

Aus der
Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Oliver Muensterer



Charakterisierung von Stammzellen kindlicher Kleinhirntumoren

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Xiaodi Wang

aus

Peking

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Roland Kappler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Louisa von Baumgarten

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2024

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1.	Medulloblastom (MB).....	1
1.2.	Tumorstammzelltheorie.....	3
1.3.	Tumorstammzellmarker und neuroepitheliale Marker.....	4
1.3.1.	CD133.....	4
1.3.2.	CD15.....	5
1.3.3.	Nestin.....	5
1.3.4.	Atonal BHLH Transcription Factor 1.....	6
1.4.	Sonic Hedgehog-Patched-Signaltransduktionsweg.....	6
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	9
3	MATERIALIEN.....	10
3.1.	Zelllinien.....	10
3.2.	Zellmedien.....	10
3.3.	Antibiotika für Zellkultur.....	11
3.4.	Kits.....	11
3.5.	Enzyme.....	11
3.6.	Chemikalien und Reagenzien.....	11
3.7.	Verbrauchsmaterial.....	13
3.8.	Primer.....	13
3.9.	Geräte.....	14
4	METHODEN.....	16
4.1.	Zellbiologische Methoden.....	16
4.1.1.	Kultivieren etablierter MB-Zelllinien.....	16
4.1.2.	Passagieren etablierter MB-Zelllinien.....	16
4.1.3.	Kryokonservierung etablierter MB-Zelllinien.....	16
4.2.	Zellbiologische Methoden zur Isolierung von Stammzellen.....	16
4.2.1.	Dissoziation und Zellgewinnung aus Nativpräparaten.....	16
4.2.2.	Zellkultur aus Nativ-MB-Einzelzellsuspension.....	17
4.2.3.	MACS-Zellisolierung.....	18
4.2.4.	Passagieren von Neurosphären der Stammzellen.....	19
4.3.	Molekulargenetische Methoden.....	20
4.3.1.	RNA-Isolation aus Zellkultur und Gewebe.....	20

	4.3.2. cDNA-Synthese.....	20
	4.3.3. Q-PCR.....	21
5	ERGEBNISSE.....	23
	5.1. Etablierung von MB-Zelllinien aus Primärtumorgewebe.....	23
	5.2. Bildung von Neurosphären durch Prominin1-positive-Zellen.....	23
	5.3. Nachweis von Selbsterneuerungsfähigkeit bei Neurosphären.....	27
	5.4. Morphologische Veränderung der Neurosphären nach Entzug von Stammzellmedium.....	28
	5.5. Genexpression.....	28
	5.5.1. Vergleich der Genexpression zwischen Medulloblastomen und gesunden Cerebelli.....	28
	5.5.2. Validierung der MACS-Zellisolierung mittels real-time RT-PCR.....	31
	5.5.3. Vergleich der Genexpression zwischen Prominin1-positiven und -negativen Zellen bei MB.....	32
6	DISKUSSION.....	35
	6.1. Primärzellkultur aus MB-Mäusen.....	35
	6.2. Bildung von Neurosphären durch Prominin1-positive Zellen.....	35
	6.3. Erhöhte Expression von Tumorstammzellmarker in MB.....	36
	6.4. Erhöhte Expression von Tumorstammzellmarker bei Prominin1-positiven Zellen.....	37
	6.5. Erhöhte Aktivität des Sonic-Hedgehog-Signalweges in MB.....	39
	6.6. Erhöhte Aktivität des Sonic-Hedgehog-Signalweges bei Prominin1-positiven Zellen.....	40
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	43
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	44
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	53
10	DANKSAGUNG	55
11	AFFIDAVIT	55
12	LEBENS LAUF	55

1. Einleitung

In Industrieländern sind Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache bei Kindern [1]. In den vergangenen Jahren konnten zunehmend mehr Kenntnisse über die Entstehung dieser malignen Erkrankung gewonnen werden. Genetische Veränderungen spielen eine entscheidende Rolle sowohl in der Entstehung als auch im Erhalt beziehungsweise im Wachstum von Malignomen. Durch die Aktivierung verschiedener Gene wird das An- und Ausschalten bestimmter Signaltransduktionswege reguliert, hierdurch kann auch die Zelldifferenzierung und die -proliferation gezielt gesteuert werden. Ein Beispiel hierfür ist der Sonic-Hedgehog (Shh)-Signalweg [2].

Eine Fehlregulation des Shh-Signalweges kann zu Missbildungen und Malignomen, wie z.B. dem Medulloblastom (MB) führen [3], möglich ist auch die Entwicklung des sogenannten Basalzellnävus-Syndroms (auch bekannt als Gorlin-Syndrom) [4].

1.1 Medulloblastom (MB)

Das MB ist ein neuroepithelialer Tumor des Kleinhirns und stellt den häufigsten bösartigen Hirntumor im Kindesalter dar [5]. Bei 25–35 % der Kinder ist es während der Diagnosestellung bereits über den Subarachnoidalraum metastasiert [6]. Die Betroffenen fallen unter anderem durch motorische Beeinträchtigungen wie Ataxie, Gleichgewichtsstörungen, Artikulationsstörungen und häufig auch Abduzenspareisen auf [7].

Die Therapie der Wahl ist die möglichst vollständige chirurgische Resektion des Tumors mit einer adjuvanten Radiochemotherapie. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt bei Kindern ohne Risikofaktoren circa 60 % [8-10]. Solche sind zum Beispiel ein niedriges Alter bei Diagnose, ein fortgeschrittenes Tumorstadium und eine initiale Metastasierung [11]. Besonders die postoperative Bestrahlung kann durch vaskuläre Schädigung und Störungen in der Myelinisierung bei Kindern langfristige neurologische Defizite verursachen [12]. Des Weiteren muss mit Komplikationen wie neuroendokrinen Funktionsstörungen, neurologischen Ausfallerscheinungen und Sekundärmalignomen gerechnet werden [13]. Bei etwa 30 % der Patienten kommt es trotz der intensiven Therapie zu einem Rezidiv; meistens tritt dieses 18 Monate nach der Erstdiagnose auf [14].

Es wird vermutet, dass MB aus den unreifen Zellen der äußeren Körnerzellschicht entstehen [15, 16]. Durch die Aktivierung des Shh-Signalweges werden die

Ausdifferenzierung und die Migration der Körnervorläuferzellen in der external germinal layer (EGL) inwärts Richtung internal granular layer (IGL) kontrolliert (Abbildung 1.1). So entsteht ein Gradient der Shh-Signalwegsaktivität entlang der Kleinhirnschichten. Die Körnerzellen mit der höheren Aktivität des Shh-Signalweges verbleiben in der äußeren Körnerzellschicht und proliferieren, während die Zellen mit der niedrigeren Aktivität nach innen wandern. Bleibt die Aktivität des Shh-Signalweges unkontrolliert hoch, kommt es zu einer ungehinderten Wucherung der Körnervorläuferzellen in der EGL bis hin zum Ausbilden eines MB.

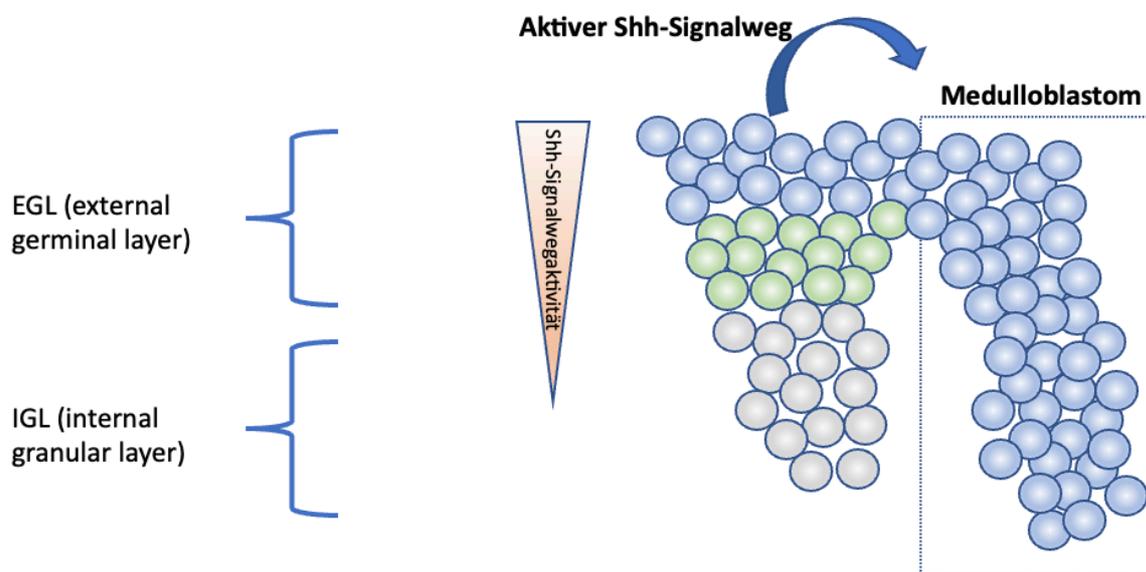


Abbildung 1.1: Entwicklung und Wanderung der Körnerzellen im Kleinhirn einer Maus. Gesteuert durch den Shh-Signalweg wandern undifferenzierte Körnerzellen von der EGL in die IGL. Es herrscht ein Shh-Signalgradient mit der höchsten Aktivität in der äußeren EGL und der niedrigsten Aktivität in der inneren. Besteht weiterhin eine hohe Shh-Aktivität, verbleiben die Körnerzellen in der EGL und entwickeln sich durch ungehemmte Proliferation zu einem MB [17]. Abbildung modifiziert nach Di Marcotullio et al, 2006 [17].

Die besondere Aggressivität des MB deutet auf die Existenz eines Subtyps von Tumorzellen hin, den sogenannten Tumorstammzellen, die sich vor allem gegenüber Radio- und Chemotherapien resistent verhalten [18].

1.2 Tumorstammzelltheorie

Das Konzept der Tumorstammzelle wurde erstmalig 1971 beschrieben. In der Arbeit Pierces und Wallaces konnte ein hierarchisches Modell von Plattenepithelkarzinomen demonstriert werden, indem gezeigt wurde, wie in einer Tumormasse differenziertere Tumorzellen aus undifferenzierten, malignen Zellen entstehen [19].

1997 wurde bei Patienten mit akuter myeloider Leukämie eine Subpopulation von Tumorzellen identifiziert, die sich von jenen restlichen Tumorzellen unterschied und stammzellähnliche Eigenschaften besaß. Diese Zellen wurden dementsprechend als leukämische Tumorstammzellen bezeichnet [20]. Im Verlauf konnten auch Tumorstammzellen in weiteren Malignomen von Pankreas, Brust, Prostata und Kolon nachgewiesen werden [21-23]. Dies führte zur Konzipierung eines hierarchischen beziehungsweise eines Tumorstammzellenmodells. In diesem besitzen – im Gegensatz zum stochastischen Modell der Tumorentwicklung, bei dem alle Tumorzellen gleichwertig sind – wenige Tumorzellen die Eigenschaft, sich selbst zu erneuern und weitere Tumorzellen zu produzieren [24].

Diese Tumorstammzellen sind tumorinitiierend, multipotent und unlimitiert selbsterneuerbar. Ferner haben sie meist einen Oberflächenmarker, anhand dessen sie sich von anderen Tumorzellen unterscheiden lassen [25]. Gemäß dem jetzigen Kenntnisstand gibt es keinen ‚universellen‘ Oberflächenmarker; je nach Malignom variieren die Oberflächenmarker.

Auch bei Hirntumoren konnte eine Subpopulation von Tumorzellen nachgewiesen werden, die Stammzelleigenschaften besitzt [26]. Diese Zellen exprimierten den neuronalen Stammzellmarker CD133 und wurden als Hirntumorstammzellen bezeichnet [27]. Bei Hirntumoren korreliert die Expression von CD133 mit einer schlechten Prognose [28]. Es konnte gezeigt werden, dass CD133-positive Zellen (CD133⁺) im Gegensatz zu den CD133-negativen (CD133⁻) im Xenograft ein tumorinitiierendes Merkmal aufweisen. Ferner ließ sich *in vitro* die Selbsterneuerungskapazität der CD133⁺-Einzelzellen im Sphärenbildungs-Assay darlegen [29, 30]. Da die CD133⁺ somit Tumorstammzelleigenschaften besitzen, wird dem CD133-Antigen die Eigenschaft eines Oberflächenmarkers für Tumorstammzellen bei Hirntumoren zugeschrieben [26, 31]. In der Zellkultur bildeten CD133⁺-Zellen unter Zugabe von Wachstumsfaktoren und unter Entzug von Serum sogenannte Neurosphären aus. Für Zellen in diesen Neurosphären konnten ebenso Tumorstammzelleigenschaften nachgewiesen werden [32].

1.3 Tumorstammzellmarker und neuroepitheliale Marker

Tumorstammzellen exprimieren nicht nur einen einzigen charakteristischen Tumorstammzellenmarker für den jeweiligen Tumortyp, sondern auch gleichzeitig weitere Oberflächenmarker. So werden Tumorstammzellen nicht nur durch Proliferationsmarker gekennzeichnet, sondern exprimieren auch dieselben Oberflächenmarker wie die jeweiligen Stammzellen des Gewebes. Diese spezifischen Oberflächenmarkierungen der Tumorstammzellen stellen ein Unterscheidungsmerkmal zu den restlichen Tumorzellen dar und ermöglichen dadurch auch eine Selektierung aus der Tumormasse.

1.3.1 CD133

CD133 wird von einer Vielzahl von Vorläuferzellen exprimiert, zum Beispiel von solchen im hämatopoetischen System [33] und auch von endothelialen [34]. Lee et al. gelang es, CD133⁺-Zellen aus dem Kleinhirn von Mäusen zu isolieren, die *in vivo* und *in vitro* in der Lage waren, sich in verschiedene Zelllinien zu differenzieren. Sie wiesen somit Stammzeleigenschaften auf [35].

Analog hierzu konnten auch in diversen Tumoren CD133⁺ Zellen isoliert werden. Zum Beispiel ließen sich aus Kolonkarzinomen [23], Adenokarzinomen des Pankreas [36] und Prostatatumoren [37] CD133⁺-Tumorzellen gewinnen, die *in vitro* die Fähigkeit hatten, sich selbst zu erneuern und in unterschiedliche Zelllinien auszudifferenzieren. Ebenso waren sie bei der Transplantation in immunsupprimierten Mäusen dazu imstande, einen neuen Tumor auszubilden, der morphologisch mit dem Originaltumor übereinstimmte.

Anhand des Oberflächenmarkers CD133 konnte eine Selektion von Tumorstammzellen der MB erfolgen [26]. Diese isolierten CD133⁺-Zellen wiesen eine hohe Proliferationsrate auf und differenzierten sich innerhalb der Zellkultur in Tumorzellen aus, die dem Originaltumor morphologisch ähnelten. Immunsupprimierte Mäuse, die CD133⁺-Hirntumorzellen injiziert bekamen, entwickelten einen neuen Tumor, der dieselbe Zellmorphologie hatte wie der Ursprungstumor. Im neuen Tumor wurden neben CD133⁺- auch CD133⁻ Zellen nachgewiesen. Erstere konnten sich also selbst erneuern und auch CD133⁻ Zellen ausbilden. Im Gegensatz hierzu waren letztere auch in 1000-mehrfacher Konzentration nicht dazu in der Lage, einen Tumor zu entwickeln [31].

1.3.2 CD15

CD15, auch als stage-specific embryonic antigen 1 (SSEA-1) bezeichnet, ist ein Oberflächenmarker, der auf Hodgkin-Lymphomzellen [38] und Zellen diverser solider Tumore wie Brust- oder Ovarialtumore [39] exprimiert wird. Auch im Kleinhirn ist eine Expression von CD15 bekannt [40], wobei die genaue Funktion im gesunden Kleinhirn noch unklar ist. Es konnte zudem in unterschiedlichen Studien gezeigt werden, dass CD15 von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird [41].

