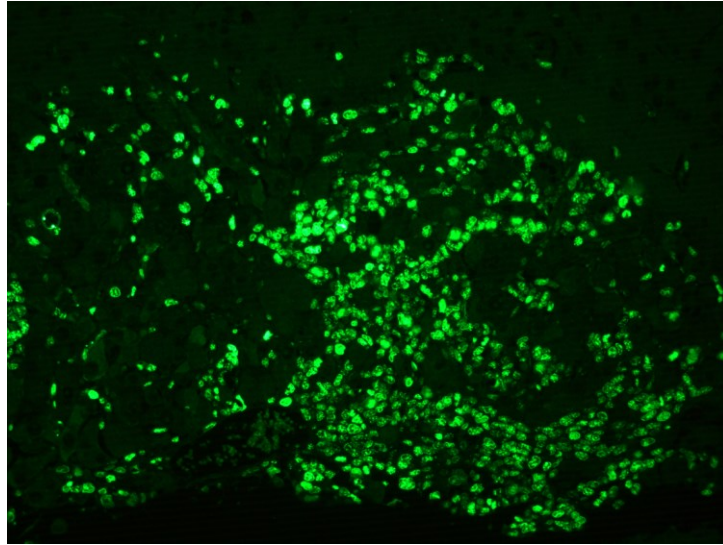


Abb. 3.9.8a: Grün-fluoreszierende Ki67-Färbung mit Alexa Fluor (488) Goat Antikörper gegen rabbit IgG (H+L), Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10, Schnitt 108

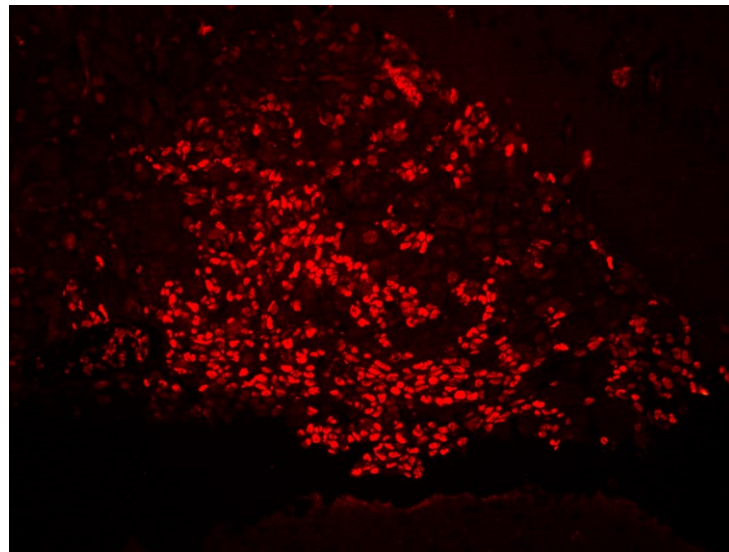


Abb. 3.9.8b: Rot-fluoreszierende c-Myc-Färbung mit Alexa Fluor (568) Goat Antikörper gegen rabbit IgG (H+L), Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 10, Schnitt 109

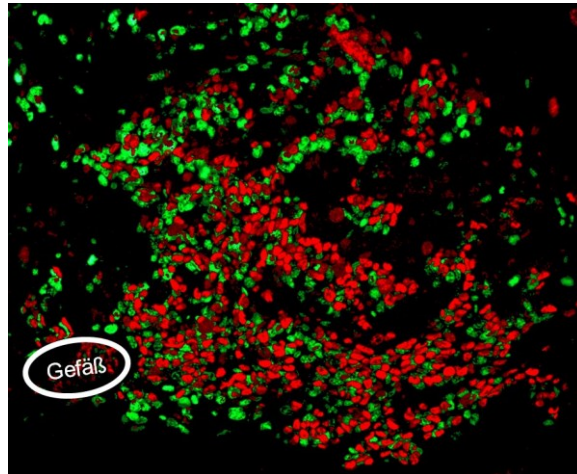


Abb. 3.9.8c: Graphische Bildzusammenfügung der Serienschritte 108 (Abb. 3.9.8a) und 109 (Abb. 3.9.8b) mit Gefäßanschnitt als Orientierung

3.10 Infiltration der Tumorzellen

Makroskopisch imponierten die Tumore aus der 8. Zellpassage rundlich und eher verdrängend wachsend. Histologisch waren bei einigen Doxycyclin-behandelten Tumoren kleine Tumorinseln in der Umgebung als erster Hinweis für eine Infiltrationstendenz zu sehen (siehe Abb. 3.10a-h). Dieser Befund war nur bei den makroskopisch sichtbaren Tumoren der 8. Passage nachweisbar. Die nur mikroskopisch detektierbaren Tumore der 5. Passage mit Doxycyclin-Gabe zeigten teils sehr kleine Tumorzellverbände, die nicht als infiltratives Tumorstadium gewertet werden konnten (siehe Abb. 3.10b).



Abb. 3.10a: HE-Färbung, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 3, Schnitt

40

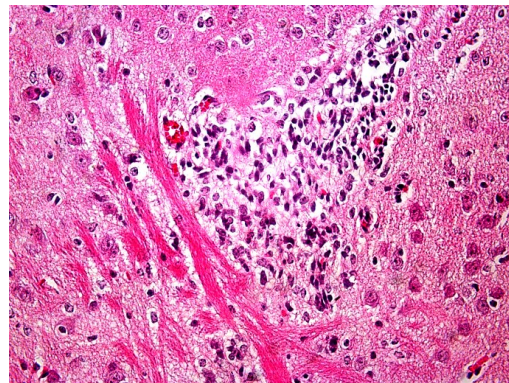


Abb. 3.10b: HE-Färbung, Versuchsreihe IV, Tumor aus AToM-Zellen (5. Passage), Versuchstier Nr. 5, Schnitt 40, 40-fache

Vergrößerung

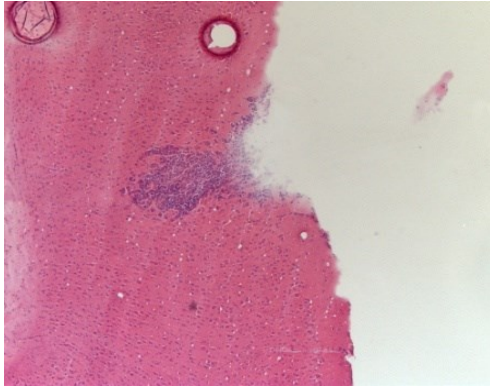


Abb. 3.10c: HE-Färbung, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 5, Schnitt

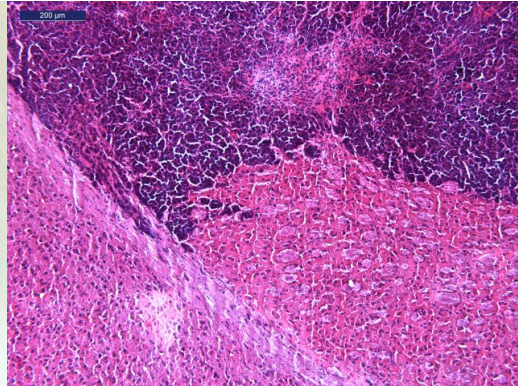


Abb. 3.10d: HE-Färbung, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 3

25

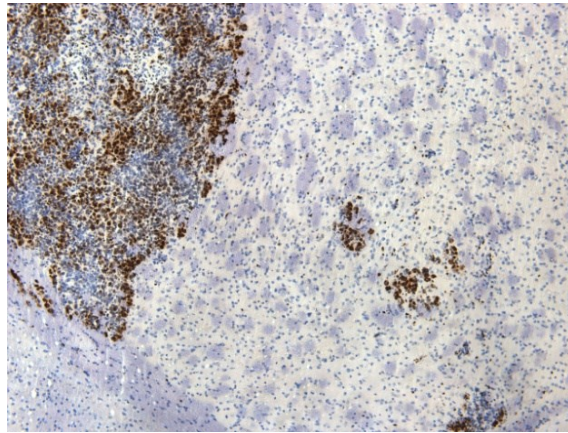


Abb. 3.10e: Antikörper gegen Ki67, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 3

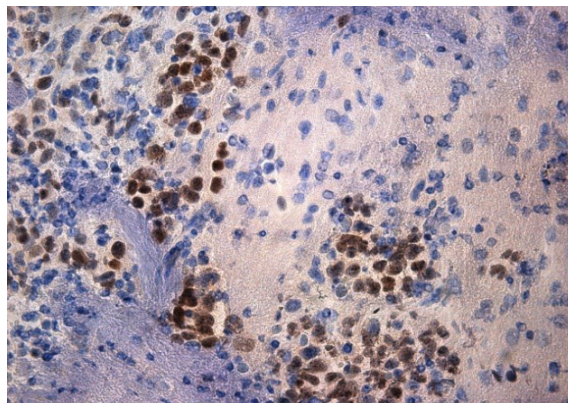


Abb. 3.10f: Antikörper gegen c-Myc, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7, 40-fache Vergrößerung

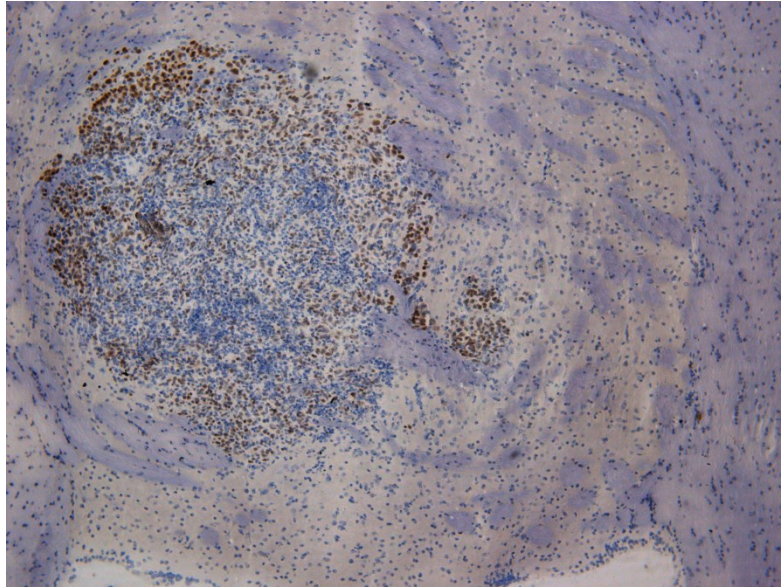


Abb. 3.10g: Antikörper gegen c-Myc, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7