Obwohl CD133 mehrfach in verschiedenen Arbeiten als Oberflächenmarker tumorinitiierender Zellen bei MB nachgewiesen wurde, ließ sich auch in einigen Untersuchungen darlegen, dass nicht CD133⁺-Zellen, sondern CD15⁺-MB-Zellen tumorinitiierende Eigenschaften besitzen. Letztgenannte konnten in Zellkulturen Neurosphären und in orthotopen Transplantationen erneut MB ausbilden, im Gegensatz zu CD133⁺- und CD15⁻ Zellen [42]. Die CD15⁺-MB-Zellen sind selbsterneuerbar und differenzierungsfähig. Zudem wiesen sie auch eine erhöhte Aktivität des Shh-Signalweges auf [43].

1.3.3 Nestin

Nestin ist ein intermediäres Filamentprotein, das von undifferenzierten Gehirnzellen während der Entwicklungsphase sezerniert wird [44]. Nestin⁺-Hirnzellen sind in der Lage, Ex-vivo-Neurosphären auszubilden und sich in verschiedene Zelllinien zu differenzieren. Die ausdifferenzierten neuronalen und glialen Zellen zeigen eine herunter regulierte Nestinexpression [45]. Nestin ist also als ein weiterer Tumorstammzellmarker anzusehen. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Co-Expression von CD133 und Nestin vorliegt [29]. Diese CD133⁺/Nestin⁺- Zellen wiesen auch eine erhöhte Selbsterneuerungs- und Differenzierungsfähigkeit auf [31].

Auch in anderen Geweben wird Nestin exprimiert, zum Beispiel in Pankreasinzellen [46], Satellitenzellen der Skelettmuskulatur [47], nicht-hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks [48] und auch in vaskulären Endothelzellen [49].

Auch in diversen Tumoren konnte eine Nestin-Expression nachgewiesen werden, diese korrelierte insbesondere mit der Neubildung von Gefäßen [50]. Maligne Hirntumore haben daher eine höhere Nestinexpression als benigne [51]. Somit hat die Nestinexpression auch eine prognostische Aussagekraft: Ist sie erhöht, deutete dies meist auf eine schlechte Prognose des Tumors hin [52]. In Neurosphären des MB konnte zum Beispiel eine erhöhte Nestinexpression nachgewiesen werden [53].

Die Eigenschaft von Nestin, sowohl von Tumorstammzellen als auch von Endothelzellen produziert zu werden unterstützt die Theorie der sogenannten perivaskulären Nische für Tumorstammzellen. Hier wird die Stammzeleigenschaft der Zellen durch Interaktion mit Endothelzellen aufrechterhalten [54].

1.3.4 Atonal BHLH Transcription Factor 1 (Atoh1)

Atoh1 (Math1) steuert die Proliferation sowie die Migration von Körnervorläuferzellen und stellt gleichzeitig einen Marker für unreife Körnerzellen dar [55]. Zusammen mit dem Shh-Signalweg steuert Atoh1 die normale Kleinhirnentwicklung [56], und kann bei Fehlregulation zur Ausbildung eines MB führen [57]. Eine Deletion von *Atoh1* konnte die Entstehung von MB verhindern [57]. Der Abbau von Atoh1 wird aber durch den Shh-Signalweg gehemmt [58]. Somit deutet eine erhöhte Expression von Atoh1 auf eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Entstehung beziehungsweise Existenz eines MB hin. Es konnte dementsprechend in MB eine erhöhte Expression von Atoh1 bestätigt werden [59].

1.4 Sonic Hedgehog (Shh)-Patched (Ptch)-Signaltransduktionsweg

Die verschiedenen Komponenten dieses Signaltransduktionsweges spielen, wie bereits erwähnt, in der Entwicklung des Kleinhirns eine essenzielle Rolle [60]. Durch ihre genetischen und epigenetischen Alterationen kann es zu einer konstitutiven Aktivität kommen und somit die Entstehung eines MB verursacht werden [61].

Der erwähnte Signalweg besteht im Wesentlichen aus dem Liganden Shh und seinem Rezeptor Patched (Ptch), der eine inhibierende Wirkung auf das transmembrane Protein Smoothed (Smo) hat (Abbildung 1.2). Nach der Bindung von Shh an Ptch wird die Repression von Smo aufgehoben, daraus resultiert die Aktivierung des Signalweges. Die Vermittlung des Signals in den Kern läuft über die Gli-Transkriptionsfaktoren, die dort die Expression verschiedener Zielgene anregen, unter anderem auch von *Ptch* und *Gli* selbst [62]. Ptch hemmt durch Rückkoppelung somit seine eigene Produktion und stellt einen Antagonisten des Shh-Signalweges dar. Es gilt daher auch als Tumorsuppressor-Gen [63]. Eine erhöhte Expression von *Gli1* ist hingegen ein Indikator für eine erhöhte Aktivität des Shh-Signalweges [64].

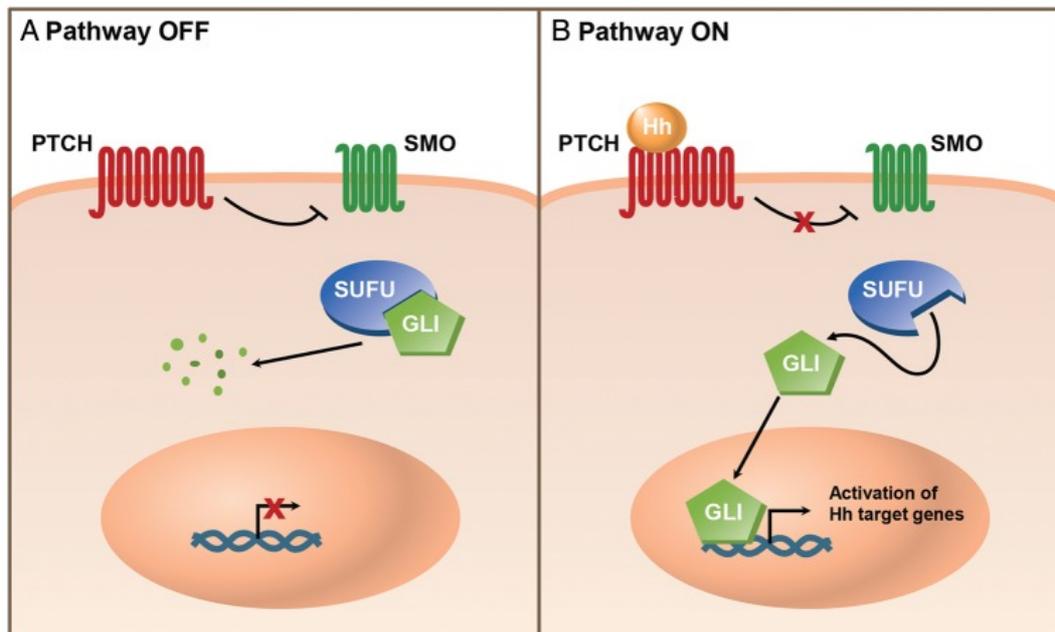


Abbildung 1.2: Shh-Ptch-Signalweg. Shh bindet an den Rezeptor Ptch. Somit wird die Repression von Smo aufgehoben und der Signalweg aktiviert. Die aktivierten Gli-Transkriptionsfaktoren gehen in den Zellkern und stoßen die Synthese der Zielgene an. Abbildung nach Kieran et al, 2014 [65].

Nach der embryonalen Entwicklungsphase befindet sich der Shh-Signalweg meist in einem Zustand mit geringer Aktivität, kann aber bei Bedarf wieder reaktiviert werden, zum Beispiel im Falle von Wundheilungen [66].

Ein mutationsbedingter Funktionsverlust von Ptch führt zu einer Deregulierung des Shh-Ptch-Signalweges mit unkontrollierter Aktivierung von Smo und somit zu einer Induktion wachstumsfördernder Gene [60]. Dies resultiert beim Menschen zum Beispiel in der Entwicklung von Tumoren der Haut, des quergestreiften Muskels wie auch des Kleinhirns [67]. Diese sind ebenfalls mit dem Gorlin-Syndrom assoziiert, bei dem Keimbahnmutationen im *PTCH*-Gen nachzuweisen sind [4]. Bei sporadischen MB, die nicht mit dem Gorlin-Syndrom verbunden auftreten, konnten auch teilweise *PTCH*-Mutationen gefunden werden [68].

Im heterozygoten *Ptch*^{neo67/+}-Knock-out-Mausmodell wurde ein Allel des *Ptch1*-Gens deaktiviert, indem Teile von Exon 6 und 7 durch ein Neomycin-Resistenzgen ersetzt wurden [69]. Aufgrund der Haplodefizienz von *Ptch* wurde der Shh-Ptch-Signalweg aktiviert, so dass die Mäuse diverse Malignome entwickelten, zum Beispiel Rhabdomyosarkome und auch MB. Die an Letzteren erkrankten Mäuse fielen durch einen

ataktischen Gang, Gleichgewichtsstörungen und zum Teil durch eine beulenartig erhobene Schädeldecke auf.

Zwei wichtige Zielgene der Shh-Signaltransduktionskaskade stellen das *Mycn proto-oncogene*, *BHLH transcription factor (Mycn)* und *CyclinD1 (Ccnd1)* dar.

Mycn ist für die normale Organogenese von entscheidender Bedeutung, da es währenddessen die Proliferation der Progenitorzellen steuert [70]. Eine Deletion von *MYCN* führt zu Fehlentwicklungen beziehungsweise Nichtüberlebensfähigkeit [71-73]. Eine Überexpression von *Mycn* hingegen resultiert in der Entstehung neuronaler Tumore wie MB [70].

Durch positive Rückkoppelung induziert *Mycn* die Expression von *Gli1* und erhält somit die Aktivität des Shh-Signalweges aufrecht, hierdurch wird eine Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen verhindert [74]. Dies wird unter anderem über die Stimulation der Expression von *Ccnd1* erreicht [75]. In *Ptch^{neo67/+}*-MB konnte daher nicht nur eine erhöhte Expression von *Mycn*, sondern auch von *Ccnd1* gezeigt werden [75, 76].

CCND1 ist auch selber ein Target-Gen der Shh-Signalkaskade in Kleinhirnzellen [77]. Unreife Körnervorläuferzellen sezernieren *Ccnd1* im frühen Stadium der Entwicklung. Eine Deletion von *Ccnd1* war ausreichend, um die Inzidenz von MB bei *Ptch^{neo67/+}*-Mäusen zu reduzieren [78]. *Ccnd1* spielt also eine bedeutende Rolle in der frühen Phase der Körnervorläuferzellen-Proliferation und somit in der Entstehung des MB.

2. Zielsetzung der Arbeit

Das MB ist der häufigste bösartige Hirntumor im Kindesalter. Die bisherige Therapie weist weiterhin eine hohe Mortalität auf. Es wird angenommen, dass eine genauere Kenntnis der Entstehung des MB mit Identifizierung der tumorpropagierenden Zellen eine zielgerichtete Behandlung zur effektiveren Elimination des Tumors ermöglicht.

Das erste Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung von Zelllinien aus *Ptch^{neo67/+}*-MB. Hierzu sollen MB-Zellen mittels enzymatischer Dissoziation aus dem Zellverband gelöst und kultiviert werden. Nach erfolgreichem Anlegen einer Zellkultur sollen die Tumorstammzellen anhand des Oberflächenmarkers Prominin1 isoliert werden. Es gilt, sie währenddessen in Stammzellmedium aufzunehmen, um die Stammzeleigenschaften zu bewahren. Ferner sollen sie auf ihre charakteristischen morphologischen und funktionellen Merkmale untersucht werden, zum Beispiel auf die Eigenschaft zur Neurosphärenbildung und die Selbsterneuerungsfähigkeit.

Danach werden bei den Prominin1-positiven und -negativen Subpopulationen die Expressionsunterschiede auf Transkriptionsebene analysiert, um Differenzen in der Aktivität des Shh-Signalweges darzustellen. Es sollen die Expression von weiteren Tumorstammzellmarker bestimmt werden, um den Stammzellcharakter zu verifizieren.

3. Materialien

3.1 Zelllinien

	Ursprung	Bezogen von	Kultivierungsmedium
p794	<i>Ptch^{neo67/+}</i> -Maus	Pablo Hernáiz Driever, Charité Berlin	DMEM+ 10%FCS+1% PenStrep
p723	<i>Ptch^{neo67/+}</i> -Maus	Pablo Hernáiz Driever, Charité Berlin	DMEM+ 10%FCS+1% PenStrep
p627	<i>Ptch^{neo67/+}</i> -Maus	Pablo Hernáiz Driever, Charité Berlin	DMEM+ 10%FCS+1% PenStrep

3.2 Zellmedien

Medien für MB-Zelllinien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1x), liquid (High Glucose) – with GlutaMAX™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
mit 10 % fötalem Rinderserum (FCS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Stammzellmedium

50 ml Neurobasal™ Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
500 µl N-2-Supplement (100x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
1 ml B-27 Supplement (50x) ohne Vitamin A	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
33 µl BSA Fraktion V, Lösung 7,5 %	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
500 µl L-Glutamin (100x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
5 µl Recombinant mouse epidermal growth factor (EGF)	R&D Systems
5 µl Recombinant mouse fibroblast growth factor-basic (FGFb)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Einfriermedium

50 ml FCS

40 ml DMEM

12,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)

3.3 Antibiotika für Zellkultur

Penicillin, Streptomycin-PenStrep

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.4 Kits

Neural Tissue Dissociation Kit (Papain)

Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch
Gladbach

MiniMACS™ Starting Kit

Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-
Gladbach

MidiMACS™ Starting Kit

Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-
Gladbach

3.5 Enzyme

iTaq SYBR Green Supermix with ROX

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Maxima Hot Start *Taq* DNA Polymerase

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Proteinase K

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Ribonuclease H (RNase H)

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

SuperScript® II Reverse Transcriptase

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Trypsin-EDTA (1x)

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

3.6 Chemikalien und Reagenzien

6x DNA Loading Dye

Fermentas GmbH, St. Leon Rot

Albumin Fraktion V (BSA)

Carl Roth GmbH, Erlangen

Anti-Prominin-1 Microbeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
Anti-SSEA-1 (CD15) Microbeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
autoMACS Rinsing Solution	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BSA Stock Solution, MACS®	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTPs (100 mM)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (1x), without CaCl_2 , MgCl_2	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetracyanat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Hank's Balanced Salt Solution with Ca^{2+} , Mg^{2+} (HBSS w)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hank's Balanced Salt Solution without Ca^{2+} , Mg^{2+} (HBSS w/o)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD Biosciences, Heidelberg
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TRI Reagent RNA Isolation Reagent	Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA
Tris(hydroxymethyl)-Amniomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
UltraPure™ DNase/RNase-free Distilled Water	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.7 Verbrauchsmaterial

5er-Reihe PCR-Gefäße (0,2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
BD Falcon™ Round-Bottom Tubes	BD Biosciences, Heidelberg
Biosphere®-Filterspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
EasyFlasks™-Zellkulturflaschen	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Filtertips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Kryoröhrchen	Schubert & Weiss, Iphofen
LumiNunc™ Microwell Plates	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
LS Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
MACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
MS Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
Multidishes Nunclon™	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Nalgene®-Kryoröhrchen	Schubert & Weiss GmbH, München
PP-Schraubverschlussröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pre-Separation Filters	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
Quarzküvette QS 10 mm	Hellma, Mühlheim
Safe-Lock-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Standard 96 Well PCR Plates	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Costar® Stripette® Serological Pipets	Corning GmbH, Wiesbaden
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.8 Primer

Es wurden Random Hexamer Primer von Roche Life Science, Penzberg angewendet. Die Primersequenzen für die Expressionsanalysen von Eurofins MWG Operon, Ebersberg sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Bez.	Exon	Sequenz fw	Sequenz rev	AL
Fut4 (CD15)	1*	GAATCGCCCTCCCATACT CC	CGAAGACATCCGAGTCGGTC	91
Ccnd1	4/5	ACAACGCACTTTCTTTCC AGAGT	TCTTTGCGGGTGCCACTACT	251
Gli1	10/1 1	GAATCGGACCCACTCCAA TG	GTGTTTGC GGAGCGAGCT	91
Atoh1	1	TGGTAAGGAGAAGCGGCT GT	GAAGGACGGGATAACGTTGC	251
Nestin	4/5	AACTGCCCTAGAGACGGT GTCTC	GCAGAACCACCTGACCCTCA	251
Mycn	2/3	CAGCGCTGCGGTCACTAG T	GCACAGTGATCGTGAAAGTG GT	251
Prom1	4/5	GATCGGAGTCCTTATCTG CGC	TCCCTTTGATCCGAGTCCTG	251
Ptch	7/8	TTGATTGTGGGTGGCACA GT	GCTTGGGAGTCATTAAGTGG AAC	89
Tbp	4/5	GCCCGAAACGCCGAATAT	CCGTGGTTCGTGGCTCTCT	72

Angegeben in der Tabelle sind die Bezeichnung (Bez.), die Lokalisierung der Primer, die Sequenz des Vorwärts- (Sequenz fw) und des Rückwärts-Primers (Sequenz rev) in 5'-3'-Richtung sowie die Amplikonlänge (AL) in Basenpaaren. *CD15 besteht nur aus einem Exon.

3.9 Geräte

BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge J2-21	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Centrifuge LMC-3000	Kisker-Biotech, Steinfurt
CO ₂ -Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Tokio, Japan
Feinwaage Te1245	Sartorius AG, Göttingen
Kamera PowerShot G6	Canon, Krefeld
Mastercycler ep <i>realplex2</i> S	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg

Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikroskop IX50	Olympus Europa GmbH, Hamburg
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Pipette Accu-Jet	Brand, Wertheim
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Waage Vic-1501	Acculab, Edgewood, NY, USA
Wasserbad GFL 1083	GFL, Wien, Österreich

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivieren etablierter Medulloblastomzelllinien

Nach Auftauen der kryokonservierten Zellen bei Raumtemperatur wurden diese in je ein 5-ml-Medium mit 10 % FCS aufgenommen und im Anschluss bei 1200 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit je einem frischen 5-ml-Medium (+ 10 % FCS, + 1 % PenStrep) erneut suspendiert, und anschließend in eine 5-cm²-Zellkulturflasche überführt und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert. Am zweiten Tag wurde das alte Medium verworfen und durch ein neues 5-ml-Medium ersetzt.

4.1.2 Passagieren etablierter Medulloblastomzelllinien

Die Zelllinien wurden regelmäßig (alle 3–4 Tage) passagiert, sobald eine Konfluenz von circa 90–100 % erreicht wurde. Als Erstes wurde das alte Medium entfernt und die Zellen wurden mit PBS gereinigt. Danach wurden die Zellen mit 0,5 ml (auf 5-cm²-Kulturflasche) Trypsin (25%ige Stocklösung, 1:5 verdünnt mit EDTA) bei 37 °C und 5% CO₂ für 3 min verdaut. Die Reaktion wurde mit einem FCS-haltigen Medium gestoppt. Danach wurde die Zellsuspension in 5-cm²- beziehungsweise 25-cm²-Zellkulturflaschen mit entsprechendem frischem Medium ausgesät.

4.1.3 Kryokonservierung etablierter Medulloblastomzelllinien

Bei einer Konfluenz von circa 90-100% wurden die Zellen mit Trypsin verdaut und dann in Einfriermedium aufgenommen und resuspendiert. Nach Aliquotierung wurden die Zellen für mindestens 24 h bei -80°C eingefroren. Danach erfolgte die Lagerung im flüssigen Stickstoff.

4.2 Zellbiologische Methoden zur Isolierung von Stammzellen

4.2.1 Dissoziation und Zellgewinnung aus Nativpräparaten

Von den *Ptch*^{neo67/+}-Mäusen wurden diejenigen mit auffälliger klinischer Symptomatik im Sinne von Ataxie und Gangunsicherheit ausgewählt. Es erfolgte die Präparation des Tumors aus dem Kleinhirn. Danach wurde folgendes Protokoll angewendet, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten:

- Im Anschluss an die mechanische Zerkleinerung mit einem Skalpell wurde die Tumormasse in HBSS (w/o) aufgenommen und 2 min lang bei 200 g ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde die Tumormasse weiter mit dem Neural Tissue Dissociation Kit (Papain) aufgearbeitet.
- Dabei wurden 0,5 μl β -Mercaptoethanol (1:50 verdünnt) mit 24,5 μl destilliertem H_2O vermischt, sodass die Konzentration von β -Mercaptoethanol 0,286 M betrug. Von dieser verdünnten Lösung wurden dann 2,34 μl mit 10 ml Solution 2 vermengt.
- 50 μl von Solution 1 und 1900 μl der vorbereiteten Solution 2 zusammenvermischt ergaben den Enzym-Mix 1, der auf 37 °C erwärmt wurde. In diesen wurde die mechanisch zerkleinerte Tumormasse aufgenommen und 15 min lang bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde alle 5 min einmal invertiert. Hinterher wurde der Enzym-Mix 2 (= 20 μl Solution 3 vermengt mit 10 μl Solution 4) dazugegeben.
- Zur besseren Vermischung wurde die Suspension mit einer Pasteur-Pipette 10-mal sanft pipettiert. Anschließend erfolgten eine 10-minütige Inkubation bei 37 °C mit einmaliger Invertierung sowie eine weitere mechanische Zerkleinerung und Vermischung durch Pipettieren mit einer blauen Pipettenspitze (10-mal). Dieses Vorgehen fand danach mit einer gelben Pipettenspitze statt (20-mal), gefolgt von einer zusätzlichen 10-minütigen Inkubation bei 37 °C mit einmaliger Invertierung.
- Die Zellsuspension wurde nachfolgend mit 10 ml HBSS (w) durch einen 70- μm -Zellfilter gefiltert und hinterher 10 min lang bei 300 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde anschließend wiederholt.
- Weiter wurde HBSS (w) abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Stammzellmedium aufgenommen.

4.2.2 Zellkultur aus Nativ-Medulloblastom-Einzelzellsuspension

- Matrigel wurde bei 4 °C auf Eis aufgetaut, dann durch vorgekühlte Pipetten 1:3 mit Neurobasalmedium ohne Zusätze im vorgekühlten Behälter verdünnt. Jedes Well einer vorgekühlten 6-Well-Platte wurde mit 150 μl verdünntem Matrigel bedeckt. Die Platte wurde 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Neurobasalmedium ohne Zusätze ausgewaschen.

- Die durch Dissoziation gewonnenen Zellen wurden mit Stammzellmedium auf den mit Matrigel beschichteten Kulturplatten kultiviert.
- Sobald sich ein Zellrasen bildete, wurde der Überstand abgesaugt und jedes Well mit 1 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation von 5 min mit 200 µl Trypsin bei 37 °C. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig abgeschabt. Im nächsten Schritt wurde die Reaktion mit 800 µl Stammzellmedium gestoppt und die Zellen wurden resuspendiert.
- Die Zellen konnten dann in Stammzellmedium weiter kultiviert werden. Sobald circa 4 Mio. Zellen vorhanden waren, wurden diese gesammelt und im Rahmen der MACS-Zellisolierungsmethode selektiert.

4.2.3 MACS-Zellisolierung

- Zur Erstellung der Pufferlösung wurde MACS BSA Stock Solution 1:20 mit autoMACS Rinsing Solution verdünnt. Entsprechend enthielt sie PBS pH 7,2 sowie 0,5 % BSA und 2 mM EDTA. Die Puffermischung wurde zunächst bei Raumtemperatur 30 min im Ultraschallbad entgast und anschließend auf 4 °C abgekühlt.
- Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und anschließend 10 min lang bei 300 g ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 5 ml HBSS (w) aufgenommen und vorsichtig mit einer 1000 µl Pipette resuspendiert, bis makroskopisch keine sichtbaren Zellklumpen mehr vorhanden waren.
- Hinterher wurde die Zellsuspension auf einen zuvor mit 500 µl HBSS (w) benetzten 30-µm-Filter pipettiert. Nachdem sie durch den Filter gelaufen war, wurde 3-mal mit jeweils 500 µl HBSS (w) nachgespült.
- Die filtrierte Zellsuspension wurde sodann bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das entstandene Zellpellet mit 80 µl kalter (4 °C) Pufferlösung aufgenommen. Dazu wurden 20 µl Anti-Prominin-1 MicroBeads (4 °C) pipettiert. Die anschließende Inkubation des Gemisches erfolgte bei 4 °C für 15 min.
- Nach der Inkubation wurden 2 ml Puffermischung dazu pipettiert und erneut bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss an das Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 500 µl Puffermischung aufgenommen und resuspendiert.

- Es wurde ein MACS MS Column im magnetischen Feld eines MACS-Separators platziert und anschließend mit 500 µl Pufferlösung vorgespült. Danach wurde die mit Antikörper markierte Zellsuspension auf das MS Column pipettiert, wobei die nicht gebundenen Zellen durchflossen und in einem Falcon-Röhrchen aufgefangen wurden. Im nächsten Schritt wurde noch 3-mal mit jeweils 500 µl Pufferlösung nachgespült. Die aufgesammelte Zellsuspension wurde 10 min lang bei 300 g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes entsprach das Zellpellet der Prominin1-negativen Zellpopulation.
- Das Column konnte dann vom magnetischen Feld entfernt und auf einem frischen Falcon-Röhrchen platziert werden. Auf Ersteres wurden 1000 µl Pufferlösung pipettiert, sodass sich die mit Antikörper markierten Zellen durch eine intensive Spülung aus dem Column gewinnen ließen. Die Zellsuspension wurde anschließend 10 min lang bei 300 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes entsprach das Zellpellet der Prominin1-positiven Zellpopulation.
- Sowohl die Prominin1-negative als auch die -positive Zellpopulation wurden dann in Stammzellmedium auf mit Matrigel beschichteten Zellkulturplatten weiterkultiviert.

4.2.4 Passagieren von Neurosphären der Stammzellen

- Die sich aus Prominin1-positiven Zellpopulationen entwickelnden Neurosphären wurden samt Stammzellmedium bei 200 g für 3 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in 1000 µl PBS aufgenommen und anschließend nochmals bei 200 g für 3 min zentrifugiert.
- Im Anschluss an das Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 100 µl Trypsin aufgenommen und 5 min lang bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine mechanische Auftrennung der Sphären mittels Resuspendierung durch eine Pipette, wobei 10-mal vorsichtig auf- und abpipettiert wurde. Anschließend wurde die Verdauungsreaktion mit 900 µl FCS gestoppt.
- Die Zellsuspension wurde bei 200 g für 3 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in 1000 µl Stammzellmedium aufgenommen. Zuletzt wurden die Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen auf mit Matrigel beschichteten Zellkulturplatten kultiviert.

4.3 Molekulargenetische Methoden

4.3.1 RNA-Isolation aus Zellkultur und Gewebe

Zur RNA-Isolation aus nativem Gewebe wurden circa 200 mg große Gewebeproben mechanisch zerschnitten und in 2 ml Tri Reagent® mit dem Homogenisator Micra homogenisiert. Bei Zellkulturen wurden diese mit 2 ml Tri Reagent® direkt in der Kulturschale weiterbearbeitet.

Im Anschluss fand eine Aufteilung der Lysate auf je zwei Ansätze statt. Weiter wurde gemäß den folgenden Schritten vorgegangen:

- Zu den beiden Ansätzen wurden jeweils 0,4 ml Chloroform gegeben. Diese wurden anschließend für 15 s gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurden die Ansätze 15 min lang bei 12 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Hiernach zeigte sich eine Auftrennung in zwei Phasen.
- Die oben liegende klare Phase wurde abgenommen und mit je 1 Volumen Isopropanol vermischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur, danach erfolgte ein Zentrifugieren der Ansätze bei 12 000 rpm und 4 °C für 15 min.
- Nach Entfernung des Überstandes wurde das RNA-Pellet mit 1,5 ml gekühltem 70%igem Ethanol aufgenommen und gevortext. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation der Ansätze für 5 min bei 7500 rpm und 4 °C.
- Der entstandene Überstand wurde ebenfalls verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Anschließend erfolgte die Lösung des Pellets in 50 µl Aqua destillata für 15 min bei 55 °C. Anschließend erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration mithilfe des BioPhotometers. Die Proben waren danach bereit für die weitere Verarbeitung.

4.3.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde wie folgt durchgeführt:

- Pro Ansatz wurden 2 µg RNA verwendet und mit DNase- und RNase-freiem Aqua destillata aufgefüllt, so dass ein Gesamtvolumen von 7 µl erreicht wurde. Dazu wurden 5 µl ‚random‘ Primer (20 ng/µl) gegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert.
- Hinterher folgte die Zugabe von 4 µl 5x1st Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT sowie 1 µl 10 mM dNTPs. Der Gesamtansatz wurde dann für 10 min bei Raumtemperatur

inkubiert.

- Nach einer anschließenden Inkubation von 2 min bei 42 °C wurden 1 µl SuperScript® II (200 U/µl) hinzugegeben. Der Ansatz wurde durch vorsichtiges Pipettieren vermischt und für 1 h bei 42 °C inkubiert.
- Zur Inaktivierung von SuperScript® II wurde der Ansatz im Anschluss 10 min lang bei 70 °C inkubiert.
- Um verbleibende RNA im Ansatz zu eliminieren, wurden 1 µl RNase H (1 U/µl) hinzugefügt und der Ansatz für 20 min bei 37 °C inkubiert.
- Zum Schluss wurde der Ansatz mit 79 µl DNase- und RNase-freiem Aqua destillata aufgefüllt, so dass eine cDNA-Endkonzentration von 20 ng/µl vorlag.

4.3.3 Q-PCR

Die quantitative *real-time* PCR (Q-PCR) wurde zur Expressionsanalyse verschiedener Gene auf RNA-Ebene verwendet. Für jedes zu untersuchende Gen wurden zwei Wells einer 96-Well-Platte belegt. Pro Gen wurden 2 µl cDNA (Konzentration 20 ng/µl) mit folgendem Ansatz aufgesetzt:

10 µl	2x iTaq SYBR-Green Supermix with ROX
1 µl	Primer forward (10 µM)
1 µl	Primer reverse (10 µM)
6 µl	Aqua destillata

Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Erste Denaturierung:	2 min	95 °C
40 Zyklen:	Denaturierung:	15 s 95 °C
	Hybridisierung:	15 s 55 °C
	Elongation:	20 s 68 °C
Schmelzkurve:	15 s	95 °C
	20 min	55–95 °C
	15 s	95 °C
Hold:		4° C

Es war möglich, die Spezifität der Primer-Bindung durch die zugehörigen Schmelzkurven zu analysieren.

Eine gleichzeitige Messung der Expression des Haushaltsgens *TATA-box-binding protein*

(*Tbp*) wurde durchgeführt, um die einzelnen Werte normieren zu können. Die Berechnung erfolgte nach folgender Gleichung:

Expression relativ zu Referenzgen = $2^{-(Ct \text{ zu untersuchendes Gen} - Ct \text{ Tbp})}$, nach Paffl et al. 2001.