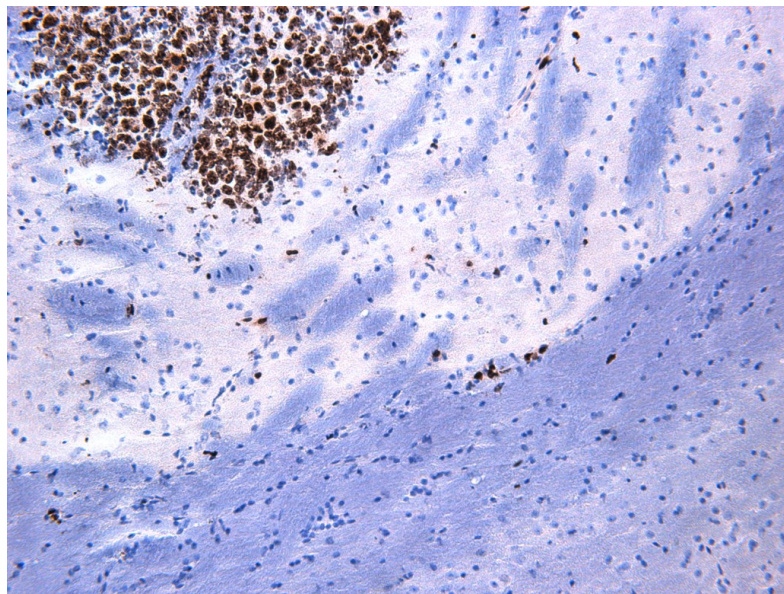


Abb. 3.10h: Antikörper gegen Ki67, Versuchsreihe II, Tumor aus AToM-Zellen (8. Passage), Versuchstier Nr. 7

4 Diskussion

4.1 Warum werden Gliommodelle benötigt?

Die Gliome stellen die größte Gruppe der malignen hirneigenen Tumore dar. Trotz intensiver Forschungsbemühungen ist eine Heilung bei höhergradigen Gliomen bislang nicht möglich, langfristige Remissionen sind auch mit multimodalen Therapiekonzepten nur selten zu erzielen (108, 131). Um die Biologie dieser Tumorentitäten besser zu verstehen und so eine Basis für die Prüfung potenzieller Therapieansätze zu schaffen, werden dringend entsprechende Tiermodelle benötigt.

4.2 Vorhandene Tumormodelle in der Grundlagenforschung

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden verschiedene Mausmodelle für die Tumorigenese etabliert. Bei den established cell lines (ECL)-Modellen werden in Zellkulturen von Wild-Typ-Mäusen mit chemischen Karzinogenen Tumormutationen induziert und die mutierten Zellen im Sinne eines Allograftmodells der gleichen Spezies implantiert (29, 64). Auch humane Astrozytomzellen können auf diese Weise in Mäuse eingesetzt werden (Xenograftmodell). Ein weiteres Xenograftmodell stellen die patient-derived xenografts (PDX) dar, bei denen definierte humane Astrozytomtumorzellen kultiviert und entweder immunkompetenten oder immundefizienten Mäusen injiziert werden (64, 95, 96). Bei anderen Modellen der letzten Jahre wurden Tumorzellen über humane neuronale Stammzell-(NSC)-Kulturen oder humane Astrozytenkulturen mit Onkogenmutationen erzeugt und diese Tumorzellen immundefizienten Mäusen implantiert (96). Auch Allograftmodelle mit genetisch veränderten Mäusen (genetically engineered mice, GEM) wurden zur Tumorigenesis in situ oder für eine Tumorinduktion über Zellkulturen (nGEM: non-germline genetically engineered mice) verwendet (24, 64).

4.3 Vorteile des primären astrozytären Mausmodells

Die Vorteile des hier beschriebenen primären astrozytären Mausmodells sind die bei Allograftmodellen geringere Immunreaktivität sowie die Schaffung einer Tumormikroumgebung durch die orthotope Implantation und damit die Annäherung an eine biologische Tumorwachstumsumgebung (64). Dies ist bei gängigen Xenograftmodellen, bei denen häufig auch heterotope Implantationen erfolgen, nicht der Fall (64, 96). Auch Immunre-

aktionen durch nicht wirtseigene Zellen können bei Xenograftmodellen das Tumorwachstum und die Reproduktion einer natürlichen Tumorumgebung verhindern (64).

In der vorliegenden Arbeit entschieden wir uns zur Verwendung primärer muriner Astrozyten mit einem p53-knock-out-Hintergrund, da viele primäre und sekundäre humane Astrozytome Mutationen des p53-Gens aufweisen (106). Die Auswahl der weiteren Proto-Onkogene für unser Modell orientierte sich an ebenfalls häufig bei der humanen Gliomentstehung beteiligten Signalwegen. Bei primären Glioblastomen finden sich oft eine EGFR-Amplifikation sowie auch PTEN-Mutationen (88, 135), weshalb ein Protoonkogen aus der EGFR/PTEN/Akt/mTOR-Signalkaskade gewählt wurde. Das konstitutiv aktive Akt schützt die Tumorzellen auch vor Apoptose und stabilisiert die Zellintegrität (69). Niedriggradige Astrozytome zeigen Überexpressionen des Onkogens *c-MYC* (61), so dass dieses Onkogen für die Steigerung und Steuerung der Proliferationsrate verwendet wurde (13).

4.4 Viraler Vektor und Proliferationssteuerung

Die Konsistenz der verwendeten Onkogene wurde mittels Antibiotika-Selektion mit Hygromycin und Puromycin gewährleistet und durch den visuellen Nachweis des Green-Fluoreszenz-Proteins in *c-Myc* bestätigt.

Die Proliferationssteuerung mit einem Tet-off-System über den Promotor auf *c-Myc* (9, 82) diente zunächst der Steuerung der Zellproliferation in der Kultur. In vivo ermöglichte die Proliferationssteuerung eine für die Tumorentwicklung nach Implantation ausreichende Verweildauer der Zellen. Bei früheren Tumormodellen ohne Proliferationssteuerung war es oft zu einer rasanten, unkontrollierten Zellvermehrung gekommen, ohne dass sich eine typische Tumorformation oder Infiltration ausbilden konnte (64).

4.5 Onkogenes Potential der AToM-Zellen

Astrozyten, denen p53 fehlt, entwickeln nach und nach einen transformierten Phänotyp (150). Die Veränderungen der Astrozyten bei der Entwicklung zu Tumorzellen durch retrovirale Infektionen mit den Plasmiden pBABE-Hygro-myr-FLAG-Akt und MIGRdeluxel TF-myc waren bereits in vorangegangenen Arbeiten untersucht worden (119, 133, 154, 155). Sie konnten hier in der Zellkultur phänotypisch reproduziert werden (Abb. 3.4a-c). Die zusätzliche Expression der Onkogene *c-Myc* und *Akt* in den hier beschriebenen transduzierten Astrozyten beschleunigt nicht nur die Proliferation, sondern auch die Mutationsanhäufung und Dedifferenzierung (69, 100, 125).

4.6 Proliferationsinduktion durch c-Myc und Steuerung mit Tet-off-System in vitro

Die Regulation der Proliferation der p53-knock-out-Astrozyten durch das Tet-off-System wurde in vitro und in vivo untersucht. Um einen möglichst breiten Regulationsbereich zu erzielen, wurden in Voruntersuchungen von Gero Weisbarth zwei verschiedene Tet-Promotoren getestet. Es wurde festgestellt, dass der ursprüngliche TRE-Promotor (49) nicht geeignet war. Hingegen konnte in den Arbeiten von Böhner (14) und Leuchtenberger (82) ein funktionsfähiges System entwickelt werden.

In unseren Experimenten wurde zunächst in unabhängigen in-vitro-Versuchsreihen die Funktionsfähigkeit des Tet-off-Systems belegt, sowohl für die ToM-Zellen ohne Akt als auch für AToM-Zellpopulationen mit Akt. Die Steuerung der Proliferationsrate gelang dabei über einen längeren Untersuchungszeitraum mit bis zu 10 Zellpassagen ohne Doxycyclin und auch nach repetitiver Supprimierung der Zellproliferation durch Doxycyclingabe.

Wie erwartet, war nur eine begrenzte Steigerung der Proliferationsrate in den in-vitro-Versuchen möglich. Dies ist dadurch erklärt, dass ab einem gewissen Zeitpunkt die Zellen nicht mehr genügend Vermehrungsraum im Well und nicht mehr genügend Nährstoffe im alle vier Tage erneuerten Medium finden. Weitere Erklärungen sind die Begrenzung der Kapazität der für die DNA- und Proteinsynthese zuständigen Zellorganellen sowie Seneszenz- und Apoptoseprozesse.

Dennoch zeigten insbesondere die Doxycyclin-unbehandelten Zellen eine kontinuierlich ansteigende Proliferationsrate über einen längeren Kultivierungszeitraum (siehe Abb. 3.6.1a.) Diese hohen Proliferationsraten sind durch die Rolle des Onkogens *c-Myc* im Zellzyklus zu erklären (13, 100). Die in-vitro-Versuchsreihen zeigen das ungehemmte Wachstumsverhalten durch *c-Myc*, das von Tumorzellen mit einer *c-MYC*-Amplifikation bekannt ist (100). Wenn das Tet-off-System ausgeschaltet wurde, näherte sich die Proliferationsrate der der Doxycyclin-unbehandelten, ungebremsten Kontrollgruppe weitgehend an. Dies war auch bei späteren Zellpassagen reproduzierbar, wie in Abb. 3.6.1b für Zellen der ToM-Gruppe 1 in der 7. Passage demonstriert.

Im Gegensatz zu ToM- oder AToM-Zellen zeigten Akt-/GFP- oder reine p53-knock-out-Zellen eine deutlich langsamere Proliferation. Bei transduzierten Akt-Zellen zeigte sich die antiapoptotische Wirkung insbesondere durch die anfänglich deutlich erhöhte Proliferationsrate (69, 125). Auch nach 22 Tagen ungehemmtem Zellwachstums ohne Doxycyclin war die Proliferationssteuerung mit Doxycyclin in der 8. Passage noch wirksam. Diese

Experimente zeigen auf reproduzierbare Weise, dass die transduzierten regulierbaren Astrozyten mindestens 2 Monate kultiviert werden konnten.