5. Ergebnisse

5.1 Etablierung von Medulloblastomzelllinien aus Primärtumorgewebe

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Schritt versucht, aus primärem Tumorgewebe MB-Zelllinien zu generieren, die zunächst mit Stammzellmedium kultiviert wurden.

Aus dem nativen Tumorgewebe von *Ptch^{neo67/+}*-Mäusen konnte mit dem Neural Tissue Dissociation Kit eine Einzelzellsuspension hergestellt werden (Abbildung 5.1 links), die auf mit Matrigel beschichteten Kulturplatten unter Stammzellmedium einen adhärenen Zellrasen ausbildete (Abbildung 5.1 rechts). Sobald dies geschah, war es möglich, auf die Beschichtung zu verzichten. Die weitere Kultivierung fand in Stammzellmedium statt. Anhand dieser Methode gelang es, MB-Zelllinien aus den *Ptch^{neo67/+}*-Mäusen 26B und 76C zu kultivieren.

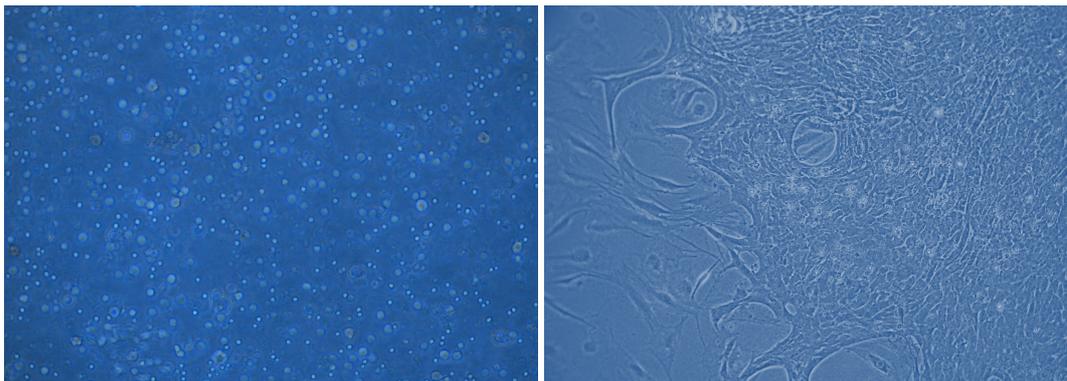


Abbildung 5.1: Einzelzellsuspension nach Dissoziation (links). Adhärenter Zellrasen nach Kultivierung mit Stammzellmedium nach 3 Tagen (rechts)

5.2 Bildung von Neurosphären durch Prominin1-positive Zellen

Nachdem die neu etablierten Zelllinien 26B und 76C unter Stammzellmedium für circa 7 Tage kultiviert wurden und sich pro Zelllinie eine ungefähre Anzahl von 4×10^6 erreichen ließ, konnte mittels der MACS-Methode eine Zellisolierung der Tumorstammzellen anhand des Oberflächenmarkers Prominin1 durchgeführt werden. Zu Beginn der Arbeit waren bereits etablierte MB-Zelllinien vorhanden (p794, p627 und p723), für diese Untersuchung wurden die etablierten Zellen ebenfalls verwendet.

Direkt nach der Zellseparierung erfolgte dann eine Analyse der MB-Zelllinien hinsichtlich ihres prozentualen Anteils Prominin1-exprimierender Zellen durch Zellzählung. Es zeigte

sich, dass die Anteile der Prominin1-positiven Zellpopulationen zwischen den verschiedenen Zelllinien variierten (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Anteil Prominin1-positiver Zellen nach MACS-Zellisolierung

Zelllinie	26B	76C	p794	p723	p627
Prominin1+ Zellen	25 %	16 %	10 %	3 %	4 %

Um die typische Neurosphärenbildung von Tumorstammzellen bei den vorliegenden Zelllinien nachzuweisen wurden sowohl die Prominin1-positiven als auch die -negativen Zellen in Stammzellmedium aufgenommen und mit einer Dichte von circa 50 000 Zellen/ml bei 37 °C kultiviert. Bei den Zelllinien 26B und 76C aus dem Primärtumorgewebe zeigten die Prominin1-positiven Zellen am vierten Tag eine Sphärenbildung (Abbildung 5.2 und 5.4). Hingegen entwickelten sich bei den Prominin1-negativen Zellen dichte Zellaggregate (26B, Abbildung 5.3) oder ein adhärenter Zellrasen (76C, Abbildung 5.5).

Im Falle der drei etablierten Zelllinien p794, p723 und p627 war bei den Prominin1-positiven Zellen demgegenüber nur bei p794 eine Neurosphärenbildung erkennbar, während die beiden anderen Zelllinien lediglich kleinere Zellaggregate hervorbrachten. Auch die Prominin1-negative Zellkultur aller drei Zelllinien zeigte durchweg ausschließlich unförmige Zellaggregate mit mehreren Einzelzellen.

Prom1-positiv

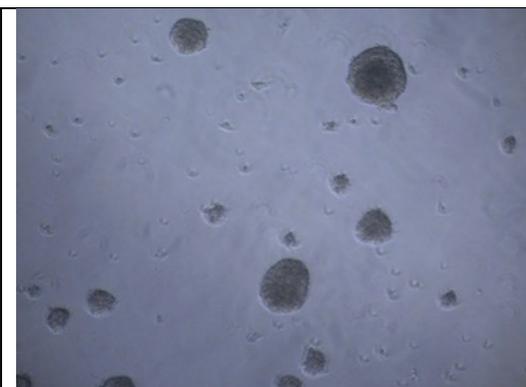


Abbildung 5.2: Prominin1-positiv 26B nach MACS und 4 Tagen in Stammzellmedium

Prom1-negativ

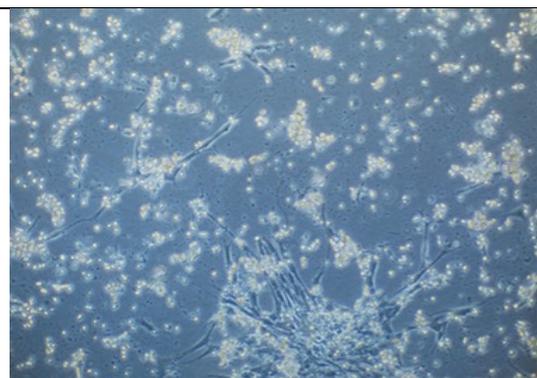


Abbildung 5.3: Prominin1-negativ 26B nach MACS und 4 Tagen in Stammzellmedium

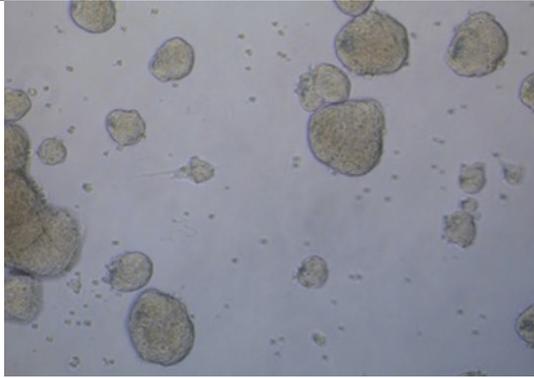


Abbildung 5.4: Prominin1-positive 76C nach MACS und 4 Tagen in Stammzellmedium

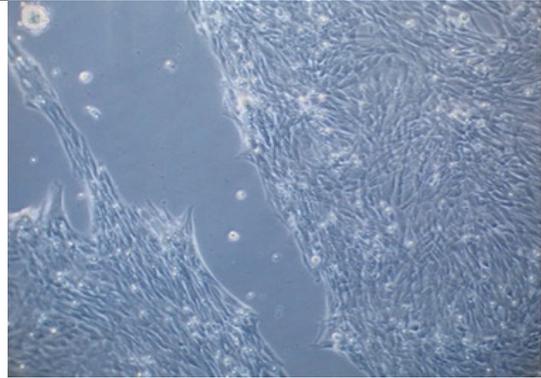


Abbildung 5.5: Prominin1-negative 76C nach MACS und 4 Tagen in Stammzellmedium

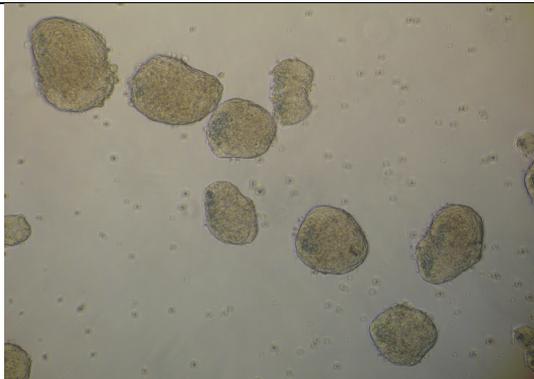


Abbildung 5.6: Prominin1-positive p794 nach MACS und 4 Tagen in Stammzellmedium

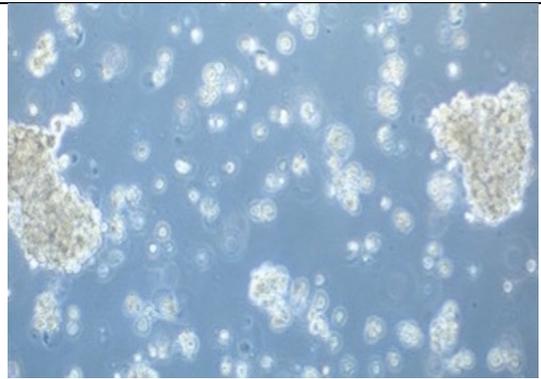


Abbildung 5.7: Prominin1-negative p794 nach MACS und 4 Tagen in Stammzellmedium

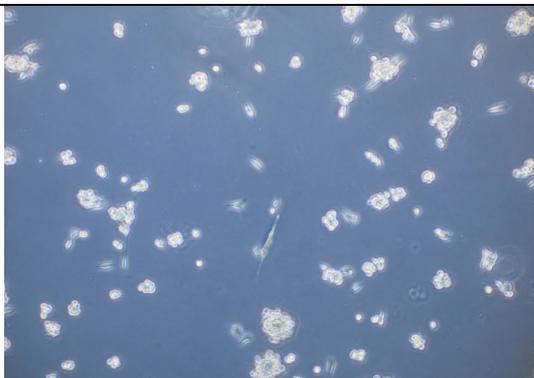


Abbildung 5.8: Prominin1-positive p723 nach MACS und 4 Tagen in Stammzellmedium

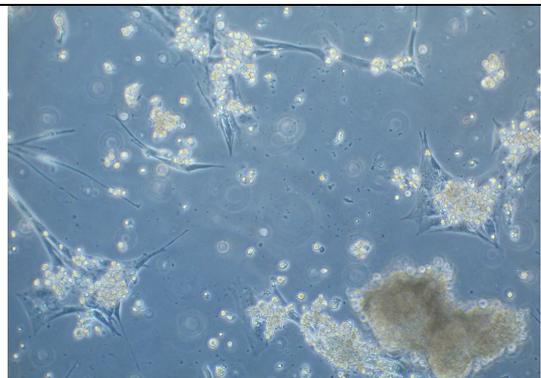


Abbildung 5.9: Prominin1-negative p723 nach MACS und 4 Tagen in Stammzellmedium

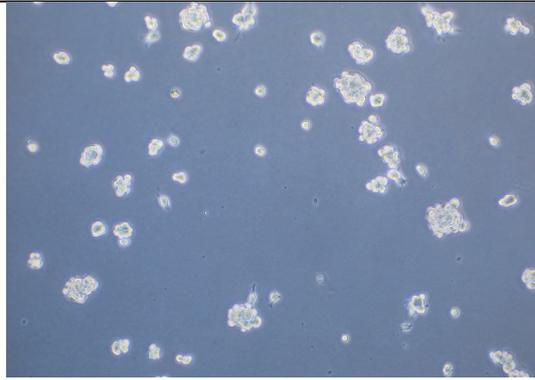


Abbildung 5.10: Prominin1-positive p627 nach MACS und 4 Tagen in Stammzellmedium

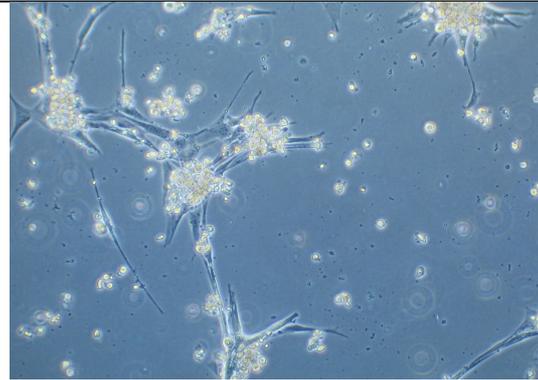


Abbildung 5.11: Prominin1-negative p627 nach MACS und 4 Tagen in Stammzellmedium

Insgesamt verdeutlichten diese Versuche, dass Prominin1-exprimierende Zellen nicht zwangsläufig mit einer Neurosphärenbildung einhergehen. Zu Letzterer kam es vor allem bei den drei Zelllinien 76C, 26B und p794, die einen höheren Anteil an Prominin1-positiven Zellen aufwiesen (Tabelle 5.1).

Bis zu diesem Schritt lässt sich das Ergebnis dieser Arbeit zusammenfassend in folgender Abbildung wiedergeben:

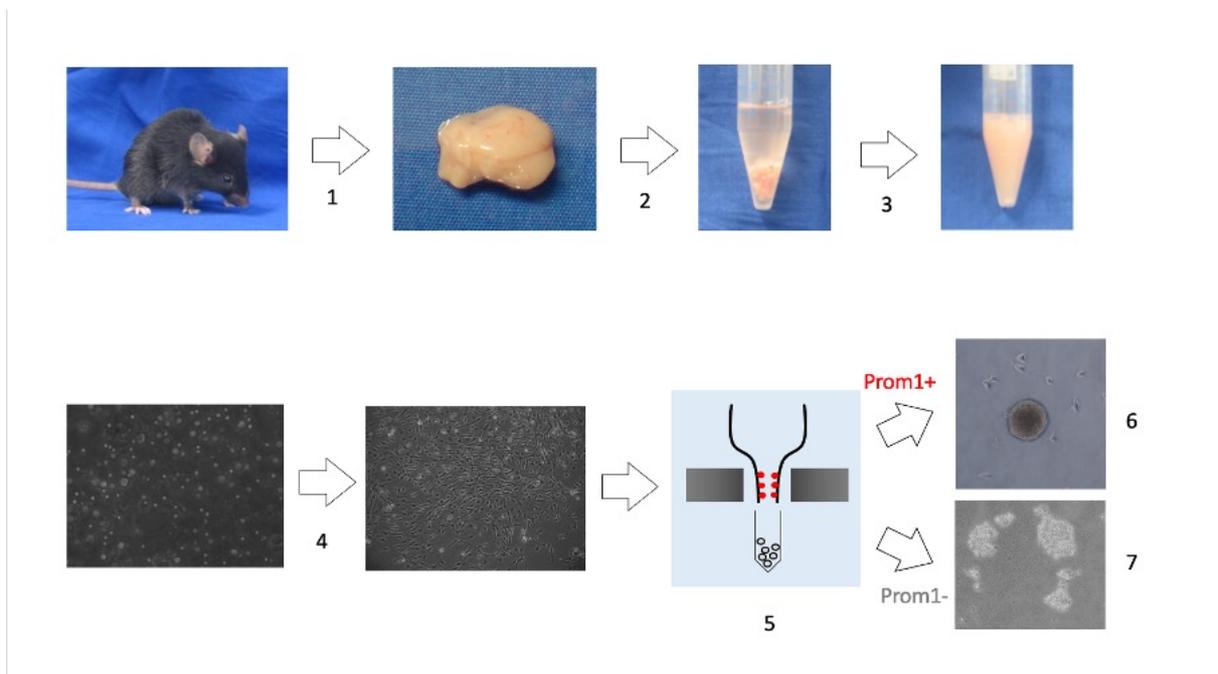


Abb. 5.12 Generierung von Prominin1-positiven Neurosphären aus nativem Medulloblastom von *Ptch^{neo67/+}*-Mäusen 1. Präparation des Kleinhirns mit Medulloblastomanteil bei *Ptch^{neo67/+}*-Mäusen. 2. Mechanische Zerkleinerung des Tumors mit Skalpell und Aufnahme der Tumormasse in HBSS. 3. Enzymatische Verdauung der

- mechanisch zerkleinerten Tumormasse bis hin zur Einzelzellsuspension. 4. Kultivierung der Einzelzellsuspension mit Stammzellmedium bis hin zu einer adhärennten Zellkultur.**
- 5. MACS-Zellisolierung anhand des Oberflächenmarkers Prominin1.**
- 6. Prominin1-positive Zellen bilden unter Stammzellmedium Neurosphären aus.**
- 7. Prominin1-negative Zellen bilden unter Stammzellmedium Zellaggregate aus.**

Durch eine unterschiedliche Morphologie konnte also die Prom1+ und Prom1- negativen Zellen voneinander differenziert werden. In den nachfolgenden Schritten galt es nun näher zu beleuchten, ob die Prominin1-positiven Zellen Selbsterneuerungsfähigkeiten besaßen und ferner wie sich die Prom1-positiven Zellen und Prom1- negativen Zellen, die sich nun in der Morphologie unterschieden, auch auf transkriptioneller Ebene verschiedene Merkmale aufweisen.

5.3 Nachweis von Selbsterneuerungsfähigkeit bei Neurosphären

Da den Zellen der Neurosphäre Stammzelleigenschaften zugeschrieben werden, untersuchten wir die Selbsterneuerungsfähigkeiten der Neurosphären. Hierfür wurden die Prominin1-positiven Neurosphären mit Trypsin zu einer Einzelzellsuspension aufgelöst. Anschließend wurde diese verdünnt unter geringer Dichte in Stammzellmedium als Kultur angesetzt. Der Ansatz wurde nach 14 Tagen Inkubationsdauer gestoppt und die Anzahl der neu gebildeten Neurosphären sowie der verbliebenen Einzelzellen ausgezählt. Hierfür wurde die Zelllinie p794 verwendet.

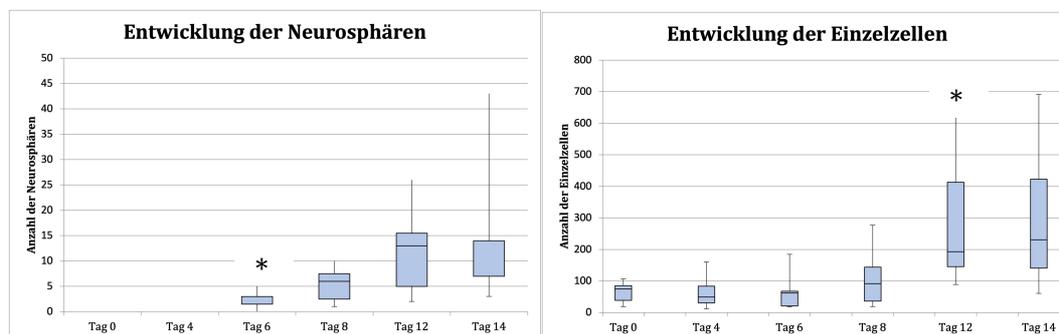


Abbildung 5.13: Entwicklung der Neurosphären und Einzelzellen aus Einzelzellsuspension mit Stammzellmedium; *: t-Test < 0,05 im Vergleich zum Vortag

Die Entwicklung der Einzelzellen und der Neurosphären zeigte in den beobachteten 2 Wochen eine Zunahme in der Anzahl. Diese Zunahme wies bei den Neurosphären einen signifikanten Anstieg (t-Test < 0,05) von Tag 4 auf Tag 6 auf (Abbildung 5.13 links). Bei den Einzelzellen konnte ein signifikanter Anstieg (t-Test < 0,05) des Wachstums von Tag 8 auf Tag 12 festgestellt werden (Abbildung 5.13 rechts). Neurosphären sind also in der Lage, sich selbst zu erneuern.

5.4 Morphologische Veränderung der Neurosphären nach Entzug von Stammzellmedium

Für diesen Versuch wurden die Neurosphären der Zelllinie p794 anstatt mit Stammzellmedium mit DMEM (+ 10 % FCS) weiter kultiviert. Hier zeigte sich bereits am zweiten Tag ein adhärenthes Wachstum, das der Morphologie der adhärenthen Zellrasen wie vor der MACS-Zellisolierung ähnelte (Abbildung 5.14).

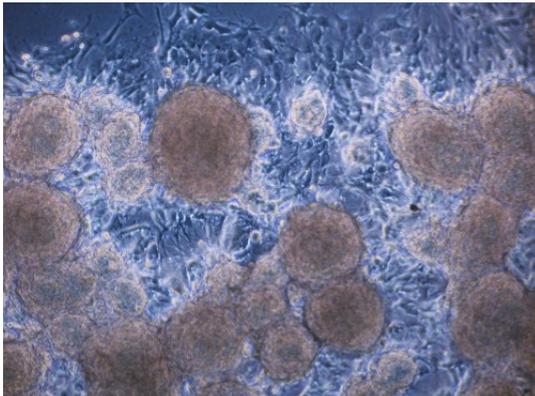


Abbildung 5.14: p794-Neurosphären mit DMEM am zweiten Tag

5.5 Genexpression

5.5.1 Vergleich der Genexpression zwischen Medulloblastomen und gesunden Cerebelli

Da eine Aktivierung des Shh-Signalweges mit erhöhter Expression von *Ptch* und *Gli1* zur Entstehung von MB führen kann [79-82], sollte überprüft werden, ob bei unseren MB im Vergleich zu gesunden Cerebelli (CB) eine erhöhte Aktivität des Shh-Signalweges vorlag. Als Vertreter gesunder CB wurden die Kleinhirne der Mäuse 63D, 65D und 66D präpariert. Die RNA wurde aus dem Gewebe nach dem Protokoll extrahiert und in cDNA

umgeschrieben. Im Falle von MB wurde dasselbe Vorgehen an den Mäusen 26B, 43E und 86.2 durchgeführt.

Anschließend erfolgte im Rahmen einer quantitativen RT-PCR eine Untersuchung der relativen Expression der Gene.

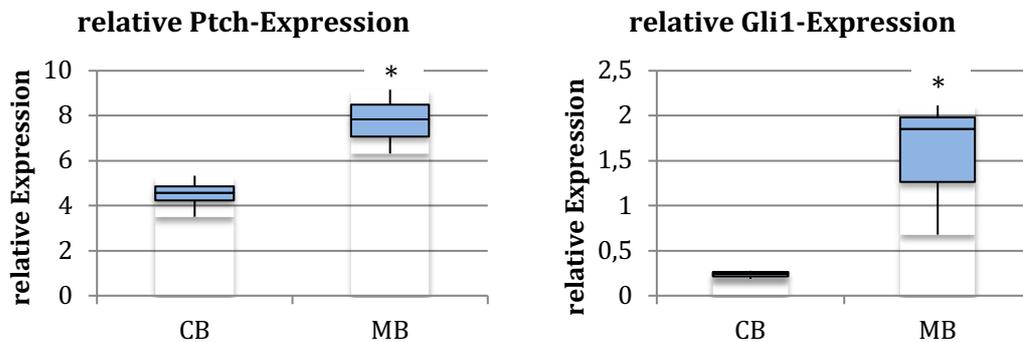


Abbildung 5.15: Relative Ptch- und Gli1-Expression bei gesunden und bei MB; *: t-Test < 0,05 im Vergleich zur Genexpression bei CB

Sowohl bei *Ptch* als auch bei *Gli1* konnte im Falle der MB eine signifikant erhöhte Expression festgestellt werden (Abbildung 5.15).

Ebenfalls untersuchten wir die Expression der Tumorstammzellmarker *Prominin1* und *CD15*. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Tumorstammzellmarkern mit einer erhöhten Aggressivität des MB einhergeht [83, 84]. So ließ sich auch bei unseren MB-Mäusen nachweisen, dass hier im Gegensatz zu den gesunden CB eine signifikant erhöhte Expression von *CD15* vorlag. Wider Erwarten konnte dies jedoch nicht für *Prominin1* bestätigt werden (Abbildung 5.16). Es sollte aber in Betracht gezogen werden, dass dieses ebenso einen Stammzellmarker für neurale Stammzellen darstellt [35] und somit kein spezifischer Tumorstammzellmarker für MB ist.

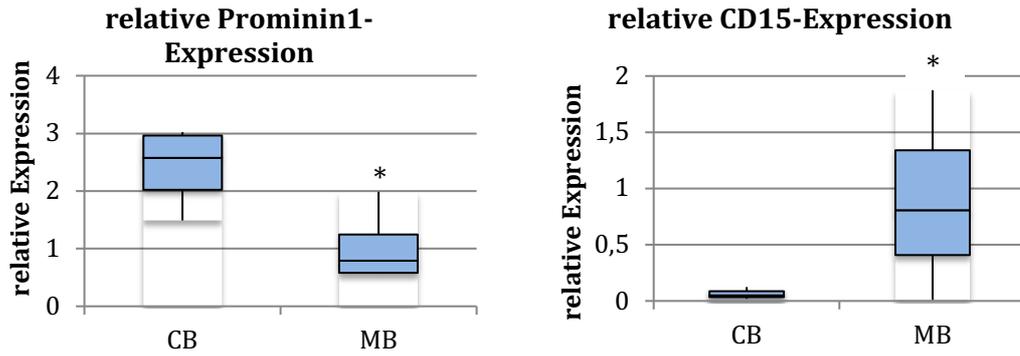


Abbildung 5.16: Relative Prominin1- und CD15-Expression bei gesunden CB und bei MB; *: t-Test < 0,05 im Vergleich zur Genexpression bei CB

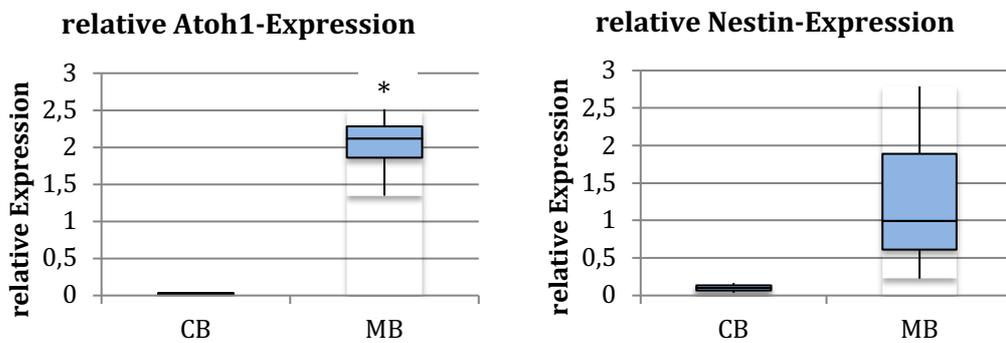


Abbildung 5.17: Relative Atoh1- und Nestin-Expression bei gesunden CB und bei MB; *: t-Test < 0,05 im Vergleich zur Genexpression bei CB

Unterstützend zu der Annahme, dass MB aus den nicht ausgereiften Vorläuferzellen der Körnerzellschicht im Kleinhirn entstehen [17], konnte eine signifikant erhöhte Expression der Oberflächenmarker für Körnervorläuferzellen *Atoh1* in den MB-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 5.17).

Eine vermehrte Expression des Tumorstammzellmarkers Nestin konnte nicht ausreichend signifikant festgestellt werden (Abbildung 5.17). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Nestin ebenfalls von normalen neuronalen Stammzellen und Endothelzellen sezerniert wird [29].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in MB von einer erhöhten Aktivität des Shh-

Ptch-Signalweges ausgegangen werden kann, da bei MB eine erhöhte Expression von *Ptch* und *Gli1* nachweisbar ist. Auch ist anzunehmen, dass eine erhöhte Expression von Tumorstammzellmarker sowie Marker der Vorläuferzellen in MB vorliegt. Ob diese Erhöhung der Expression auf eine bestimmte Zell-Subpopulation innerhalb der MB Zellen zurückzuführen ist, nämlich auf die sogenannten Tumorstammzellen, soll im Folgenden näher untersucht werden.

5.5.2 Validierung der MACS-Zellisolierung mittels real-time RT-PCR

Nach der Zellisolierung mittels MACS wurde sowohl aus der Prominin1-positiven als auch aus der -negativen Zellfraktion RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Ziel war es, anhand einer quantitativen RT-PCR die Prominin1-Expression zu bestimmen und somit eine erfolgreiche Separation zu verifizieren.

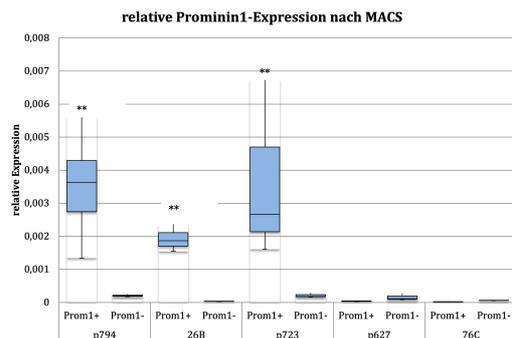


Abbildung 5.18: Validierung der MACS-Zellisolierung bei p794, 26B, p723, p627 und 76C; **: t-Test < 0,01 im Vergleich zu den Prominin1-negativen Zellen

Bei den Zelllinien p794, 26B und p723 konnte von einer erfolgreichen Separation der Prominin1-positiven und der -negativen Zellen ausgegangen werden (Abbildung 5.18). Im Falle der Zelllinien p627 und 76C ließ sich in der quantitativen RT-PCR keine ausreichende Prominin1-Expression nachweisen. Insofern war es auch wie zu erwarten nicht möglich, eine suffiziente Separation anhand dieses Oberflächenmarkers zu erreichen.

5.5.3 Vergleich der Genexpression zwischen Prominin1-positiven und -negativen Zellen bei Medulloblastomen

Im folgenden Versuch wurde die Expression ausgewählter Gene zwischen den zwei Zellpopulationen nach MACS verglichen. Da bei den Zelllinien p794, 26B und p723 eine erfolgreiche Separierung nachweisbar war, wurden die anschließenden Versuche auf diese drei ausgerichtet. Aus Prominin1-positiven sowie -negativen Zellen wurde die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben.

Als Erstes soll nun untersucht werden, ob bei den Prominin1-positiven Zellen eine erhöhte Expression von Oberflächenmarker für Tumorstammzellen und Vorläuferzellen vorliegt.

In einer Arbeit von Reads et al. von 2009 konnte gezeigt werden, dass Zellen mit den Oberflächenmarkern CD15 und *Atoh1* tumorinitiierende Eigenschaften bezüglich MB besitzen [42]. Des Weiteren wiesen diese Zellen eine erhöhte Proliferationskapazität und eine verminderte Fähigkeit zur Apoptose auf [42]. In allen drei Zelllinien der vorliegenden Arbeit ließ sich ein signifikanter bis hochsignifikanter Unterschied in der Expression von *CD15* zwischen Prominin1-positiven und -negativen Zellpopulationen nachweisen (Abbildung 5.19).