Auch mit kontinuierlicher Erhöhung der Proliferationsrate wurde durch Zugabe von Doxycyclin die Proliferation auf ähnliche Werte wie bei p53-knock-out-Astrozyten des gleichen Alters reduziert.

Diese Experimente belegen, dass mit diesem System mehrere Perioden schneller und langsamer Proliferation der transduzierten Astrozyten möglich sind.

4.7 Tumorinduktion und Regulation durch das Tet-off-System in vivo

Mit dem Nachweis der in-vitro-Funktionsfähigkeit der Tet-off-Proliferationssteuerung bei ToM- und AToM-Zellen wurde die in-vivo-Regulierbarkeit anhand des Tumorwachstums bei BL6-Mäusen nach stereotaktischer Implantation der Zellen untersucht.

Bei allen Versuchstieren, denen mit *Akt* und *c-myc* transduzierte AToM-Zellen implantiert wurden, entwickelten sich Tumore. Dagegen ließen sich durch ausschließlich mit *c-myc* und dem Tet-off-System transduzierte Zellen keine Tumore induzieren.

In einer ersten in-vivo-Versuchsreihe mit AToM-Zellen aus der 10. Zellkulturpassage zeigte sich ein ausgeprägtes, durch Doxycyclinaktivierung des Tet-off-Systems nicht kontrollierbares Tumorwachstum. Daraufhin wurden im Weiteren AToM-Zellen aus der 8. Zellpassage verwendet, die zunächst 8 Versuchstieren implantiert wurden. Bei 3 Tieren der Doxycyclin-behandelten Gruppe zeigte sich ein deutlich geringeres Tumorwachstum als in der Doxycyclin-unbehandelten Gruppe als Beleg für die Funktionsfähigkeit des Tet-off-Systems auch in vivo.

Bei einem Versuchstier (Maus Nr. 1) der Doxycyclin-behandelten Gruppe wurde ein ungebremses Tumorwachstum mit Entwicklung eines extrem großen Tumors mit einem Tumolvolumen von 117,43 mm³ beobachtet, der somit größer war, als die Tumore der Doxycyclin-unbehandelten Gruppe. Auch morphologisch imponierte dieser Tumor abweichend mit ausgeprägten Nekrosen wie in keinem anderen Tier dieser Versuchsgruppe. Offensichtlich sprachen die implantierten Tumorzellen dieses Mausindividuum nicht auf die Doxycyclingabe an, und das Tet-off-System funktionierte in diesem Fall nicht. Mögliche Erklärungen sind zusätzlich aufgetretene Mutationen mit Auswirkungen auf die Zellproliferation im Rahmen der genetischen Instabilität der Tumorzellen oder ein veränderter Tetracyclin-Metabolismus bei dieser Maus.

Weitere Untersuchungsreihen zeigten eine gute Funktionsfähigkeit des Tet-off-Systems in vivo bei Verwendung von Zellen aus früherer Zellpassagen, wie etwa der 5. Zellpassa-

ge in Versuchsreihe IV. Bei Verwendung von Zellen aus höheren Zellpassagen kann es dagegen zu einem Verlust der Funktionsfähigkeit des Tet-off-Systems kommen, was sich ab der 8. Zellpassage in unseren Versuchen zeigte. Welche Veränderungen zum Verlust der Regulierbarkeit des Tet-off-Systems führen, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Anzunehmen sind aber die Anhäufung weiterer genetischer Veränderungen mit onkogener Potenz und Aktivierung paralleler Signalwege für die Tumorpheriferation. Als Konsequenz dieser Ergebnisse muss für weitere Untersuchungen die Verwendung früherer Zellpassagen, wie der 5. Zellpassage, empfohlen werden.

Da die eingesetzten Tumorzellen bei jeder Versuchsreihe durch retrovirale Transduktion neu generiert wurden und die Verweildauer in Kultur auch durch den ständigen Selektionsdruck durch die Antibiotika im Kulturmedium begrenzt ist, steht mit diesem Ansatz keine definierte stabile Tumorzelllinie auf Dauer und zur Reproduktion der Ergebnisse zur Verfügung. Gleichzeitig eröffnet sich so aber die Möglichkeit Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften für die Implantation zu generieren. Während der Zeit in Kultur sind zusätzlich auftretende Veränderungen im genetisch instabilen Tumorzellgenom anzunehmen. Variable Parameter für die Erzeugung unterschiedlicher Zellen und Tumore mit heterogener Tumorbilogie sind dabei die Dauer in Kultur, die Anzahl der Zellpassagen sowie die Wachstumsdauer nach Implantation. So führten AToM-Zellen der IV. Versuchsreihe aus der 5. Zellpassage nach Implantation zu Tumoren mit sehr großen Tumorzellen unabhängig vom Einsatz der Proliferationsbremse durch Doxycyclin-Gabe. Neben den gezielt eingebrachten genetischen Aberrationen *myr-Akt* und *c-Myc* sind hierfür weitere akquirierte genetische Veränderungen zu postulieren (102, 105, 106). Gelingt es in Folgeuntersuchungen, einen Tumor mit optimalen Eigenschaften zu induzieren, sollte nach diesen zusätzlich aufgetretenen Mutationen gefahndet werden.

4.8 Ki67 und c-Myc-Nachweis in den induzierten Tumoren

In allen durch die implantierten Zellen induzierten Tumoren ließen sich positive immunhistochemische Reaktionen auf Ki67 und c-Myc nachweisen. Auffällig war hierbei, dass sich bei den Doxycyclin-behandelten, in der Proliferation gedrosselten Tumoren aus AToM II Zellen, die Ki67-positiven Zellen vor allem im Tumorrandgebiet zeigten, während sich bei den Doxycyclin-unbehandelten Tumoren eine ubiquitäre Immunreaktion auf Ki67 fand. Diese Beobachtung ist als Hinweis auf eine erhöhte Proliferationsbereitschaft im Tumorrandgebiet zu werten und entspricht einer Annäherung an das Verhalten natürlicher Tumore (30). Die für Ki67 immunpositiven Zellen waren in der Immunofluoreszenz

auch für c-Myc positiv, was als Beleg für eine gesteigerte Zellproliferation durch c-Myc gelten kann (115, 147).

4.9 Immunantwort auf die implantierten AToM-Zellen

Die mittels retroviraler Transduktion durch die Onkogene *c-Myc* und *Akt* in AToM-Zellen generierten p53-knock-out-Astrozyten führen in den BL6-Mäusen zu keiner ausgeprägten Immunreaktion. Dies konnte mit immunhistochemischen Färbungen für CD4, CD8 und MAC-1 (Abb. 3.9.1b, c, d) belegt werden (10). Eine fehlende Immunreaktion auf die implantierten Zellen ist eine wichtige Voraussetzung für ein erfolgreiches Mausmodell. Bei vielen früheren Mausmodellen zeigten sich deutliche Immunreaktionen mit Lymphozyteninfiltrationen und Einwanderung von Makrophagen (21, 64). Vor allem in Xenograftmodellen wie bei der Implantation humaner GBM-Zelllinien U251 und U87 in Nacktmäuse kommt es zu deutlichen Immunreaktionen mit Infiltration durch CD3 positive Lymphozyten (21). Auch für syngene GBM-Mausmodelle wie GL26 sind ausgeprägte Immunreaktionen beschrieben (21, 140). Diese Immunantworten auf die implantierten Zellen wurden in vielen Studien als Ursache für ein fehlendes Infiltrationsverhalten der Zellen angesehen (96, 126). Das Fehlen einer relevanten Immunreaktion ist ein wesentlicher Vorteil des hier beschriebenen Mausmodells.

4.10 Vergleich der induzierten Tumore mit humanen Gliomen

Mit dem beschriebenen Mausmodell konnten Tumore mit dem typischen „bunten Bild“ humaner Glioblastome mit Hyperzellularität und Pleomorphie der Tumorzellen hergestellt werden. Nach *Akt*-Transduktion geht die GFAP-Immunreaktivität verloren (119). So zeigten sich als Beleg einer astrozytäre Herkunft der Tumorzellen (66) nur wenige Tumorzellen immunpositiv auf GFAP.

Nicht sicher reproduziert werden konnte das typische Infiltrationsverhalten, auch wenn sich bei einigen Mausindividuen eine beginnende infiltrative Tendenz zeigte. Ebenso konnte keine Neovaskularisierung nachgeahmt werden (siehe Abb.3.9.6a-c).

Für die fehlende Tumorzellinfiltration in vivo könnte das verwendete Proto-Onkogen *c-Myc* verantwortlich sein. C-Myc spielt eine bedeutende Rolle bei der Proliferation, der Differenzierung und der genomischen Stabilität von Tumorzellen (25, 26). Daneben zeigt es aber weitere Effekte. So kann eine Myc-Aktivierung die Beweglichkeit von Zellen reduzieren (26, 115) und so Zellinvasivität sowie Wundheilung verzögern (86). Durch eine Überexpression von dMyc in *Drosophila* wurde die RasV12/IG1^{-/-}-Zellinvasion un-

terdrückt (89). Die JNK-Phosphorylierung wurde durch Koexpression von dMyc/dMax vermindert (13, 89). Auch wurde eine Steigerung der Zellinvasion bei Myc-Verlust beobachtet (89). Trotz weiterer tumorigener Wirkungen dürfte also die Verwendung von Myc eine Hemmung der Tumorzellinfiltration auch im hier beschriebenen Modell verursacht haben. Der Einsatz von *c-Myc* in murinen Gliommodellen ist deshalb grundsätzlich zu hinterfragen.

In Anbetracht der Kinetik der Gliominfiltration und des malignen Fortschreitens beim Menschen wird deutlich, dass die große Mehrheit der Tiermodelle, die Mäuse mit einer Lebensdauer von etwa zwei Jahren verwenden, mit Einschränkungen behaftet ist. Die meisten in vivo verfügbaren Gliommodelle bestehen aus eher bösartigen Tumorzellen, die eine hohe Proliferationsrate aufweisen und nur selten, wenn überhaupt eine charakteristische Gehirninfiltration beobachten lassen (21, 64, 81). Giese und Mitarbeiter fanden heraus, dass Astrozytomzellen in Abhängigkeit vom Substrat in vitro entweder proliferierten oder wanderten, und postulierten eine Dichotomie der beiden Parameter (46, 47). In den letzten Jahren wurde diese Hypothese durch die Entdeckung mehrerer Mechanismen bestätigt, z. B. durch Rezeptor-Wirkungen von EGFR (45) oder von EphB2-R (146), differentieller Transkriptionsfaktoraktivität (27), Mikro-RNAs (153) und Interaktion von Gliomzellen mit Neuroglia (109). Diese korrelieren mit dem „Go-or-Grow“-Verhalten von Gliomzellen (78). Sollte diese Hypothese allgemein zutreffen, würden stark proliferative Tumorzellen kaum im Gehirn der Maus migrieren. Wir haben versucht, diese Einschränkung mit bedingt proliferierenden Tumorzellen zu überwinden.