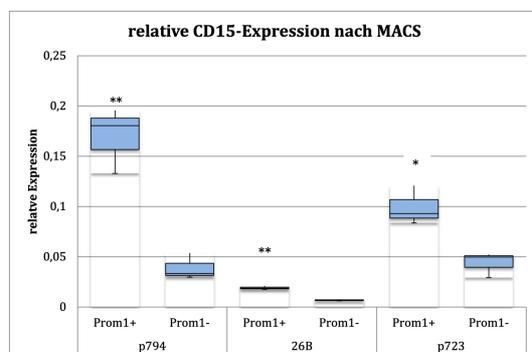


Abbildung 5.19: Relative CD15-Expression; **: t-Test < 0,01, *: t-Test < 0,05 im Vergleich zu den Prominin1-negativen Zellen

Ebenfalls konnte eine signifikant erhöhte Expression von *Atoh1*, ein Oberflächenmarker der unreifen Körnerzellschicht, in der Prominin1-positiven Subpopulation der Zelllinien 794 und 26B nachgewiesen werden (Abbildung 5.20).

Nestin gilt als ein weiterer Oberflächenmarker für Tumorstammzellen [85]; insbesondere wurde eine Co-Expression von Nestin und CD133 beobachtet [29]. In der vorliegenden

Arbeit konnte für die Zelllinie 794 eine signifikant erhöhte Expression von Nestin bei der Prominin1-positiven Subpopulation bestätigt werden (Abbildung 5.20). Im Falle der Zelllinie 26B zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Hinsichtlich der Zelllinie 723 war hingegen wider Erwarten eine signifikant niedrigere Nestin-Expression in der Prominin1-positiven Subpopulation zu erkennen.

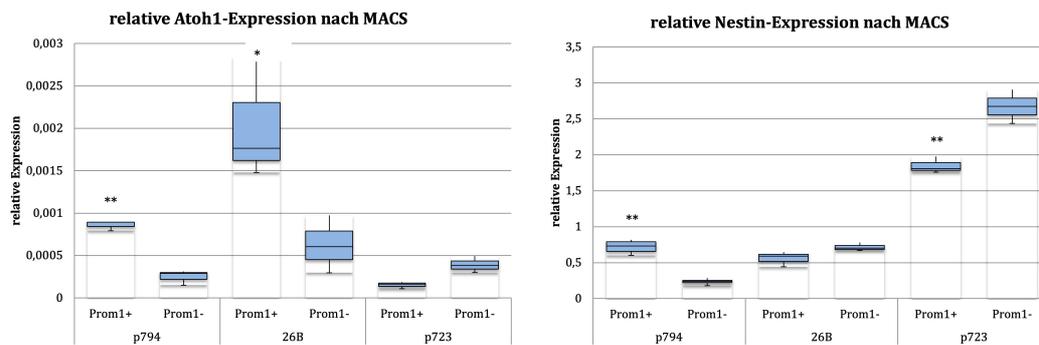


Abbildung 5.20: Relative Atoh1- und Nestin-Expression; **: t-Test < 0,01, *: t-Test < 0,05 im Vergleich zu den Prominin1-negativen Zellen

Nachdem die Expression von Oberflächenmarker für Tumorstammzellen und Vorläuferzellen beleuchtet wurde sollte nun auch die Aktivität des Shh-Signalweges untersucht werden. Um die Aktivität des Shh-Signalweges einzuschätzen, wurden die Target-Gene *Ptch*, *Gli1*, *Ccnd1* und *Mycn* untersucht.

Bei *Gli1* und *Ptch* konnte eine signifikant erhöhte Expression in den Prominin1-positiven Zellpopulationen aller drei Zelllinien festgestellt werden (Abbildung 5.21).

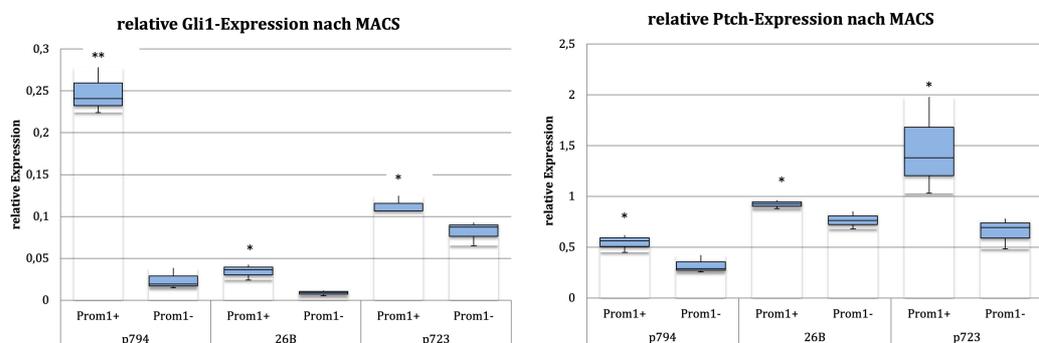


Abbildung 5.21: Relative Gli1- und Ptch-Expression; **: t-Test < 0,01, *: t-Test < 0,05 im Vergleich zu den Prominin1-negativen Zellen

Eine signifikante Erhöhung von *Ccnd1* und *Mycn*, das heißt eine Aktivierung des Shh-Signalweges, ließ sich in den Prominin1-positiven Zellen bei allen drei Zelllinien für *Ccnd1* (Abbildung 5.22) und in zwei Zelllinien für *Mycn* (Abbildung 5.22) bestätigen [86].

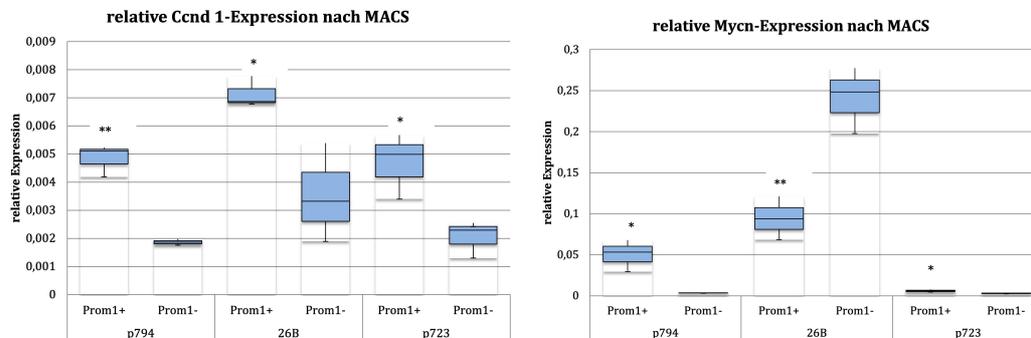


Abbildung 5.22: Relative Ccnd1- und Mycn-Expression; **: t-Test < 0,01, *: t-Test < 0,05 im Vergleich zu den Prominin1-negativen Zellen

Zusammenfassend kann von einer erfolgreichen Separation anhand des Oberflächenmarkers Prominin1 ausgegangen werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen den Tumorstammzelloberflächenmarkern Prominin1 und CD15, sowie Prominin1 und Atoh1 besteht, jedoch nicht zwischen Prominin1 und Nestin. Darüber hinaus ließ sich eine signifikante Erhöhung der Aktivität des Shh-Signalweges in den Prominin1-positiven Zellen nachweisen.

6. Diskussion

Das Verständnis für die Entstehung von Tumoren und einer entsprechenden Therapie ist in der heutigen Medizin essenziell. Durch eingehende Erkenntnisse über die Biologie eines Tumors können effektivere und zielführendere Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden.

Vor dem Hintergrund der Tumorstammzelltheorie galt es in dieser Arbeit zu untersuchen, ob die sogenannten Tumorstammzellen tatsächlich nachweisbar sind und Stammzeleigenschaften haben. Im zutreffenden Fall stellte sich die Frage, welche zusätzlichen Merkmale sie aufweisen.

6.1 Primärzellkultur aus Medulloblastom-Mäusen

Etablierte MB-Zelllinien haben sich bereits vielfach bewährt, um in Studien ein besseres Verständnis von MB zu entwickeln. Jedoch ist zu bedenken, dass sie über längere Zeit zu ebenjenem Zweck kultiviert worden sind und mehrere Passagen durchlaufen haben. Aus diesem Grund sind genetische Mutationen und Alterationen, die im weiteren Verlauf entstanden sind, nicht ausgeschlossen [87]. Daher war es relevant, in der vorliegenden Arbeit neben etablierten auch eigene primäre Zelllinien direkt aus MB zu generieren, um diese untereinander vergleichen zu können.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden zwei Zellkulturen aus *Ptch^{neo67/+}*-MB angelegt und die Tumorstammzellen hieraus mittels des Tumorstammzellmarkers Prominin1 isoliert. Letztere wurden wiederum weiter als Zellkultur angelegt.

6.2 Bildung von Neurosphären durch Prominin1-positive Zellen

Nach der Etablierung primärer MB-Zelllinien unter Stammzellbedingungen konnte anhand des Oberflächenmarkers Prominin1 eine Selektion der Tumorstammzellen durchgeführt werden.

Unter Stammzellmedium ließen sich, wie in vorangegangenen Arbeiten demonstriert, aus Prominin1-positiven Einzelzellen sogenannte Neurosphären kultivieren [35, 88, 89].

Prominin1-negative Zellen formten im Gegensatz hierzu unförmige Zellaggregate aus. Dies könnte unter Umständen darauf zurückzuführen sein, dass im Falle einer erhöhten

Zelldichte beim Aussähen – aufgrund des vorhandenen Zell-Zell-Kontakts – vermehrt Neurone entstanden [90]. Diese resultierten dann in der entsprechenden Morphologie der Zellaggregate.

Die angezüchteten Neurosphären wurden weiter untersucht, indem sie wieder in Einzelzellen aufgelöst wurden. Auch die Selbsterneuerungsfähigkeit in Bezug auf Tumorstammzellcharakteristika konnte bestätigt werden [24, 26].

6.3 Erhöhte Expression von Tumorstammzellmarker in Medulloblastomen

Es konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikant erhöhte Expression von Tumorstammzellmarkern (*CD15* und *Atoh1*) in MB im Vergleich zu gesunden CB festgestellt werden. Dies deutet auf ein vermehrtes Vorliegen von Tumorstammzellen in MB hin. Ob nun hierdurch die sogenannte Tumorstammzelltheorie im Hinblick auf die Entstehung von MB [89] unterstützt wird, wird durch eine differenzierte Betrachtung der verschiedenen Zellen (*Prominin1*⁺ und *Prominin1*⁻) innerhalb eines MB beurteilt (Kapitel 6.4).

Wie bereits erwähnt, konnte wider Erwarten keine erhöhte Expression für *Prominin1* in MB festgestellt werden (Abbildung 5.16). Einerseits ist dieser kein spezifischer Tumorstammzellmarker, sondern auch ein Marker für neurale Stammzellen [35]. Es wäre also denkbar, dass eine erhöhte Expression von *Prominin1* in CB einem hohen Anteil an neuronalen Stammzellen zuzuschreiben ist. Andererseits wurde auch schon in neueren Arbeiten demonstriert, dass die Expression von *Prominin1* beziehungsweise *CD133* kein zuverlässiger Marker für tumorinitiierende Zellen ist – im Gegensatz zu solchen mit erhöhter Co-Expression von *CD24* und *CD15* [91]. Ob nun eine Korrelation zwischen *Prominin1* und *CD24* besteht, bleibt noch in zukünftigen Arbeiten zu untersuchen.

Für den Marker der Körnervorläuferzellen [55] *Atoh1* konnte in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Expression in MB gezeigt werden (Abbildung 5.17). Dies stimmt mit der tumorinitiierenden Eigenschaft von *Atoh1* überein, denn es konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion von *Atoh1* die Entstehung eines MB verhindern kann [57]. Für die Entstehung eines MB ist wiederum eine gleichzeitige Aktivierung des *Shh*-Signalweges und eine erhöhte Expression von *Atoh1* notwendig [56].

Im Falle von Nestin war in den MB keine signifikant erhöhte Expression festzustellen (Abbildung 5.17). Hierbei handelt es sich um einen Stammzellmarker, der sowohl von Tumor- als auch von neuronalen Stammzellen und Endothelzellen sezerniert wird. Wahrscheinlich ist, dass durch die Unspezifität der Expression keine signifikant erhöhte Expression in MB nachweisbar ist, obwohl Nestin als Marker bösartiger Hirntumorzellen gilt [51].

Es konnte also nicht durchgehend gezeigt werden, dass in MB, im Vergleich zu gesunden CB, eine erhöhte Expression von Tumorstammzellmarker vorliegt. Dies ist insofern nicht überraschend, da diese Tumorstammzellmarker (Prominin1, CD15, Atoh1 und Nestin) ebenfalls auch Marker für gesunde Stamm- und Vorläuferzellen im Kleinhirn darstellen. Im nächsten Schritt wurde also die Expression von Tumorstammzellmarker bei den Prominin1-positiven Zellen näher beleuchtet, um zu eruieren, ob Zellen, die bereits einen Tumorstammzellmarker besitzen, auch noch weitere Tumorstammzellmarker aufweisen. In anderen Worten, ob verschiedene Tumorstammzellmarker dieselben Zellen markierten, oder aber unterschiedliche Tumorstammzellmarker unterschiedliche Zellen markierten.

6.4 Erhöhte Expression von Tumorstammzellmarker bei Prominin1-positiven Zellen

Durch die MACS-Zellseparation wurden Prominin1-positive Zellen aus der Zellkultur herausselektiert. Wir erwarteten bei dieser Zellpopulation sogenannte Tumorstammzeleigenschaften, da Prominin1 einen Tumorstammzellmarker darstellt. Um zu verifizieren, ob weitere Tumorstammzellmarker coexprimiert werden, untersuchten wir in dieser Zellpopulation auch die zuvor schon in MB untersuchten Stammzellmarker Nestin, Atoh1 und CD15.

Bei den drei Zelllinien (p794, 26B und p723) zeigte sich eine schwankende Nestin Expression in den Prominin1-positiven und den -negativen Zellpopulationen (Abbildung 5.20). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, wie im Vergleich MB und CB, dass Nestin nicht ausschließlich von Tumorstammzellen exprimiert wird, und somit Faktoren wie Dichte der Endothelzellen beziehungsweise der Blutgefäße ebenso für die Nestin Expression entscheidend sind [50].

Bei *Atoh1* konnte in zwei von drei Zelllinien nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Expression in den Prominin1-positiven Zellen vorliegt (Abbildung 5.20). Es liegt also nicht nur eine signifikant erhöhte *Atoh1*-Expression in MB im Vergleich zu CB vor, sondern auch eine signifikante Erhöhung in den Prominin1-positiven Zellen des MB. Da *Atoh1* eine unerlässliche Rolle in der Entstehung des MB spielt [57], lässt dies nun vermuten, dass die Prominin1-positiven Zellen eine tragende Funktion in der MB-Entstehung darstellen.

In diversen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass CD15 den Marker für tumorinitiierende Zellen darstellt [42]. Auch in unserer Untersuchung ließ sich zeigen, dass die Prominin1-positive Zellpopulation eine erhöhte Expression von CD15 aufweist (Abbildung 5.19).

Die in diesem Schritt der Arbeit untersuchten Zellen stammen zum Teil von etablierten MB-Zelllinien (p794 und p723) und zum Teil von laboreigenen *Ptch^{neo67/+}*-Mäusen. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass MB-Zellen in Zellkultur, im Gegensatz zu Zellen aus nativem MB-Gewebe, die Aktivität des Shh-Signalweges runterregulieren. MB-Zellen aus Monolayer-Kultur weisen eine irreversible verminderte Aktivität des Shh-Signalweges auf [92, 93]. In dieser Arbeit verwendete p794 und p723 Zellen befanden sich in Monolayer-Zellkulturen, bevor sie sich nach der MACS-Zellisolation und Kultivierung mit Stammzellmedium in Neurosphären ausbildeten. Die Zellen von der Zelllinie 26B stammen aus nativem MB-Gewebe, die nach der Extrahierung aus dem Gewebeverband mit Stammzellmedium weiter kultiviert worden sind und sich schließlich zu Neurosphären ausbildeten. Ob nun dadurch die Aktivität des Shh-Signalweges erhalten bleibt und ob die p794 und p723 Zellen durch Neurosphären-Bildung und Stammzellmedium-Kultivierung eine Re-Aktivierung des Shh-Signalweges erfahren haben, bleibt leider offen und Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Es kann jedoch zusammenfassend gesagt werden, dass Tumorzellen, die Prominin1 exprimieren, auch vermehrt *Atoh1* und CD15 exprimieren. Insgesamt kann also von einer erhöhten Co-Expression von Tumorstammzellmarker ausgegangen werden. Dies deutet daraufhin, dass innerhalb eines MB eine Subpopulation von Zellen existiert, die vermehrt Stammzeleigenschaften aufweisen, eben die sogenannten Tumorstammzellen. Diese könnten durch den Oberflächenmarker Prominin1 herausselektiert werden, oder aber

auch durch weitere verschiedene Tumorstammzellmarker wie zum Beispiel CD15 oder Atoh1.

6.5 Erhöhte Aktivität des Sonic-Hedgehog-Signalweges bei Medulloblastomen

Es konnte bereits in mehreren Arbeiten eine Korrelation zwischen dem Shh-Ptch-Signalweg und der Entstehung von MB nachgewiesen werden [80-82, 94].

Der Shh-Ptch-Signalweg steuert die Proliferation und die Differenzierung der Körnervorläuferzellen. Bei Überproliferation kann dies in der Entwicklung von MB resultieren, denn MB benötigen eine aktive Shh-Ptch-Signalkaskade für die Heranbildung und das Wachstum [95-97].

In der vorliegenden Arbeit ließ sich dieser Umstand bestätigen, indem gezeigt wurde, dass in den MB-Zellen eine signifikant erhöhte Expression von *Gli1* und *Ptch* (Abbildung 5.15) vorhanden ist. Dies erscheint auf den ersten Blick unerwartet, weil es sich um *Ptch*-Knock-out-Mäuse handelt und *Ptch* als ein Tumorsuppressor-Gen gilt [98, 99]. Jedoch ist auch davon auszugehen, dass durch das Ausschalten des Suppressor-Gens keine Rückkopplung mehr in der Signalkaskade besteht, und dies somit zu einer verstärkten Aktivierung des Signalweges sowie der Expression der Target-Gene führt [100, 101].

Da der Shh-Signalweg eine essenzielle Rolle in der Entwicklung und der Ausdifferenzierung des Kleinhirns spielt [102], ist es nicht unvorhergesehen, dass auch eine gewisse Aktivität in den gesunden CB nachweisbar ist. Im Gegensatz zur Expression in den MB-Mäusen ist diese in gesunden CB jedoch signifikant niedriger [103].

Die Frage, ob nun in Tumorstammzellen des MBs eine andere Aktivität des Shh-Signalweges vorliegt als in den differenzierten Tumorzellen, sollte als nächstes beleuchtet werden.

6.6 Erhöhte Aktivität des Sonic-Hedgehog-Signalweges bei Prominin1-positiven Zellen

Gemäß der Erwartung, dass Tumorstammzellen die ‚treibende Kraft‘ in der Tumorentstehung darstellen, ist anzunehmen, dass in diesen Zellen auch eine erhöhte Aktivität des Shh-Signalweges vorliegt.

Dies konnte in der Untersuchung bestätigt werden:

Wie in den MB konnte auch in der Prominin1-positiven Zellpopulation eine erhöhte Expression von *Gli1* und *Ptch* (Abbildung 5.21) nachgewiesen werden. Auch für die weiteren Zielgene *Ccnd1* und *Mycn* (Abbildung 5.22) liegt eine erhöhte Expression in den Prominin1-positiven Zellen vor. Insgesamt kann also von einer erhöhten Aktivität des Shh-Signalweges in Tumorstammzellen ausgegangen werden.

Auffällig ist, dass im Falle von *Mycn* nur in zwei von drei Zelllinien eine signifikant erhöhte Expression bei Prominin1-positiven Zellen vorliegen (Abbildung 5.22). Für die MB-Zelllinie 26B trifft dies nicht zu, denn hier konnte eine signifikant erhöhte Expression von *Mycn* in den Prominin1-negativen Zellen nachgewiesen werden. Da *Mycn* ein essentielles Protein in der Entstehung und Entwicklung von MB darstellt [104], lässt das vorliegende Ergebnis schlussfolgern, dass eine Co-Expression von *Prominin1* und *Mycn* nicht immer gegeben ist. Welches die Vermutung mit sich zieht, dass Prominin1 womöglich nicht der einzige Tumorstammzellmarker für MB ist.

Ccnd1 spielt eine bedeutsame Rolle in der Entwicklung des Kleinhirns [78], es konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation von *Ccnd1*-Produktion in Körnervorläuferzellen diese sich zu MB-Zellen entwickelten [105]. Es ist also zu vermuten, dass in den sogenannten Tumorstammzellen (also Prominin1-positiven Zellen) eine erhöhte Expression von *Ccnd1* vorliegt. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden: In allen drei MB-Zelllinien zeigte die Prominin1-positive Zellpopulation eine signifikant erhöhte *Ccnd1*-Expression. Insofern können also die Prominin1-positive Zellen als ‚treibende Kraft‘ in der Entstehung von MB angesehen werden.

Dieses Ergebnis zeigt sich in Übereinstimmung mit Studien, die über eine Aktivierung des Shh-Signalweges in neuronalen Stammzellen [106, 107] und Tumorstammzellen [108] berichten. Im Gegensatz hierzu stehen Untersuchungen, die zeigen konnten, dass die Signalaktivität des Shh-Signalweges in Zellkultur reduziert ist [92, 109]. Allerdings wurde in den letzteren Untersuchungen zur Kultivierung der Stammzellen kein

Stammzellmedium verwendet, so dass die Stammzeleigenschaften und somit eventuell auch die Aktivität des Shh-Signalweges hierdurch beeinträchtigt sein könnten. Ebenfalls beschrieben die Autoren, dass in Zellkulturen mit erhöhter Shh-Signalaktivität die Stammzellen nur wenige Zellpassagen durchliefen. Es wäre also denkbar, dass nach einer längeren Kultivierung von Stammzellen ohne entsprechendes Stammzellmedium, sich bestimmte Eigenschaften der Zellen verändern, insbesondere in Bezug auf ihre Stammzeleigenschaften, unter anderem auch die Aktivität des Shh-Signalweges.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit entnahmen wir die Zelllinie 26 B direkt aus nativem Tumorgewebe (siehe Kapitel 4.2.1). Die gewonnenen Zellen wurden danach in Stammzellmedium kultiviert. Unter diesen Voraussetzungen konnte, in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Studien [108], eine erhöhte Shh-Signalaktivität in den Prominin1+ Zellen nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden auch bereits etablierte Zelllinien p794 und p723 verwendet, hier wurde ebenfalls eine erhöhte Aktivität des Shh-Signalweges nachgewiesen. Dies könnte auf die Kultivierung mit Stammzellmedium zurückzuführen sein, denkbar wäre eine „Reaktivierung“ des Shh-Signalweges unter Stammzellmilieu. Dieser Umstand könnte in zukünftigen Untersuchungen näher beleuchtet werden.

Insgesamt lässt sich also von einer deutlichen Aktivierung des Shh-Signalweges in den MB und im Speziellen in den Prominin1-positiven Zellen ausgehen. Vor dem Hintergrund, dass Letztere Tumorstammzellcharakter aufweisen, kann daher ein Rückschluss auf eine erhöhte Shh-Signalwegaktivität in MB-Tumorstammzellen gezogen werden.

Diese erhöhte Aktivität des Shh-Signalweges in Tumorstammzellen eröffnet eine neue Möglichkeit der Therapie, wo durch eine Blockade des Signalweges die Tumorstammzellen als „Verursacher“ der Erkrankung direkt angegriffen werden können. Somit könnte das Tumorstammzellwachstum begrenzt werden und ebenso ein Rezidiv des Tumors nach Operation, Strahlen- oder Chemotherapie verhindert werden.

Bisher sind noch keine Hedgehog-Signalweg-Inhibitoren für die Behandlung von Medulloblastom vorhanden, für die Behandlung von Basalzellkarzinom [110] und akuter myeloider Leukämie [111] sind jedoch mindestens 3 Hedgehog-Signalweg-Inhibitoren von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen. Die systemische Therapie mit oralen Hedgehog-Inhibitoren bietet sich bei eingeschränkter Operabilität und im metastasierten Stadium an. Trotz deutlicher Wirksamkeit werden diese Medikamente jedoch nicht durchgehend von Patienten angenommen, was unter anderem auf die Einschränkung der Lebensqualität durch unerwünschte Nebenwirkungen (u.a.

Muskelspasmen, Abgeschlagenheit, Geschmacksverlust, Alopezie) zurückzuführen sein kann [112]. Nichtsdestotrotz ist eine Weiterentwicklung dieser Medikamentengruppe von großem Interesse, da durch den kausalen Wirkansatz und einfache orale Einnahmen nicht nur maligne Läsionen und Präkanzerosen an verschiedene Lokalisationen behandelt werden können, sondern im Verlauf auch zur langfristigen Karzinomprophylaxe beitragen kann.

7. Zusammenfassung

Die Identifizierung von Tumorstammzellen ermöglicht eine zielgerichtete und effektive Therapie bei bösartigen Tumorerkrankungen. Speziell bei Hirntumoren im Kindesalter sind gewebeschonende Therapiemethoden von essentieller Bedeutung. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Eigenschaften der Tumorstammzellen in Medulloblastom am Mausmodell genauer untersucht werden.

Aus nativem Tumorgewebe aus *Ptch^{neo67/+}*-Mäusen gelang uns die Kultivierung von 2 Medulloblastomzelllinien: 26B und 76C. Um aus diesen Medulloblastomzelllinien die relevanten Tumorstammzellen zu gewinnen, orientierten wir uns an dem Tumorstammzellenmarker Prominin1. Mittels der MACS-Zellisolierung gelang uns die Selektion von Prominin1-positiven Zellen aus diesen zwei Zelllinien und aus der bereits etablierten Zelllinie p794.

Die herausselektierten Prominin1-positive Zellen aus 26B, 76C und p794 wurden jeweils in Stammzellmedium kultiviert und bildeten im Verlauf Neurosphären aus. Diese Neurosphären wiesen Selbsterneuerungskapazitäten auf.

Im Vergleich zu gesunden Cerebelli, konnte eine erhöhte Expression der Gene *Ptch* und *Gli1* des Shh-Signalweges in MBs nachgewiesen werden, somit liegt eine erhöhte Aktivität des Shh-Signalwegs in MBs vor. Ebenfalls konnte eine erhöhte Expression von Tumorstammzellmarker in MBs nachgewiesen werden.

Im Anschluss wurde die Genexpression zwischen Prominin1-positiven und -negativen Zellen von MBs verglichen. Hier konnte gezeigt werden, dass in den Prominin1-positiven MB-Zellen eine erhöhte Expression von weiteren Tumorstammzellmarker, wie CD15 und *Atoh1*, vorliegt. In Prominin1-positiven Zellen zeigte sich auch eine erhöhte Expression von Genen des Shh-Signalweges, dies spricht für eine erhöhte Shh-Signalwegaktivität in Prominin1-positiven MB-Zellen.

Die Tatsache, dass in Tumorstammzellen von MBs eine erhöhte Shh-Signalwegaktivität vorliegt, könnte in Zukunft eine neue Grundlage für die Entwicklung einer zielgerichteteren und effektiveren Therapie darstellen.

8. Literaturverzeichnis

1. Kaatsch, P., *Epidemiology of childhood cancer*. Cancer Treat Rev, 2010. **36**(4): p. 277-85.
2. De Luca, A., et al., *Sonic hedgehog patterning during cerebellar development*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(2): p. 291-303.
3. Taipale, J. and P.A. Beachy, *The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 349-54.
4. Hahn, H., et al., *Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome*. Cell, 1996. **85**(6): p. 841-51.
5. Roberts, R.O., et al., *Medulloblastoma: a population-based study of 532 cases*. J Neuropathol Exp Neurol, 1991. **50**(2): p. 134-44.
6. Chang, C.H., E.M. Housepian, and C. Herbert, Jr., *An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas*. Radiology, 1969. **93**(6): p. 1351-9.
7. Xia, H., et al., *Medulloblastomas in cerebellopontine angle: Epidemiology, clinical manifestations, imaging features, molecular analysis and surgical outcome*. J Clin Neurosci, 2019. **67**: p. 93-98.
8. Evans, A.E., et al., *The treatment of medulloblastoma. Results of a prospective randomized trial of radiation therapy with and without CCNU, vincristine, and prednisone*. J Neurosurg, 1990. **72**(4): p. 572-82.
9. Helseth, E., et al., *Posterior fossa medulloblastoma in children and young adults (0-19 years): survival and performance*. Childs Nerv Syst, 1999. **15**(9): p. 451-5; discussion 456.
10. Walter, A.W., et al., *Survival and neurodevelopmental outcome of young children with medulloblastoma at St Jude Children's Research Hospital*. J Clin Oncol, 1999. **17**(12): p. 3720-8.
11. Zeltzer, P.M., et al., *Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study*. J Clin Oncol, 1999. **17**(3): p. 832-45.
12. Kieffer-Renaux, V., et al., *Patterns of neuropsychological deficits in children with medulloblastoma according to craniospatial irradiation doses*. Dev Med Child Neurol, 2000. **42**(11): p. 741-5.

13. Schmiegelow, M., et al., *Cranial radiotherapy of childhood brain tumours: growth hormone deficiency and its relation to the biological effective dose of irradiation in a large population based study*. Clin Endocrinol (Oxf), 2000. **53**(2): p. 191-7.
14. Torres, C.F., et al., *Surveillance scanning of children with medulloblastoma*. N Engl J Med, 1994. **330**(13): p. 892-5.
15. Miyata, H., E. Ikawa, and E. Ohama, *Medulloblastoma in an adult suggestive of external granule cells as its origin: a histological and immunohistochemical study*. Brain Tumor Pathol, 1998. **15**(1): p. 31-5.
16. Ueba, T., et al., *MATH-1 production by an adult medulloblastoma suggestive of a cerebellar external granule cell precursor origin*. J Clin Neurosci, 2008. **15**(1): p. 84-7.
17. Di Marcotullio, L., et al., *Suppressors of hedgehog signaling: Linking aberrant development of neural progenitors and tumorigenesis*. Mol Neurobiol, 2006. **34**(3): p. 193-204.
18. Steinbichler, T.B., et al., *Therapy resistance mediated by cancer stem cells*. Semin Cancer Biol, 2018. **53**: p. 156-167.
19. Pierce, G.B. and C. Wallace, *Differentiation of malignant to benign cells*. Cancer Res, 1971. **31**(2): p. 127-34.
20. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
21. Li, C., et al., *Identification of pancreatic cancer stem cells*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1030-7.
22. Maitland, N.J., et al., *Prostate cancer stem cells: a target for new therapies*. Ernst Schering Found Symp Proc, 2006(5): p. 155-79.
23. O'Brien, C.A., et al., *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 106-10.
24. Pardal, R., M.F. Clarke, and S.J. Morrison, *Applying the principles of stem-cell biology to cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(12): p. 895-902.
25. Maenhaut, C., et al., *Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? An analysis*. Carcinogenesis, 2010. **31**(2): p. 149-58.
26. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5821-8.