In einer früheren Studie exprimierte unsere Forschungsgruppe *c-Myc* und Myr-Akt konstitutiv in primären Astrozyten der Maus, die dann Stammzellenmerkmale erlangten und im Mausgehirn gliomagen waren (119). Die Tumorzellen waren jedoch nicht infiltrativ in das umgebende Hirngewebe und der Tumorrand ähnelte eher sekundären Gehirntumoren wie etwa einem metastasierenden Karzinom (119). Mit unserem Ansatz haben wir durch die Erzeugung langsam proliferierender Tumorzellen eine Basis für ein Migrationsverhalten der Tumorzellen geschaffen. Durch die bedingte Expression von *c-Myc* mittels Tet-off-System konnten wir die Proliferation der transduzierten Astrozyten kontrollieren.

Jedoch gilt diese "Go-or-Grow"-Hypothese (78) nicht für alle Umstände in der Gliombiologie, wie in einem Gliom-Modell gezeigt wurde, das den Einfluss der extrazellulären Matrixstabilität auf Gliomzellen bewertete. In dieser Studie wurden sowohl Migration als auch Proliferation durch die Stabilität des Wachstumsmediums proportional verändert (139). In vielen anderen Studien konnte bewiesen werden, dass die Invasion von Tumor-

zellen der Basalmembran, also das invasive Tumorwachstum, einen Zellzyklusarrest erfordert (75). Diese Hypothesen wurden jedoch in anderen Untersuchungen infrage gestellt. Zum einen zeigten diese, dass Tumorzellen gleichzeitig proliferieren und auch wandern können (30, 67, 137). Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass Tumorzellen ihre Proliferationsbereitschaft zugunsten der Migrationsbereitschaft reduzieren können und umgekehrt, dieses Verhalten wurde beispielsweise bei Melanomzellen gesehen (57).

Viele dieser Ansätze sind bei einer Etablierung eines murinen Gliommodells zu berücksichtigen. Wir konnten hier ein nicht immunreaktivierendes Allograft-Modell mit kontrollierbarer Proliferation und Dedifferenzierung der Tumorzellen entwickeln.

4.11 Aussichten

Das Ziel künftiger Untersuchungen muss es sein, die Allograftmodelle so weiter zu entwickeln, dass auch eine Zellinvasion sowie eine deutliche Neovaskularisierung induziert werden können und eine weitere Annäherung an das polymorphe Erscheinungsbild humaner Astrozytome gelingt. Hierzu ist es erforderlich, die Zusammenhänge zwischen der Zeitdauer der in-vitro-Kultur, der verwendeten Zellpassagen und den Eigenschaften der nach Implantation ausgelösten Tumoren noch besser zu verstehen.

Neben dem in dieser Arbeit belegten tumorigenen Potential der Onkogene *Akt* und *c-Myc* in p53-knock-out-Astrozyten können weitere Onkogene und Signalwege verwendet werden. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die mitochondriale serine Hydroxyl-Methyltransferase 2 (SHMT2), die das Invasionsverhalten von Glioblastomzellen fördert und in Hypoxiezonen dem Tumor einen Überlebensvorteil bringt (71). Untersuchungen bei urologischen Tumormausmodellen haben gezeigt, dass eine Überexpression dieser Transferase zu einer Proliferations- und Zellinvasionssteigerung führt (74).

Eine sichere Funktionsfähigkeit des Tet-off-Systems ermöglicht die Modifikation der Tumorbiologie. Die Bedingungen für die Funktionsfähigkeit in vivo sollten weiter untersucht und der in-vivo-Einsatz optimiert werden.

Neben dem hier verwendeten Zellkulturansatz lassen sich mit Organoidkulturen, bei denen eine Kulturhaltung in Matrigel erfolgt, Bedingungen der Mikroumgebung (136), zelluläre Hierarchien und Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen darstellen. Nach Implantation von Zellen aus Organoidkulturen kann in vivo ein invasives Verhalten reproduziert werden (62, 85). Die Entstehung verschiedener Mikroumgebungen durch mög-

liche Treibermutationen kann ebenfalls untersucht werden (23). Im Gegensatz zu der limitierten Verweildauer der Zellen in Kultur erlauben Organoidkulturen Untersuchungen über viele Monate und sogar Jahre. Organoidkulturen ermöglichen eine kontinuierliche Erforschung der Tumorbiologie und schaffen so die Grundlage für die Austestung von Therapieansätzen (62, 141, 142).

Eine weitere Möglichkeit die Invasionsfähigkeit der generierten Tumorzellen zu erhöhen wäre die Verwendung von Matrix Metalloproteinasen. Bereits in vielen vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass beispielsweise eine Erhöhung der MMP-2 oder -9-Expression mit einer Erhöhung der Zellinvasion ins Matrigel korreliert (98, 99). Auch konnte eine Erhöhung von TIMP-1 (Metallopeptidase inhibitor 1) in einer anderen Studie (2) eine Verminderung von ZNS-Entzündungsprozessen zeigen, dies veranschaulicht die Wichtigkeit dieser Proteine und bietet einen weiteren Ansatzpunkt.

Das in dieser Arbeit entwickelte murine Allograftmodell mit regulierbarer Proliferation ist eine vielversprechende Basis für die Weiterentwicklung der Grundlagenforschung der Gliome.

5 Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme des Menschen (GBM) entsteht entweder sekundär aus Astrozytomvorstufen oder de novo. Die vorliegenden Erkenntnisse der zugrundeliegenden molekulargenetischen Veränderungen und beteiligten Signalwege lassen weiter viele Fragen bei der Astrozytom- und Glioblastom-Entwicklung unbeantwortet. Die Fortschritte in der Grundlagenforschung wie auch bei den klinischen Therapieformen konnten die extrem schlechte Prognose dieser häufigsten primären Hirntumoren bisher kaum verbessern. Die neue WHO-Klassifikation der Gliome von 2016 berücksichtigt erstmals molekularbiologische Eigenschaften. Es werden dringend weiterentwickelte Modelle der Astrozytom- und Gliomentstehung für ein besseres Verständnis der Krankheitsentwicklung und als Basis für neue therapeutische Ansätze benötigt.

In bisherigen Forschungsarbeiten konnte an primären p53-knock-out-Astrozyten mit Aktivierung von myr-Akt und c-Myc eine maligne Zelltransformation erreicht werden. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte das Modell durch eine Proliferationssteuerung über ein Tet-System weiterentwickelt werden, um so die Tumorgenese in vivo modifizieren zu können. In dieser Arbeit wurde in primäre p53-knock-out-Astrozyten über retrovirale Plasmidtransduktionen myr-Akt und ein regulierbares c-Myc eingebaut. Die Regulation der Proliferation erfolgte dabei über ein pBabe-Promotor-gesteuertes Tet-System. Die Plasmide verfügten über verschiedene Antibiotika-Resistenzen um so eine Ausselektionierung zu erreichen. In Zellkulturen konnte eine gute Regulierbarkeit auch in höheren Passagen bestätigt werden. Auf dieser Grundlage erfolgten stereotaktische in-vivo-Versuche mit BL6-Mäusen. Diese zeigten, dass sich die Zellproliferation auch in vivo über entsprechende Tetracyclingaben steuern lässt. Die auf diesem Weg im Mausmodell induzierten Tumore zeigten nun deutlich besser als in früheren Modellen eine Multiformität und verschiedene Differenzierungen der Tumorzellen wie sie für das menschliche GBM typisch sind.

6 Summary

Human glioblastoma multiforme (GBM) is developing either secondary from astrocytoma precursors or emerges de novo. Available knowledge of the underlying molecular changes and involved pathways cannot answer many questions of gliomagenesis. Progress in scientific research and multimodal treatment has as yet failed to improve substantially the fatal clinical outcome in these most common primary brain tumors. The new WHO classification of 2016 includes for the first time biomarkers and molecular signatures. There is a need for further improved models of gliomagenesis to obtain a better understanding of the etiology and to stimulate clinical advancements.

In preceding studies a transformation of primary p53-knock-out-astrocyts into malignant cells was achieved by activation of myr-Akt and c-Myc. Aim of this study was the further development of the model by installing a tet-system based regulation facility to control and modify tumorigenesis in vivo. Myr-Akt and a controllable c-Myc were built in into primary p53-knock-out-astrocyts by retroviral plasmid transductions. Regulation of proliferation was attained by a pBabe-promotor-controlled tet-system. The used plasmids had several resistances to antibiotics for selection. In cell cultures we could verify a good controllability even in later cell passages. With these findings we added stereotactic in vivo trials with BL6 mice. It was proven that cell proliferation also in vivo could be regulated by tetracycline doses. The brain tumors induced by this mouse model showed much more typical features of GBM in comparison with previous models.

7 Literaturverzeichnis

1. Alcantara Llaguno, Sheila R.; Parada, Luis F. (2016): Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. In: *British journal of cancer* 115 (12), S. 1445–1450. DOI: 10.1038/bjc.2016.354.
2. Althoff, Gioia E. M.; Wolfer, David P.; Timmesfeld, Nina; Kanzler, Benoit; Schrewe, Heinrich; Pagenstecher, Axel (2010): Long-term expression of tissue-inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in the murine central nervous system does not alter the morphological and behavioral phenotype but alleviates the course of experimental allergic encephalomyelitis. In: *The American journal of pathology* 177 (2), S. 840–853. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090918.
3. Ambroise, M. Moses; Khosla, Charu; Ghosh, Mitra; Mallikarjuna, V. S.; Annapurneswari, S. (2010): The role of immunohistochemistry in predicting behavior of astrocytic tumors. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 11 (4), S. 1079–1084.
4. Amendola, D.; Salvo, M. de; Marchese, R.; Verga Falzacappa, C.; Stigliano, A.; Carico, E. et al. (2009): Myc down-regulation affects cyclin D1/cdk4 activity and induces apoptosis via Smac/Diablo pathway in an astrocytoma cell line. In: *Cell proliferation* 42 (1), S. 94–109. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2008.00576.x.
5. Arvanitis, Constadina; Felsher, Dean W. (2006): Conditional transgenic models define how MYC initiates and maintains tumorigenesis. In: *Seminars in cancer biology* 16 (4), S. 313–317. DOI: 10.1016/j.semcancer.2006.07.012.
6. Baeza, Nathalie; Weller, Michael; Yonekawa, Yasuhiro; Kleihues, Paul; Ohgaki, Hiroko (2003): PTEN methylation and expression in glioblastomas. In: *Acta neuropathologica* 106 (5), S. 479–485. DOI: 10.1007/s00401-003-0748-4.
7. Banerjee, M.; Dinda, A. K.; Sinha, S.; Sarkar, C.; Mathur, M. (1996): c-myc oncogene expression and cell proliferation in mixed oligo-astrocytoma. In: *International journal of cancer* 65 (6), S. 730–733. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19960315)65:6<730::AID-IJC3>3.0.CO;2.
8. Barekati, Zeinab; Radpour, Ramin; Kohler, Corina; Zhang, Bei; Toniolo, Paolo; Lenner, Per et al. (2010): Methylation profile of TP53 regulatory pathway and mtDNA alterations in breast cancer patients lacking TP53 mutations. In: *Human molecular genetics* 19 (15), S. 2936–2946. DOI: 10.1093/hmg/ddq199.

9. Baron, U.; Gossen, M.; Bujard, H. (1997): Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. In: *Nucleic acids research* 25 (14), S. 2723–2729.
10. Benveniste P, Chadwick BS, Miller RG, Reimann J. Characterization of cells with T cell markers in athymic nude bone marrow and of their in vitro-derived clonal progeny. Comparison with euthymic bone marrow. *J Immunol* 1990;144:411–419.
11. Berrouschot, Jörg (2015): *Klinikleitfaden Neurologie*. Hg. v. Jürgen Klingelhöfer. München: Elsevier, Urban & Fischer.
12. Blackwood, E. M.; Eisenman, R. N. (1991): Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. In: *Science (New York, N.Y.)* 251 (4998), S. 1211–1217.
13. Blackwood, E. M.; Lüscher, B.; Kretzner, L.; Eisenman, R. N. (1991): The Myc:Max protein complex and cell growth regulation. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 56, S. 109–117.
14. Böhner, S.; Gatz, C. (2001): Characterisation of novel target promoters for the dexamethasone-inducible/tetracycline-repressible regulator TGV using luciferase and isopentenyl transferase as sensitive reporter genes. In: *Molecular & general genetics: MGG* 264 (6), S. 860–870.
15. Brat, Daniel J.; Verhaak, Roel G. W.; Aldape, Kenneth D.; Yung, W. K. Alfred; Salama, Sofie R.; Cooper, Lee A. D. et al. (2015): Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. In: *The New England journal of medicine* 372 (26), S. 2481–2498. DOI: 10.1056/NEJMoa1402121.
16. Bronchud, Miguel H. (2004): *Principles of molecular oncology*. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press.
17. Burger, P. C.; Kleihues, P. (1989): Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implications for evaluation of needle biopsies. In: *Cancer* 63 (10), S. 2014–2023.
18. Burger, Peter Corson; Scheithauer, Bernd Walter; Vogel, Francis Stephen (1991): *Surgical pathology of the nervous system and its coverings*. [3rd ed.]. New York: Churchill Livingstone.
19. Burri, Stuart H.; Gondi, Vinai; Brown, Paul D.; Mehta, Minesh P. (2018): The Evolving Role of Tumor Treating Fields in Managing Glioblastoma: Guide for Oncologists. In: *American journal of clinical oncology* 41 (2), S. 191–196. DOI: 10.1097/COC.0000000000000395.

20. Butowski, Nicholas A. (2015): Epidemiology and diagnosis of brain tumors. In: *Continuum (Minneapolis, Minn.)* 21 (2 Neuro-oncology), S. 301–313. DOI: 10.1212/01.CON.0000464171.50638.fa.
21. Candolfi, Marianela; Curtin, James F.; Nichols, W. Stephen; Muhammad, Akm G.; King, Gwendalyn D.; Pluhar, G. Elizabeth et al. (2007): Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. In: *Journal of neuro-oncology* 85 (2), S. 133–148. DOI: 10.1007/s11060-007-9400-9.
22. Chen, Hao; Judkins, Jonathon; Thomas, Cheddhi; Wu, Meijing; Khoury, Laith; Benjamin, Carolina G. et al. (2017): Mutant IDH1 and seizures in patients with glioma. In: *Neurology* 88 (19), S. 1805–1813. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003911.
23. Chen, Zhihong; Hambarzumyan, Dolores (2018): Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1004. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01004.
24. Chow, Lionel M. L.; Baker, Suzanne J. (2012): Capturing the molecular and biological diversity of high-grade astrocytoma in genetically engineered mouse models. In: *Oncotarget* 3 (1), S. 67–77. DOI: 10.18632/oncotarget.425.
25. Claassen, G. F.; Hann, S. R. (2000): A role for transcriptional repression of p21^{CIP1} by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (17), S. 9498–9503. DOI: 10.1073/pnas.150006697.
26. Dang, C. V. (1999): c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. In: *Molecular and cellular biology* 19 (1), S. 1–11.
27. Dhruv, Harshil D.; McDonough Winslow, Wendy S.; Armstrong, Brock; Tuncali, Serdar; Eschbacher, Jenny; Kislin, Kerri et al. (2013): Reciprocal activation of transcription factors underlies the dichotomy between proliferation and invasion of glioma cells. In: *PloS one* 8 (8), e72134. DOI: 10.1371/journal.pone.0072134.
28. DiCiommo, David P.; Duckett, Allison; Burcescu, Irina; Bremner, Rod; Gallie, Brenda L. (2004): Retinoblastoma protein purification and transduction of retina and retinoblastoma cells using improved alphavirus vectors. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 45 (9), S. 3320–3329. DOI: 10.1167/iovs.04-0140.

29. Ding H, Nagy A, Gutmann DH, Guha A. A review of astrocytoma models. *Neurosurg Focus* 2000; 8:1-8.
30. Dissanayake, U.; Johnson, N. W.; Warnakulasuriya, K. A. A. S. (2003): Comparison of cell proliferation in the centre and advancing fronts of oral squamous cell carcinomas using Ki-67 index. In: *Cell proliferation* 36 (5), S. 255–264.
31. Eliaš, Ján (2017): Positive effect of Mdm2 on p53 expression explains excitability of p53 in response to DNA damage. In: *Journal of theoretical biology* 418, S. 94–104. DOI: 10.1016/j.jtbi.2017.01.038.
32. Engelhard, H. H.; Butler, A. B.; Bauer, K. D. (1989): Quantification of the c-myc oncoprotein in human glioblastoma cells and tumor tissue. In: *Journal of neurosurgery* 71 (2), S. 224–232. DOI: 10.3171/jns.1989.71.2.0224.
33. England, Bryant; Huang, Tianguai; Karsy, Michael (2013): Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34 (4), S. 2063–2074. DOI: 10.1007/s13277-013-0871-3.
34. Eoli, Marica; Menghi, Francesca; Bruzzone, Maria Grazia; Simone, Tiziana de; Valletta, Lorella; Pollo, Bianca et al. (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. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13 (9), S. 2606–2613. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2184.
35. Eyss, Björn von; Eilers, Martin (2011): Addicted to Myc--but why? In: *Genes & development* 25 (9), S. 895–897. DOI: 10.1101/gad.2053311.
36. Felsher, D. W.; Bishop, J. M. (1999): Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (7), S. 3940–3944.
37. Fine, H.; Barker, F.; Market, J.; Loeffler, J. Neoplasms of the central nervous system. In: Vita, VD., VII; Rosenberg, S; Hellman, S., editors. *Cancer principles and practice of oncology*. Lippincott; Philadelphia: 2005.
38. Fisher, G. H.; Orsulic, S.; Holland, E.; Hively, W. P.; Li, Y.; Lewis, B. C. et al. (1999): Development of a flexible and specific gene delivery system for production of murine tumor models. In: *Oncogene* 18 (38), S. 5253–5260. DOI: 10.1038/sj.onc.1203087.

39. Frosch, M.; Anthony, D.; Girolami, D. The central nervous system. In: Kumar, V.; Abbas, A.; Fausto, N.; editors. *Robbins and cotran pathologic basis of disease*. Elsevier; Amsterdam: 2005.
40. Fujisawa, H.; Reis, R. M.; 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. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80 (1), S. 65–72.
41. Furnari, Frank B.; Fenton, Tim; Bachoo, Robert M.; Mukasa, Akitake; Stommel, Jayne M.; Stegh, Alexander et al. (2007): Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. In: *Genes & development* 21 (21), S. 2683–2710. DOI: 10.1101/gad.1596707.
42. Gage, Fred H.; Temple, Sally (2013): Neural stem cells: generating and regenerating the brain. In: *Neuron* 80 (3), S. 588–601. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.10.037.
43. Gajjar, Madhavsai; Candeias, Marco M.; Malbert-Colas, Laurence; Mazars, Anne; Fujita, Jun; Olivares-Illana, Vanesa; Fähræus, Robin (2012): The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls Mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage. In: *Cancer cell* 21 (1), S. 25–35. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.11.016.
44. Gao, X.; Kemper, A.; Popko, B. (1999): Advanced transgenic and gene-targeting approaches. In: *Neurochemical research* 24 (9), S. 1181–1188.
45. Ghosh, P.; Beas, A.O.; Bornheimer, S.J.; Garcia-Marcos, M.; Forry, E.P.; Johannson, C.; Ear, J.; Jung, B.H.; Cabrera, B.; Carethers, J.M.; Farquhar, M.G. (2010): A G α -GIV molecular complex binds epidermal growth factor receptor and determines whether cells migrate or proliferate. *Molecular biology of the cell*, 21(13), 2338–2354. doi:10.1091/mbc.E10-01-0028
46. Giese, A.; Bjerkvig, R.; Berens, M. E.; Westphal, M. (2003): Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (8), S. 1624–1636. DOI: 10.1200/JCO.2003.05.063.
47. Giese, A.; Loo, M. A.; Tran, N.; Haskett, D.; Coons, S. W.; Berens, M. E. (1996): Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. In: *International journal of cancer* 67 (2), S. 275–282. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19960717)67:2<275::AID-IJC20>3.0.CO;2-9.

48. Gossen M, Bujard H. (1995): Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary. *Biotechniques*.;19(2):213-6; discussion 6-7.
49. Gossen M, Bujard H.(1992):Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;89(12):5547-51.
50. Gresner, Sylwia M.; Rieske, Piotr; Wozniak, Krystyna; Piaskowski, Sylwester; Jaskolski, Dariusz J.; Skowronski, Wiesław et al. (2007): Gliomas: association of histology and molecular genetic analysis of chromosomes 1p, 10q, and 19q. In: *Acta neurobiologiae experimentalis* 67 (2), S. 103–112.
51. Grignani, F.; Kinsella, T.; Mencarelli, A.; Valtieri, M.; Riganelli, D.; Grignani, F.; Lanfrancone, L.; Peschle, C.; Nolan, P. G.; Pelicci, G. P. (1981): High-Efficiency Gene Transfer and Selection of Human Hematopoietic Progenitor Cells with a Hybrid EBV/Retroviral Vector Expressing the Green Fluorescence Protein1. *In Cancerresearch* 58, 14-19.
52. Guo, Pin; Nie, Quanmin; Lan, Jin; Ge, Jianwei; Qiu, Yongming; Mao, Qing (2013): C-Myc negatively controls the tumor suppressor PTEN by upregulating miR-26a in glioblastoma multiforme cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 441 (1), S. 186–190. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.034.
53. Hacke, Werner; Poeck, Klaus (2010): Neurologie. Mit 83 Tabellen. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).
54. Hainaut, P. (1995): The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. In: *Current opinion in oncology* 7 (1), S. 76–82.
55. Han, Feng; Hu, Rong; Yang, Hua; Liu, Jian; Sui, Jianmei; Xiang, Xin et al. (2016): PTEN gene mutations correlate to poor prognosis in glioma patients: a meta-analysis. In: *Oncotargets and therapy* 9, S. 3485–3492. DOI: 10.2147/OTT.S99942.
56. Herrlinger, Ulrich; Tzaridis, Theophilos; Mack, Frederic; Steinbach, Joachim Peter; Schlegel, Uwe; Sabel, Michael et al. (2019): Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. In: *Lancet (London, England)* 393 (10172), S. 678–688. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31791-4.

57. Hoek, Keith S.; Eichhoff, Ossia M.; Schlegel, Natalie C.; Döbbeling, Udo; Kobert, Nikita; Schaerer, Leo et al. (2008): In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. In: *Cancer research* 68 (3), S. 650–656. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2491.
58. Hofer, Silvia; Rushing, Elisabeth; Preusser, Matthias; Marosi, Christine (2014): Molecular biology of high-grade gliomas: what should the clinician know? In: *Chinese journal of cancer* 33 (1), S. 4–7. DOI: 10.5732/cjc.013.10218.
59. Holland, E. C.; Celestino, J.; Dai, C.; Schaefer, L.; Sawaya, R. E.; Fuller, G. N. (2000): Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. In: *Nature genetics* 25 (1), S. 55–57. DOI: 10.1038/75596.
60. Holland, E. C.; Varmus, H. E. (1998): Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (3), S. 1218–1223.
61. Huang, H.; Colella, S.; Kurrer, M.; Yonekawa, Y.; Kleihues, P.; Ohgaki, H. (2000): Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. In: *Cancer research* 60 (24), S. 6868–6874.
62. Hubert, Christopher G.; Rivera, Maricruz; Spangler, Lisa C.; Wu, Qiulian; Mack, Stephen C.; Prager, Briana C. et al. (2016): A Three-Dimensional Organoid Culture System Derived from Human Glioblastomas Recapitulates the Hypoxic Gradients and Cancer Stem Cell Heterogeneity of Tumors Found In Vivo. In: *Cancer research* 76 (8), S. 2465–2477. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2402.
63. Jacks, T.; Remington, L.; Williams, B. O.; Schmitt, E. M.; Halachmi, S.; Bronson, R. T.; Weinberg, R. A. (1994): Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. In: *Current biology : CB* 4 (1), S. 1–7.
64. Janbazian, Loury; Karamchandani, Jason; Das, Sunit (2014): Mouse models of glioblastoma: lessons learned and questions to be answered. In: *Journal of neuro-oncology* 118 (1), S. 1–8. DOI: 10.1007/s11060-014-1401-x.
65. Jaros, E.; Perry, R. H.; Adam, L.; Kelly, P. J.; Crawford, P. J.; Kalbag, R. M. et al. (1992): Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumours. In: *British journal of cancer* 66 (2), S. 373–385.

66. Jones, T. R.; Bigner, S. H.; Schold, S. C.; Eng, L. F.; Bigner, D. D. (1981): Anaplastic human gliomas grown in athymic mice. Morphology and glial fibrillary acidic protein expression. In: *The American journal of pathology* 105 (3), S. 316–327.
67. Kagawa, Yoshinori; Matsumoto, Shinji; Kamioka, Yuji; Mimori, Koshi; Naito, Yoko; Ishii, Taeko et al. (2013): Cell cycle-dependent Rho GTPase activity dynamically regulates cancer cell motility and invasion in vivo. In: *PloS one* 8 (12), e83629. DOI: 10.1371/journal.pone.0083629.
68. Kamijo, T.; Weber, J. D.; Zambetti, G.; Zindy, F.; Roussel, M. F.; Sherr, C. J. (1998): Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (14), S. 8292–8297.
69. Kennedy, Scott G.; Kandel, Eugene S.; Cross, Torry K.; Hay, Nissim (1999): Akt/Protein Kinase B Inhibits Cell Death by Preventing the Release of Cytochrome c from Mitochondria. In: *Mol. Cell. Biol.* 19 (8), S. 5800–5810. DOI: 10.1128/MCB.19.8.5800.
70. Khachigian, L. M.; Field, S. L.; Crouch, R.; Chesterman, C. N. (1995): Platelet-derived growth factor A-chain synthetic peptide inhibits human glioma xenograft proliferation in nude mice. In: *Anticancer research* 15 (2), S. 337–341.
71. Kim, Dohoon; Fiske, Brian P.; Birsoy, Kivanc; Freinkman, Elizaveta; Kami, Kenjiro; Possemato, Richard L. et al. (2015): SHMT2 drives glioma cell survival in ischaemia but imposes a dependence on glycine clearance. In: *Nature* 520 (7547), S. 363–367. DOI: 10.1038/nature14363.
72. Kim, Young Yeon; Jee, Hye Jin; Um, Jee-Hyun; Kim, Young Mi; Bae, Sun Sik; Yun, Jeanho (2017): Cooperation between p21 and Akt is required for p53-dependent cellular senescence. In: *Aging cell*. DOI: 10.1111/ace1.12639.
73. Kleihues, P.; Lübbe, J.; Watanabe, K.; Ammon, K. von; Ohgaki, H. (1994): Genetic alterations associated with glioma progression. In: *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 78, S. 43–47.
74. Knüchel-Clarke, R.; Hartmann, A. (2015): Sitzungsbericht der AG Uropathologie der Deutschen Gesellschaft für Pathologie 2015. In: *Pathologe*. DOI 10.1007/s00292-015-0069-0.

75. Kohrman, Abraham Q.; Matus, David Q. (2017): Divide or Conquer: Cell Cycle Regulation of Invasive Behavior. In: *Trends in cell biology* 27 (1), S. 12–25. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.08.003.
76. Kuchino, Y.; Asai, A.; Kitanaka, C. (1996): Myc-mediated apoptosis. In: *Progress in molecular and subcellular biology* 16, S. 104–129.
77. Lai, Z.; Ferry, K. V.; Diamond, M. A.; Wee, K. E.; Kim, Y. B.; Ma, J. et al. (2001): Human mdm2 mediates multiple mono-ubiquitination of p53 by a mechanism requiring enzyme isomerization. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (33), S. 31357–31367. DOI: 10.1074/jbc.M011517200.
78. Lamszus, K., Kathagen, A., Holz, M., Schulte, A., & Westphal, M. (2014). "GO OR GROW" - LINKS BETWEEN CELLULAR FUNCTION, GLUCOSE METABOLISM AND GLIOMA MICROENVIRONMENT. *Neuro-Oncology*, 16(Suppl 3), 6.
79. Lang, F. F.; Miller, D. C.; Koslow, M.; Newcomb, E. W. (1994): Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. In: *Journal of neurosurgery* 81 (3), S. 427–436. DOI: 10.3171/jns.1994.81.3.0427.
80. Lassman, Andrew B.; Dai, Chengkai; Fuller, Gregory N.; Vickers, Andrew J.; Holland, Eric C. (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. In: *Neuron glia biology* 1 (2), S. 157–163. DOI: 10.1017/s1740925x04000249.
81. Lenting, Krissie; Verhaak, Roel; Ter Laan, Mark; Wesseling, Pieter; Leenders, William (2017): Glioma: experimental models and reality. In: *Acta neuropathologica* 133 (2), S. 263–282. DOI: 10.1007/s00401-017-1671-4.
82. Leuchtenberger, S.; Perz, A.; Gatz, C.; Bartsch, J. W. (2001): Conditional cell ablation by stringent tetracycline-dependent regulation of barnase in mammalian cells. In: *Nucleic acids research* 29 (16), E76.
83. Lew, C.R.; Guin, S.;Theodorescu, D. (2015): Targeting glycogene metabolism in bladder cancer. In: *Nat Rev Urol* 12 (7): S. 383-391.
84. Ligon KL, Alberta JA, Kho AT, Weiss J, Kwaan MR, Nutt CL, Louis DN, Stiles CD, Rowitch DH. The Oligodendroglial Lineage Marker OLIG2 Is Universally

Expressed in Diffuse Gliomas, J, *Neuropathol Exp Neurol* 2004 May; 63(5): 499-509.

85. Linkous, Amanda; Balamatsias, Demosthenes; Snuderl, Matija; Edwards, Lincoln; Miyaguchi, Ken; Milner, Teresa et al. (2019): Modeling Patient-Derived Glioblastoma with Cerebral Organoids. In: *Cell reports* 26 (12), 3203-3211.e5. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.02.063.
86. Liu, Hong; Radisky, Derek C.; Yang, Dun; Xu, Ren; Radisky, Evette S.; Bissell, Mina J.; Bishop, J. Michael (2012): MYC suppresses cancer metastasis by direct transcriptional silencing of αv and $\beta 3$ integrin subunits. In: *Nature cell biology* 14 (6), S. 567–574. DOI: 10.1038/ncb2491.
87. Louis, David N.; Ohgaki, Hiroko; Wiestler, Otmar D.; Cavenee, Webster K.; Burger, Peter C.; Jouvett, Anne et al. (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. In: *Acta neuropathologica* 114 (2), S. 97–109. DOI: 10.1007/s00401-007-0243-4.
88. Louis, David N.; Perry, Arie; Reifenberger, Guido; Deimling, Andreas von; Figarella-Branger, Dominique; Cavenee, Webster K. et al. (2016): The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. In: *Acta neuropathologica* 131 (6), S. 803–820. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
89. Ma, X.; Huang, J.; Tian, Y.; Chen, Y.; Yang, Y.; Zhang, X. et al. (2017): Myc suppresses tumor invasion and cell migration by inhibiting JNK signaling. In: *Oncogene* 36 (22), S. 3159–3167. DOI: 10.1038/onc.2016.463.
90. Maher, Elizabeth A.; Brennan, Cameron; Wen, Patrick Y.; Durso, Laura; Ligon, Keith L.; Richardson, Aaron et al. (2006): Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. In: *Cancer research* 66 (23), S. 11502–11513. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2072.
91. Maher, E.; McKee, A. Neoplasms of the central nervous system. In: Skarin, A. III; editor. *Atlas of diagnostic oncology*. Elsevier; Amsterdam: 2003.
92. McLure, K. G.; Lee, P. W. (1998): How p53 binds DNA as a tetramer. In: *The EMBO journal* 17 (12), S. 3342–3350. DOI: 10.1093/emboj/17.12.3342.
93. McLure, K. G.; Lee, P. W. (1999): p53 DNA binding can be modulated by factors that alter the conformational equilibrium. In: *The EMBO journal* 18 (3), S. 763–770. DOI: 10.1093/emboj/18.3.763.

94. McNeill, Robert S.; Schmid, Ralf S.; Bash, Ryan E.; Vitucci, Mark; White, Kristen K.; Werneke, Andrea M. et al. (2014): Modeling astrocytoma pathogenesis in vitro and in vivo using cortical astrocytes or neural stem cells from conditional, genetically engineered mice. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (90), e51763. DOI: 10.3791/51763.
95. Miura, Flávio K.; Alves, Maria José Ferreira; Rocha, Mussya Cisotto; Silva, Roseli S.; Oba-Shinjo, Sueli M.; Uno, M. et al. (2008): Experimental model of C6 brain tumors in athymic rats. In: *Arquivos de neuro-psiquiatria* 66 (2A), S. 238–241.
96. Miura, Flávio Key; Alves, Maria Jose Ferreira; Rocha, Mussya Cisotto; da Silva, Roseli; Oba-Shinjo, Sueli Miekko; Marie, Suely Kazue Nagahashi (2010): Xenograft transplantation of human malignant astrocytoma cells into immunodeficient rats: an experimental model of glioblastoma. In: *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* 65 (3), S. 305–309. DOI: 10.1590/S1807-59322010000300011.
97. Müllhardt, Cornel (2013): *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. 7., aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg (Der Experimentator). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-34636-1>.
98. Nakada, M.; Kita, D.; Futami, K.; Yamashita, J.; Fujimoto, N.; Sato, H.; Okada, Y. (2001): Roles of membrane type 1 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in invasion and dissemination of human malignant glioma. In: *Journal of neurosurgery* 94 (3), S. 464–473. DOI: 10.3171/jns.2001.94.3.0464.
99. Nakada, Mitsutoshi; Okada, Yasunori; Yamashita, Junkoh (2003): The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8, e261-9.
100. Nesbit, C. E.; Tersak, J. M.; Prochownik, E. V. (1999): MYC oncogenes and human neoplastic disease. In: *Oncogene* 18 (19), S. 3004–3016. DOI: 10.1038/sj.onc.1202746.
101. Network, The Cancer Genome Atlas Research (2013): Corrigendum: Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. In: *Nature* 494 (7438), S. 506. DOI: 10.1038/nature11903.
102. Noble, Mark; Dietrich, Joerg (2004): The complex identity of brain tumors: emerging concerns regarding origin, diversity and plasticity. In: *Trends in neurosciences* 27 (3), S. 148–154. DOI: 10.1016/j.tins.2003.12.007.

103. Nobusawa, Sumihito; Watanabe, Takuya; Kleihues, Paul; Ohgaki, Hiroko (2009): IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (19), S. 6002–6007. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0715.
104. Oda, Yazmin; Orr, Brent A.; Bell, W. Robert; Eberhart, Charles G.; Rodriguez, Fausto J. (2013): cMYC expression in infiltrating gliomas: associations with IDH1 mutations, clinicopathologic features and outcome. In: *Journal of neuro-oncology* 115 (2), S. 249–259. DOI: 10.1007/s11060-013-1221-4.
105. Ohgaki, Hiroko; Burger, Peter; Kleihues, Paul (2014): Definition of primary and secondary glioblastoma--response. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20 (7), S. 2013. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0238.
106. Ohgaki, Hiroko; Dessen, Pierre; Jourde, Benjamin; Horstmann, Sonja; Nishikawa, Tomofumi; Di Patre, Pier-Luigi et al. (2004): Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. In: *Cancer research* 64 (19), S. 6892–6899. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1337.
107. Ohgaki, Hiroko; Kleihues, Paul (2005): Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 64 (6), S. 479–489.
108. Ohgaki, Hiroko; Kleihues, Paul (2007): Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. In: *The American journal of pathology* 170 (5), S. 1445–1453. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070011.
109. Oliveira, Ana Isabel; Anjo, Sandra I.; Vieira de Castro, Joana; Serra, Sofia C.; Salgado, António J.; Manadas, Bruno; Costa, Bruno M. (2017): Crosstalk between glial and glioblastoma cells triggers the "go-or-grow" phenotype of tumor cells. In: *Cell communication and signaling : CCS* 15 (1), S. 37. DOI: 10.1186/s12964-017-0194-x.
110. Osaki, M.; Oshimura, M.; Ito, H. (2004): PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 9 (6), S. 667–676. DOI: 10.1023/B:APPT.0000045801.15585.dd.
111. Oster, Sara K.; Ho, Cynthia S. W.; Soucie, Erinn L.; Penn, Linda Z. (2002): The myc oncogene: Marvelously Complex. In: *Advances in cancer research* 84, S. 81–154.

112. Ostrom, Quinn T.; Gittleman, Haley; Fulop, Jordonna; Liu, Max; Blanda, Rachel; Kromer, Courtney et al. (2015): CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. In: *Neuro-oncology* 17 Suppl 4, iv1-iv62. DOI: 10.1093/neuonc/nov189.
113. Parsons, D. Williams; Jones, Sian; Zhang, Xiaosong; Lin, Jimmy Cheng-Ho; Leary, Rebecca J.; Angenendt, Philipp et al. (2008): An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. In: *Science (New York, N.Y.)* 321 (5897), S. 1807–1812. DOI: 10.1126/science.1164382.
114. Pelengaris, Stella; Khan, Michael; Evan, Gerard I. (2002): Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. In: *Cell* 109 (3), S. 321–334.
115. Perez-Roger, I.; Kim, S. H.; Griffiths, B.; Sewing, A.; Land, H. (1999): Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). In: *The EMBO journal* 18 (19), S. 5310–5320. DOI: 10.1093/emboj/18.19.5310.
116. Pomerantz, J.; Schreiber-Agus, N.; Liégeois, N. J.; Silverman, A.; Alland, L.; Chin, L. et al. (1998): The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. In: *Cell* 92 (6), S. 713–723.
117. Pope, W. B.; Lai, A.; Mehta, R.; Kim, H. J.; Qiao, J.; Young, J. R. et al. (2011): Apparent diffusion coefficient histogram analysis stratifies progression-free survival in newly diagnosed bevacizumab-treated glioblastoma. In: *AJNR. American journal of neuroradiology* 32 (5), S. 882–889. DOI: 10.3174/ajnr.A2385.
118. Porter, Kimberly R.; McCarthy, Bridget J.; Freels, Sally; Kim, Yoonsang; Davis, Faith G. (2010): Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology. In: *Neuro-oncology* 12 (6), S. 520–527. DOI: 10.1093/neuonc/nop066.
119. Radke, Josefine; Bortolussi, Ginette; Pagenstecher, Axel (2013): Akt and c-Myc induce stem-cell markers in mature primary p53(-)/(-) astrocytes and render these cells gliomagenic in the brain of immunocompetent mice. In: *PloS one* 8 (2), e56691. DOI: 10.1371/journal.pone.0056691.
120. Rassow, Joachim (2012): Biochemie, 67 Tabellen; 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).

121. Reilly, K. M.; Loisel, D. A.; Bronson, R. T.; McLaughlin, M. E.; Jacks, T. (2000): Nf1;Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects. In: *Nature genetics* 26 (1), S. 109–113. DOI: 10.1038/79075.
122. Reuss, David E.; Kratz, Annekathrin; Sahm, Felix; Capper, David; Schrimpf, Daniel; Koelsche, Christian et al. (2015): Adult IDH wild type astrocytomas biologically and clinically resolve into other tumor entities. In: *Acta neuropathologica* 130 (3), S. 407–417. DOI: 10.1007/s00401-015-1454-8.
123. Reuss, David E.; Mamatjan, Yasin; Schrimpf, Daniel; Capper, David; Hovestadt, Volker; Kratz, Annekathrin et al. (2015): IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. In: *Acta neuropathologica* 129 (6), S. 867–873. DOI: 10.1007/s00401-015-1438-8.
124. Riley, Todd; Sontag, Eduardo; Chen, Patricia; Levine, Arnold (2008): Transcriptional control of human p53-regulated genes. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (5), S. 402–412. DOI: 10.1038/nrm2395.
125. Rössig, L.; Jadidi, A. S.; Urbich, C.; Badorff, C.; Zeiher, A. M.; Dimmeler, S. (2001): Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. In: *Molecular and cellular biology* 21 (16), S. 5644–5657. DOI: 10.1128/MCB.21.16.5644-5657.2001.
126. Saini, M.; Bellinzona, M.; Meyer, F.; Cali, G.; Samii, M. (1999): Morphometrical characterization of two glioma models in the brain of immunocompetent and immunodeficient rats. In: *Journal of neuro-oncology* 42 (1), S. 59–67.
127. Sakata, Kiyohiko; Kato, Seiya; Fox, Jonathan C.; Shigemori, Minoru; Morimatsu, Minoru (2002): Autocrine signaling through Ras regulates cell survival activity in human glioma cells: potential cross-talk between Ras and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61 (11), S. 975–983.
128. Sarbassov, D. D.; Guertin, David A.; Ali, Siraj M.; Sabatini, David M. (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 307 (5712), S. 1098–1101. DOI: 10.1126/science.1106148.
129. Schiffelers, Marie-Jeanne W. A.; Blaauboer, Bas J.; Hendriksen, Coenraad F. M.; Bakker, Wieger E. (2012): Regulatory acceptance and use of 3R models: a multi-level perspective. In: *ALTEX* 29 (3), S. 287–300. DOI: 10.14573/altex.2012.3.287.

130. Schmidt, E. V. (1999): The role of c-myc in cellular growth control. In: *Oncogene* 18 (19), S. 2988–2996. DOI: 10.1038/sj.onc.1202751.
131. See, Siew Ju; Gilbert, Mark R. (2004): Anaplastic astrocytoma: diagnosis, prognosis, and management. In: *Seminars in oncology* 31 (5), S. 618–634.
132. Singh, Sheila K.; Hawkins, Cynthia; Clarke, Ian D.; Squire, Jeremy A.; Bayani, Jane; Hide, Takuichiro et al. (2004): Identification of human brain tumour initiating cells. In: *Nature* 432 (7015), S. 396–401. DOI: 10.1038/nature03128.
133. Stillman, Bruce; Stewart, David; Grodzicker, Terri (2008): Control and regulation of stem cells. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, 73). Online verfügbar unter <http://symposium.cshlp.org/content/73>.
134. Swift, S.; Lorens, J.; Achacoso, P.; Nolan, G. P. (2001): Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. In: *Current protocols in immunology* Chapter 10, Unit 10.17C. DOI: 10.1002/0471142735.im1017cs31.
135. Tamura, M.; Gu, J.; Danen, E. H.; Takino, T.; Miyamoto, S.; Yamada, K. M. (1999): PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (29), S. 20693–20703.
136. Toma, Alina (2014): Modellierung zellulärer Gliomwachstumsprozesse in ihrer Mikroumgebung. s.l.: Springer Fachmedien Wiesbaden. Online verfügbar unter <http://link.springer.com/book/10.1007/978-3-658-04684-2>.
137. Tumuluri, Vijay; Thomas, Graham A.; Fraser, Ian S. (2004): The relationship of proliferating cell density at the invasive tumour front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. In: *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 33 (4), S. 204–208. DOI: 10.1111/j.0904-2512.2004.00178.x. (sowohl migration als auch Proliferation zusammen)
138. Tuveson, David A.; Jacks, Tyler (2002): Technologically advanced cancer modeling in mice. In: *Current opinion in genetics & development* 12 (1), S. 105–110.
139. Ulrich, Theresa A.; Juan Pardo, Elena M. de; Kumar, Sanjay (2009): The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and

proliferation of glioma cells. In: *Cancer research* 69 (10), S. 4167–4174. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4859.

140. Vetter, Marcus; Hofer, Markus J.; Roth, Evelyn; Pircher, Hans-Peter; Pagenstecher, Axel (2009): Intracerebral interleukin 12 induces glioma rejection in the brain predominantly by CD8⁺ T cells and independently of interferon-gamma. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 68 (5), S. 525–534. DOI: 10.1097/NEN.0b013e3181a2afa0.
141. Vince, Giles H.; Bendszus, Martin; Schweitzer, Tilmann; Goldbrunner, Roland H.; Hildebrandt, Sabine; Tilgner, Johannes et al. (2004): Spontaneous regression of experimental gliomas – an immunohistochemical and MRI study of the C6 glioma spheroid implantation model. In: *Experimental neurology* 190 (2), S. 478–485. DOI: 10.1016/j.expneurol.2004.08.015.
142. Vitucci, M.; Hayes, D. N.; Miller, C. R. (2011): Gene expression profiling of gliomas: merging genomic and histopathological classification for personalised therapy. In: *British journal of cancer* 104 (4), S. 545–553. DOI: 10.1038/sj.bjc.6606031.
143. Vousden, Karen H.; Lane, David P. (2007): p53 in health and disease. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (4), S. 275–283. DOI: 10.1038/nrm2147.
144. Vousden, Karen H.; Lu, Xin (2002): Live or let die: the cell's response to p53. In: *Nature reviews. Cancer* 2 (8), S. 594–604. DOI: 10.1038/nrc864.
145. Waikel, R. L.; Kawachi, Y.; Waikel, P. A.; Wang, X. J.; Roop, D. R. (2001): De-regulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. In: *Nature genetics* 28 (2), S. 165 – 168. DOI: 10.1038/88889.
146. Wang, S. D.; Rath, P.; Lal, B.; Richard, J-P; Li, Y.; Goodwin, C. R. et al. (2012): EphB2 receptor controls proliferation/migration dichotomy of glioblastoma by interacting with focal adhesion kinase. In: *Oncogene* 31 (50), S. 5132–5143. DOI: 10.1038/onc.2012.16.
147. Warner, Beverley J.; Blain, Stacy W.; Seoane, Joan; Massagué, Joan (1999): Myc Downregulation by Transforming Growth Factor β Required for Activation of the p15 Ink4b G 1 Arrest Pathway. In: *Mol. Cell. Biol.* 19 (9), S. 5913–5922. DOI: 10.1128/MCB.19.9.5913.
148. Watanabe, K.; Tachibana, O.; Sata, K.; Yonekawa, Y.; Kleihues, P.; Ohgaki, H. (1996): Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually ex-

clusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 6 (3), 217–23; discussion 23–4.

149. Watanabe, Takao; Katayama, Yoichi; Yoshino, Atsuo; Komine, Chiaki; Yokoyama, Takakazu (2003): Deregulation of the TP53/p14ARF tumor suppressor pathway in low-grade diffuse astrocytomas and its influence on clinical course. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9 (13), S. 4884–4890.
150. Yahanda, A. M.; Bruner, J. M.; Donehower, L. A.; Morrison, R. S. (1995): Astrocytes derived from p53-deficient mice provide a multistep in vitro model for development of malignant gliomas. In: *Molecular and cellular biology* 15 (8), S. 4249–4259.
151. Zha, Jiping; Harada, Hisashi; Yang, Elizabeth; Jockel, Jennifer; Korsmeyer, Stanley J. (1996): Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL. In: *Cell* 87 (4), S. 619–628. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81382-3.
152. Zhang, Limin; Lee, Kuei C.; Bhojani, Mahaveer S.; Khan, Amjad P.; Shilman, Alla; Holland, Eric C. et al. (2007): Molecular imaging of Akt kinase activity. In: *Nature medicine* 13 (9), S. 1114–1119. DOI: 10.1038/nm1608.
153. Zhao, Hua; Shen, Jie; Hodges, Tiffany R.; Song, Renduo; Fuller, Gregory N.; Heimberger, Amy B. (2017): Serum microRNA profiling in patients with glioblastoma: a survival analysis. In: *Molecular cancer* 16 (1), S. 59. DOI: 10.1186/s12943-017-0628-5.
154. Zheng, H.; Ying, H.; Yan, H.; Kimmelman, A. C.; Hiller, D. J.; Chen, A-J et al. (2008): Pten and p53 converge on c-Myc to control differentiation, self-renewal, and transformation of normal and neoplastic stem cells in glioblastoma. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 73, S. 427–437. DOI: 10.1101/sqb.2008.73.047.
155. Zheng, Hongwu; Ying, Haoqiang; Yan, Haiyan; Kimmelman, Alec C.; Hiller, David J.; Chen, An-Jou et al. (2008): p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. In: *Nature* 455 (7216), S. 1129–1133. DOI: 10.1038/nature07443.

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Bauer, Bender, Bartsch, Bien, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Dettmeyer, Dodel, Ellenrieder, Fendrich, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Görg, Gress, Grimm, Höffken, Hoyer, Kann, Karl, Kirchner, Klose, Koehler, Kolb-Niemann, Koolman, König, Lill, Lohoff, Maisner, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Plant, Renz, Richter, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schu, Schütz, Seifert, Sevinc, Seitz, Steiniger, Sekundo, Tackenberg, Teymoortash, Timmesfeld, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Walters, Weihe, Werner, Westermann, Wilhelm, Wulf.

8.3 Danksagung

Die ganzen Jahre hindurch, die es gedauert hat diese Arbeit im Labor fertig zu stellen und sie in dieser Form niederzuschreiben, haben mich besondere Menschen begleitet und unterstützt. An dieser Stelle möchte ich ihnen danken.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Axel Pagenstecher, der mir kurz nach meinem Physikum die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Forschungsgruppe an einem neuroonkologischen Thema zu forschen. Sie haben mir in allen Jahren mit Wissen, Können und Rat zur Seite gestanden, dafür möchte ich mich herzlichst bedanken.

Als eine der weiteren wichtigen Personen, der ich diese Fertigstellung meiner Arbeit verdanke, ist Frau Ginette Bortolussi zu nennen. Ginette, du bist die Seele des Forschungslabors, und wenn ich am verzweifeln war, warst du mir immer hilfreich zur Seite gestanden. Egal wie oft man am zweifeln war, ob diese Arbeit jemals fertig würde, du hast mich immer positiv motiviert.

Ein weiteres Dankeschön gilt allen anderen Mitarbeitern des neuropathologischen und pathologischen Instituts der Universität Marburg, ihr habt mich in meiner Laborarbeit immer unterstützt und mir wertvolle Tipps gegeben. Vielen Dank!

Natürlich waren in meinem Privatleben einige Menschen eine große Unterstützung, vor allem mein Papa, der nicht nur mein Studium unterstützt hat, sondern mir auch in beruflicher Hinsicht ein großes Vorbild ist. Danke für deine medizinische Weitsicht und die Empathie, die du weitergibst. Auch möchte ich meiner Mama danken, die immer ein offenes Ohr nach langen Labortagen hatte.

Und zuletzt möchte ich Martin Pautzenberger danken, der mich in den letzten Jahren immer motiviert hat, endlich die Fertigstellung dieser Arbeit zu erreichen. Danke für deine Geduld.

„Die wahre Großzügigkeit der Zukunft gegenüber besteht darin, in der Gegenwart alles zu geben.“ (Albert Camus)

Ich danke allen Menschen die mich auf diesem langen Entwicklungsprozess von den ersten Versuchen im Labor bis zum letzten Buchstaben dieser Arbeit begleitet haben. Danke für Alles.