27. Hemmati, H.D., et al., *Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15178-83.
28. Cheng, J.X., B.L. Liu, and X. Zhang, *How powerful is CD133 as a cancer stem cell marker in brain tumors?* Cancer Treat Rev, 2009. **35**(5): p. 403-8.
29. Singh, S.K., et al., *Cancer stem cells in nervous system tumors*. Oncogene, 2004. **23**(43): p. 7267-73.
30. Uchida, N., et al., *Direct isolation of human central nervous system stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14720-5.
31. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
32. Hussein, D., et al., *Pediatric brain tumor cancer stem cells: cell cycle dynamics, DNA repair, and etoposide extrusion*. Neuro Oncol, 2011. **13**(1): p. 70-83.
33. Yin, A.H., et al., *AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 1997. **90**(12): p. 5002-12.
34. Ribatti, D., *The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis*. J Cell Mol Med, 2004. **8**(3): p. 294-300.
35. Lee, A., et al., *Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum*. Nat Neurosci, 2005. **8**(6): p. 723-9.
36. Olempska, M., et al., *Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2007. **6**(1): p. 92-7.
37. Collins, A.T., et al., *Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10946-51.
38. Hall, P.A. and A.J. D'Ardenne, *Value of CD15 immunostaining in diagnosing Hodgkin's disease: a review of published literature*. J Clin Pathol, 1987. **40**(11): p. 1298-304.
39. Fox, N., et al., *Immunohistochemical localization of the mouse stage-specific embryonic antigen 1 in human tissues and tumors*. Cancer Res, 1983. **43**(2): p. 669-78.
40. Ashwell, K.W. and J.K. Mai, *A transient CD15 immunoreactive sling in the developing mouse cerebellum*. Int J Dev Neurosci, 1997. **15**(7): p. 883-9.
41. Capela, A. and S. Temple, *LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal*. Neuron, 2002. **35**(5): p. 865-75.
42. Read, T.A., et al., *Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma*. Cancer Cell, 2009. **15**(2): p. 135-47.

43. Ward, R.J., et al., *Multipotent CD15+ cancer stem cells in patched-1-deficient mouse medulloblastoma*. *Cancer Res*, 2009. **69**(11): p. 4682-90.
44. Lendahl, U., L.B. Zimmerman, and R.D. McKay, *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. *Cell*, 1990. **60**(4): p. 585-95.
45. Mignone, J.L., et al., *Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice*. *J Comp Neurol*, 2004. **469**(3): p. 311-24.
46. Zulewski, H., et al., *Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes*. *Diabetes*, 2001. **50**(3): p. 521-33.
47. Day, K., et al., *Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells*. *Dev Biol*, 2007. **304**(1): p. 246-59.
48. Méndez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. *Nature*, 2010. **466**(7308): p. 829-34.
49. Suzuki, S., et al., *The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature*. *J Histochem Cytochem*, 2010. **58**(8): p. 721-30.
50. Krupkova, O., Jr., et al., *Nestin expression in human tumors and tumor cell lines*. *Neoplasia*, 2010. **57**(4): p. 291-8.
51. Almqvist, P.M., et al., *Immunohistochemical detection of nestin in pediatric brain tumors*. *J Histochem Cytochem*, 2002. **50**(2): p. 147-58.
52. Shih, A.H. and E.C. Holland, *Notch signaling enhances nestin expression in gliomas*. *Neoplasia*, 2006. **8**(12): p. 1072-82.
53. Zanini, C., et al., *Medullospheres from DAOY, UW228 and ONS-76 cells: increased stem cell population and proteomic modifications*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63748.
54. Calabrese, C., et al., *A perivascular niche for brain tumor stem cells*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(1): p. 69-82.
55. Ben-Arie, N., et al., *Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons*. *Nature*, 1997. **390**(6656): p. 169-72.
56. Ayrault, O., et al., *Atoh1 inhibits neuronal differentiation and collaborates with Gli1 to generate medulloblastoma-initiating cells*. *Cancer Res*, 2010. **70**(13): p. 5618-27.

57. Flora, A., et al., *Deletion of Atoh1 disrupts Sonic Hedgehog signaling in the developing cerebellum and prevents medulloblastoma*. Science, 2009. **326**(5958): p. 1424-7.
58. Forget, A., et al., *Shh signaling protects Atoh1 from degradation mediated by the E3 ubiquitin ligase Huwe1 in neural precursors*. Dev Cell, 2014. **29**(6): p. 649-61.
59. Lee, Y., et al., *A molecular fingerprint for medulloblastoma*. Cancer Res, 2003. **63**(17): p. 5428-37.
60. Varjosalo, M. and J. Taipale, *Hedgehog: functions and mechanisms*. Genes Dev, 2008. **22**(18): p. 2454-72.
61. Oliver, T.G., et al., *Loss of patched and disruption of granule cell development in a pre-neoplastic stage of medulloblastoma*. Development, 2005. **132**(10): p. 2425-39.
62. Stecca, B. and A. Ruiz i Altaba, *Brain as a paradigm of organ growth: Hedgehog-Gli signaling in neural stem cells and brain tumors*. J Neurobiol, 2005. **64**(4): p. 476-90.
63. Taylor, M.D., et al., *Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma*. Nat Genet, 2002. **31**(3): p. 306-10.
64. Toftgard, R., *Hedgehog signalling in cancer*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(12): p. 1720-31.
65. Kieran, M.W., *Targeted treatment for sonic hedgehog-dependent medulloblastoma*. Neuro Oncol, 2014. **16**(8): p. 1037-47.
66. Le, H., et al., *Hedgehog signaling is essential for normal wound healing*. Wound Repair Regen, 2008. **16**(6): p. 768-73.
67. Macdonald, T.J., *Hedgehog Pathway in Pediatric Cancers: They're Not Just for Brain Tumors Anymore*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2012: p. 605-9.
68. Xie, J., et al., *Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors*. Cancer Res, 1997. **57**(12): p. 2369-72.
69. Hahn, H., et al., *Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome*. Nat Med, 1998. **4**(5): p. 619-22.
70. Knoepfler, P.S., P.F. Cheng, and R.N. Eisenman, *N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation*. Genes Dev, 2002. **16**(20): p. 2699-712.

71. Sawai, S., et al., *Defects of embryonic organogenesis resulting from targeted disruption of the N-myc gene in the mouse*. *Development*, 1993. **117**(4): p. 1445-55.
72. Stanton, B.R., et al., *Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop*. *Genes Dev*, 1992. **6**(12a): p. 2235-47.
73. Charron, J., et al., *Embryonic lethality in mice homozygous for a targeted disruption of the N-myc gene*. *Genes Dev*, 1992. **6**(12a): p. 2248-57.
74. Kessler, J.D., et al., *N-myc alters the fate of preneoplastic cells in a mouse model of medulloblastoma*. *Genes Dev*, 2009. **23**(2): p. 157-70.
75. Kenney, A.M., M.D. Cole, and D.H. Rowitch, *Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors*. *Development*, 2003. **130**(1): p. 15-28.
76. Oliver, T.G., et al., *Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(12): p. 7331-6.
77. Kenney, A.M. and D.H. Rowitch, *Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(23): p. 9055-67.
78. Pogoriler, J., et al., *Loss of cyclin D1 impairs cerebellar development and suppresses medulloblastoma formation*. *Development*, 2006. **133**(19): p. 3929-37.
79. Calzada-Wack, J., et al., *Unbalanced overexpression of the mutant allele in murine Patched mutants*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(5): p. 727-33.
80. Wechsler-Reya, R.J. and M.P. Scott, *Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog*. *Neuron*, 1999. **22**(1): p. 103-14.
81. Yoon, J.W., et al., *Defining a role for Sonic hedgehog pathway activation in desmoplastic medulloblastoma by identifying GLI1 target genes*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(1): p. 109-19.
82. Gilbertson, R.J. and D.W. Ellison, *The origins of medulloblastoma subtypes*. *Annu Rev Pathol*, 2008. **3**: p. 341-65.
83. Tang, X., et al., *Differential proliferative index of cancer stem-like cells in primary and recurrent medulloblastoma in human*. *Childs Nerv Syst*, 2012. **28**(11): p. 1869-77.

84. Raso, A., et al., *High levels of PROM1 (CD133) transcript are a potential predictor of poor prognosis in medulloblastoma*. *Neuro Oncol*, 2011. **13**(5): p. 500-8.
85. Neradil, J. and R. Veselska, *Nestin as a marker of cancer stem cells*. *Cancer Sci*, 2015. **106**(7): p. 803-11.
86. Gu, C., et al., *Gene expression of growth signaling pathways is up-regulated in CD133-positive medulloblastoma cells*. *Oncol Lett*, 2011. **2**(2): p. 357-361.
87. Badodi, S., S. Marino, and L. Guglielmi, *Establishment and Culture of Patient-Derived Primary Medulloblastoma Cell Lines*. *Methods Mol Biol*, 2019. **1869**: p. 23-36.
88. Brewer, G.J. and J.R. Torricelli, *Isolation and culture of adult neurons and neurospheres*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(6): p. 1490-8.
89. Huang, X., et al., *Isolation, enrichment, and maintenance of medulloblastoma stem cells*. *J Vis Exp*, 2010(43).
90. Caldwell, M.A., et al., *Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres*. *Nat Biotechnol*, 2001. **19**(5): p. 475-9.
91. Robson, J.P., et al., *Identification of CD24 as a marker of Patched1 deleted medulloblastoma-initiating neural progenitor cells*. *PLoS One*, 2019. **14**(1): p. e0210665.
92. Sasai, K., et al., *Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies*. *Cancer Res*, 2006. **66**(8): p. 4215-22.
93. Romer, J.T., et al., *Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(3): p. 229-40.
94. Dahmane, N. and A. Ruiz i Altaba, *Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum*. *Development*, 1999. **126**(14): p. 3089-100.
95. Dahmane, N., et al., *The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis*. *Development*, 2001. **128**(24): p. 5201-12.
96. Berman, D.M., et al., *Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade*. *Science*, 2002. **297**(5586): p. 1559-61.
97. Sanchez, P. and A. Ruiz i Altaba, *In vivo inhibition of endogenous brain tumors through systemic interference of Hedgehog signaling in mice*. *Mech Dev*, 2005. **122**(2): p. 223-30.

98. Zurawel, R.H., et al., *Evidence that haploinsufficiency of Ptch leads to medulloblastoma in mice*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **28**(1): p. 77-81.
99. Wetmore, C., D.E. Eberhart, and T. Curran, *The normal patched allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line mutation of patched*. Cancer Res, 2000. **60**(8): p. 2239-46.
100. Gailani, M.R., et al., *The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas*. Nat Genet, 1996. **14**(1): p. 78-81.
101. Unden, A.B., et al., *Human patched (PTCH) mRNA is overexpressed consistently in tumor cells of both familial and sporadic basal cell carcinoma*. Cancer Res, 1997. **57**(12): p. 2336-40.
102. Lai, K., et al., *Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo*. Nat Neurosci, 2003. **6**(1): p. 21-7.
103. Wetmore, C., *Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animal models*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(1): p. 34-42.
104. Swartling, F.J., et al., *Pleiotropic role for MYCN in medulloblastoma*. Genes Dev, 2010. **24**(10): p. 1059-72.
105. Zindy, F., et al., *Genetic alterations in mouse medulloblastomas and generation of tumors de novo from primary cerebellar granule neuron precursors*. Cancer Res, 2007. **67**(6): p. 2676-84.
106. Palma, V., et al., *Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain*. Development, 2005. **132**(2): p. 335-44.
107. Po, A., et al., *Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog*. Embo j, 2010. **29**(15): p. 2646-58.
108. Zbinden, M., et al., *NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53*. EMBO J, 2010. **29**(15): p. 2659-74.
109. Corno, D., et al., *Gene signatures associated with mouse postnatal hindbrain neural stem cells and medulloblastoma cancer stem cells identify novel molecular mediators and predict human medulloblastoma molecular classification*. Cancer Discov, 2012. **2**(6): p. 554-68.
110. Rimkus, T.K., et al., *Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors*. Cancers (Basel), 2016. **8**(2).

111. List, A., et al., *Opportunities for Trisenox (arsenic trioxide) in the treatment of myelodysplastic syndromes*. *Leukemia*, 2003. **17**(8): p. 1499-507.
112. Carpenter, R.L. and H. Ray, *Safety and Tolerability of Sonic Hedgehog Pathway Inhibitors in Cancer*. *Drug Saf*, 2019. **42**(2): p. 263-279.

9. Abkürzungsverzeichnis

ATOH1	<i>Atonal BHLH Transcription Factor 1</i>
BSA	Bovine Serum Albumine
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
CB	Cerebellum
cDNA	complementary DNA
CCND1	<i>CyclinD1</i>
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetracyanat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGL	äußere Körnerzellschicht/external germinal layer
et al.	und andere
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FGFb	Fibroblast Growth Factor-basic
fw	forward
g	Fallbeschleunigung, 9,81m/s ²
GLI1	<i>Glioma-associated oncogene homolog 1</i>
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
IGL	innere Körnerzellschicht/ internal granular layer
M	Molar
MACS	Magnetic activated cell sorting
MB	Medulloblastom
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MYCN	<i>Mycn protooncogene, BHLH Transcription Factor</i>
NaCl	Natriumchlorid
NTPs (ATP, CTP, GTP, UTP)	Nukleotid-TriPhosphat (Adenin-, Cytosin-, Guanin-, Uracil-)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PenStrep	Penicillin + Streptomycin
Prom	Prominin1
PTCH1	<i>Patched1</i>
Q-PCR/RT-PCR	quantitative real-time PCR
rev	reverse

RNA	Ribonukleinsäure
RNase H	Ribonuklease H
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SHH-PTCH-Signalweg	Sonic-Hedgehog-Patched-Signalweg
SMO	<i>Smoothened</i>
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBP	<i>TATA-box-binding protein</i> (Haushaltsgen)
U	Einheit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich dabei unterstützt haben, meine Doktorarbeit erfolgreich durchzuführen.

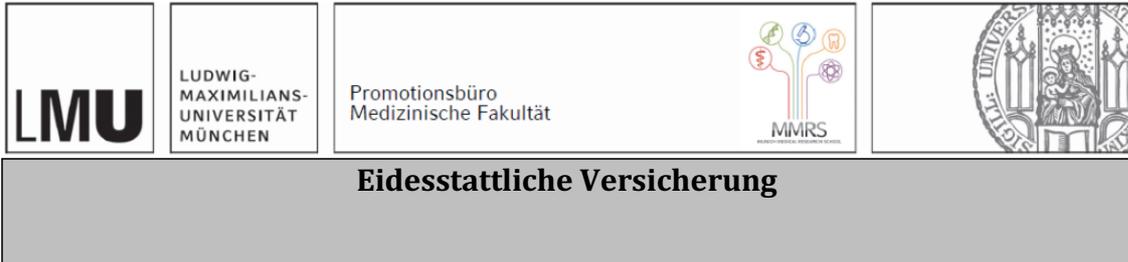
Zunächst möchte ich mich bedanken bei Herrn Prof. Dr. Dietrich von Schweinitz, ehemaliger Direktor der Kinderchirurgischen Klinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in den kinderchirurgischen Forschungslaboratorien durchführen zu dürfen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Roland Kappler bedanken, vor allem für die ausgezeichnete, kompetente Betreuung, für die unermüdliche Unterstützung über die ganze Zeit und für die anregenden und lehrreichen Diskussionen.

Desweiteren möchte ich mich für die wertvolle Unterstützung von Beate Hagl, Saskia Joppien und Johanna Helmbrecht bedanken, an die ich mich während der experimentellen Phase meiner Arbeit stets wenden konnte. Das Arbeitsklima im Labor hätte nicht besser sein können.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen dafür, dass sie immer für mich da war und mich in jeglicher Situation unterstützt hat.

11. Affidavit



Wang, Xiaodi

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Charakterisierung von Stammzellen kindlicher Kleinhirntumoren

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 22.04.2024
Ort, Datum

Xiaodi Wang
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand