

Molekulargenetische und funktionelle Analyse der Rolle des p75 Neurotrophinrezeptors im Medulloblastom

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

Jan Nils Küchler
aus Bielefeld

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Pietsch
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Herrlinger

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.10.2010

Aus dem Institut für Neuropathologie der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. T. Pietsch

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Abkürzungsverzeichnis | 9 |
| 2 | Einleitung..... | 12 |
| 2.1 | Das Medulloblastom..... | 12 |
| 2.1.1 | Definition..... | 12 |
| 2.1.2 | Epidemiologie | 12 |
| 2.1.3 | Lokalisation..... | 12 |
| 2.1.4 | Klinische Merkmale..... | 12 |
| 2.1.5 | Makroskopischer Befund | 13 |
| 2.1.6 | Histopathologischer Befund und Differenzierung..... | 13 |
| 2.1.7 | Prädisponierende Genetik des Medulloblastoms..... | 15 |
| 2.1.8 | Cytogenetik des Medulloblastoms | 16 |
| 2.1.9 | Molekulargenetik des Medulloblastoms | 17 |
| 2.1.10 | Epigenetische Veränderungen | 18 |
| 2.1.11 | Histogenese..... | 18 |
| 2.1.12 | Die Rolle des Sonic Hedgehog Signalwegs in der Tumorigenese..... | 20 |
| 2.1.13 | Prognostische Aspekte | 20 |
| 2.2 | Das Neurotrophin-System | 21 |
| 2.2.1 | Neurotrophine – Struktur und Funktion..... | 21 |
| 2.2.2 | Rezeptoren der Trk-Familie | 22 |
| 2.2.3 | <i>low affinity</i> p75 ^{NTR} -Rezeptor | 22 |
| 2.2.4 | Funktionelle Aspekte | 25 |
| 2.3 | Ziele dieser Arbeit | 28 |
| 3 | Material und Methoden..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1 Tumorkollektiv | 29 |
| 3.2 Untersuchte Zelllinien | 31 |
| 3.3 Murines Gewebe | 31 |
| 3.4 Referenzgewebe | 32 |
| 3.5 Isolierung genomischer DNA aus Leukozyten | 32 |
| 3.6 Isolierung von DNA aus Tumormaterial | 33 |
| 3.7 Polymerase Ketten Reaktion | 33 |
| 3.8 Agarose-Gelelektrophorese | 35 |
| 3.9 Mikrosatellitenanalyse | 37 |
| 3.9.1 LOH-Analyse auf denaturierenden Polyacrylamidgelen..... | 37 |
| 3.9.2 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen..... | 39 |
| 3.10 SSCP-Analyse | 40 |
| 3.10.1 Isolierung von DNA aus aberranten Banden..... | 43 |
| 3.10.2 Aufreinigung der PCR-Produkte..... | 44 |
| 3.10.3 DNA-Sequenzierung..... | 44 |
| 3.11 Epigenetische Analyse der $p75^{NTR}$-Promotorregion | 46 |
| 3.11.1 Natrium-Bisulfit-Behandlung von DNA..... | 47 |
| 3.11.2 Bisulfit-PCR..... | 47 |
| 3.11.3 Re-Isolierung der Fragmente..... | 48 |
| 3.11.4 TOPO-Klonierung der PCR-Fragmente..... | 48 |
| 3.11.5 Bisulfit-Sequenzierung..... | 49 |
| 3.12 Isolierung von RNA | 50 |
| 3.13 Synthese von cDNA - reverse Transkription | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 3.14 Kompetitive RT-PCR zur Quantifizierung von Gentranskripten | 51 |
| 3.14.1 Synthese exogener Kompetitor-RNA-Moleküle | 52 |
| 3.14.2 Semiquantitative RT-PCR..... | 55 |
| 3.14.3 Auswertung der Gene-Scan Rohdaten | 56 |
| 3.15 Duplex-PCR | 57 |
| 3.15.1 Photometrische Auswertung der Duplex-PCR..... | 59 |
| 3.16 Immunhistochemie | 59 |
| 3.17 Kultivierung und Passagierung der Zelllinie D283MED | 61 |
| 3.18 Präparation und Kultivierung muriner Körnerzellvorläufer | 61 |
| 3.18.1 Inkubation muriner Körnerzellvorläufer mit Sonic Hedgehog..... | 62 |
| 3.19 Erstellung eines induzierbaren Zellsystem | 63 |
| 3.19.1 Synthese eines pIND-Leervektors | 64 |
| 3.19.2 Synthese eines pIND- p75 ^{NTR} -FL Vektors..... | 67 |
| 3.19.3 Transfektion der D283MED-Zelllinie | 70 |
| 3.19.4 Aktivierung und Bestätigung des stabilen Zellsystems | 70 |
| 3.20 NGF-Behandlung von transfizierten Zellen | 71 |
| 3.21 Durchflusszytometrie | 72 |
| 3.21.1 Färbung von Zellen..... | 72 |
| 3.21.2 Zytometrische Analyse | 74 |
| 3.22 Morphologischer Nachweis von Apoptose durch DAPI-Färbung | 74 |
| 4 Ergebnisse | 75 |
| 4.1 Mikrosatellitenanalyse des 17q21.33 Genlokus | 75 |
| 4.2 Mutationsanalyse des p75^{NTR}-Gens | 76 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.3 | <i>p75^{NTR}</i>-Expression in Medulloblastomen | 77 |
| 4.4 | Epigenetische Untersuchung des <i>p75^{NTR}</i>-Gens..... | 79 |
| 4.5 | <i>p75^{NTR}</i>-Induktion in murinen Körnerzellprogenitoren | 80 |
| 4.6 | Immunhistochemische <i>p75^{NTR}</i>-Färbung | 80 |
| 4.7 | Induktion der <i>p75^{NTR}</i>-Varianten im Modellsystem | 81 |
| 4.8 | Ergebnisse der Durchflusszytometrie | 82 |
| 4.9 | Morphologischer Nachweis von Apoptose | 84 |
| 5 | Diskussion | 85 |
| 6 | Zusammenfassung | 96 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 98 |
| 8 | Danksagung | 112 |
| 9 | Lebenslauf | 113 |

1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| A | Adenin |
| Akt | Gen der Proteinkinase B |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BDNF | <i>engl.</i> Brain derived nerve growth factor |
| bp | Basenpaar |
| C | Cytosin |
| cDNA | <i>engl.</i> copy DNA |
| CMB | klassisches Medulloblastom (<i>engl.</i> classic medulloblastoma) |
| CpG | Cytosin-phosphatidyl-Guanosin |
| CRD | Cystein-reiche Domäne |
| cRT-PCR | kompetitive RT-PCR |
| CTP | Cytidintriphosphat |
| °C | Grad Celsius |
| c-myc | zelluläres myc (<i>engl.</i> cellular myc) |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DD | Todesdomäne (<i>engl.</i> Death Domain) |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMB | desmoplastisches Medulloblastom |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| f | femto, 10^{-15} |
| FACS | <i>engl.</i> fluorescence activating cell scanner |
| G | Guanin |
| g | Gramm |
| <i>g</i> | Gravitationskonstante |
| GCP | Körnerzellvorläufer (<i>engl.</i> granule cell precursor) |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde |
| HE | Hämalaun-Eosin |
| Hh | Hedgehog |

| | |
|--------------------|--|
| JM | juxtamembranäre Domäne |
| JNK | <i>engl.</i> jun-N-terminal-kinase |
| kb | kilobase |
| LB | <i>engl.</i> lysogeny broth |
| LOH | Allelverlust (<i>engl.</i> loss of heterozygosity) |
| MAPK | MAP-Kinase (<i>engl.</i> mitogen-activated protein kinase) |
| m | milli, 10^{-3} |
| M | molar |
| MB | Medulloblastom |
| min | Minute |
| MOH | Biallelität (<i>engl.</i> maintenance of heterozygosity) |
| mRNA | <i>engl.</i> messenger-RNA |
| μ | micro, 10^{-6} |
| NADE | <i>engl.</i> NT-associated cell death executor |
| NF | <i>engl.</i> nuclear factor |
| NGF | <i>engl.</i> nerve growth factor |
| n | nano, 10^{-9} |
| NRAGE | <i>engl.</i> NT- receptor interacting MAGE homologue |
| NRIF | <i>engl.</i> NT-receptor interacting factor |
| NT-3 / NT-4 | Neurotrophin 3 und 4 |
| NTP | Nukleosidtriphosphat |
| n-myc | nukleäres myc (<i>engl.</i> nuclear myc) |
| p75 ^{NTR} | p75 Neurotrophinrezeptor |
| p | pico, 10^{-12} |
| PARP | Poly (-ADP-Ribose)-Polymerase |
| PBS | <i>engl.</i> Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>engl.</i> polymerase chain reaction) |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pH | negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration |
| pHH3 | phospho-Histon H3 |
| PI3K | Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase |
| PLC | Phosphoinositid-Phospholipase C |
| PNET | primitiv neuroektodermaler Tumor |
| Ptch / ptc | Patched |

| | |
|-------|--|
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>engl.</i> rounds per minute) |
| RT | Raumtemperatur, reverse Transkription |
| s | Sekunde |
| SDS | Natrium-Dodecylsulfat |
| Shh | Sonic Hedgehog |
| SMOH | <i>engl.</i> smoothed |
| SSCP | <i>engl.</i> single strand conformational polymorphism |
| T | Thymin |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TNFR | Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor |
| TRAF | TNFR-assoziiertes Faktor |
| Trk | <i>engl.</i> Tropomyosin-related-kinase |
| TTP | Thymintriphosphat |
| U | Enzymeinheit |
| UTP | Uridintriphosphat |
| V | Volt |
| Vol | Volumen |
| W | Watt |
| WHO | World Health Organisation |

2 Einleitung

2.1 Das Medulloblastom

2.1.1 Definition

Das Medulloblastom ist ein hochmaligner, undifferenzierter, neuroepithelialer Tumor des Kleinhirns. Neben seinem invasiven Wachstum stellt auch die frühe Metastasierung in den Liquorraum ein relevantes Malignitätskriterium dar. Gemäß den WHO-Kriterien zur histologischen Einteilung cerebraler Neoplasien wird dem Medulloblastom der WHO-Grad IV zugeordnet.

2.1.2 Epidemiologie

Mit einer signifikanten Wendigkeit zum männlichen Geschlecht (männlich: 65 %) manifestiert sich das Medulloblastom vorzugsweise bei Kindern mit einem Erkrankungsgipfel um das 7. Lebensjahr. Bei einer Inzidenz von 0,5:100000 bei den unter 15-jährigen (Stevens et al., 1991) repräsentiert das Medulloblastom häufigsten malignen Hirntumor des Kindesalters. 70 % der Patienten sind jünger als 16 Jahre (Arseni und Ciurea, 1981; Roberts et al., 1991). Bei Erkrankungen während der Adoleszenz sind 80 % der Betroffenen zwischen 21 und 40 Jahre alt (Giordana et al., 1999; Hubbard et al., 1989). Nur sehr selten tritt das Medulloblastom jenseits des 5. Lebensjahrzehnts auf. Bei Diagnosestellung weist ein Drittel der Patienten bereits eine liquorgene Metastasierung auf.

2.1.3 Lokalisation

Während das kindliche Medulloblastom zumeist mittelliniennah im Kleinhirnwurm entsteht, nimmt mit zunehmendem Alter eine periphere Lokalisation in den Kleinhirnhemisphären zu.

2.1.4 Klinische Merkmale

In der allgemeinen klinischen Präsentation des Medulloblastoms ist die klassische Symptomtrias aus Cephalgien, Emesis und Stauungspapille als Zeichen einer intrakraniellen Drucksteigerung kennzeichnend. Ausdruck des lokalen Wachstums von seitenbetonten Medulloblastomen ist zumeist eine spinocerebelläre Symptomatik, die sich in dysmetrischen Bewegungen, einer Dysdiadochokinese,

dem Auftreten eines Intentionstremors und einer cerebellären, skandierenden Sprache präsentieren kann. Bei in der Mittellinie gelegenen Medulloblastomen führen die Folgen einer okklusiven Liquorzirkulationsstörung zu einer frühzeitig eintretenden Hirndrucksymptomatik. Daneben führen Läsionen des Vestibulocerebellums zu okulomotorischen Störungen und einer trunkalen Ataxie, Läsionen des medianen Spinocerebellums zu Gang- und Standataxien. Auch Paresen des IV. oder VI. Hirnnerven sind möglich. In bildgebenden Verfahren lässt sich das Medulloblastom als solide, Kontrastmittel-anreichernde Masse darstellen (Abbildung 1).

2.1.5 Makroskopischer Befund

In ihrer Struktur sehr variabel, erscheinen die Tumoren teils derb und abgesondert, während andere, in ihrer Konsistenz weiche Tumoren, eindeutig definierte Grenzen vermissen lassen. Eine massive Hämorrhagie zeigt sich gelegentlich. Eine liquorigene Metastasierung kann sich als zuckergussartige Trübung der Leptomeningen oder der Ventrikeloberfläche präsentieren.

2.1.6 Histopathologischer Befund und Differenzierung

Das Medulloblastom präsentiert sich mikroskopisch als klein-, rund- und blauzelliger Tumor, bestehend aus undifferenzierten neuralen Zellen, die eine hohe Proliferationsaktivität aufweisen. Häufig zeigen über 20 % der Medulloblastomzellen eine Ki-67 Expression (Schiffer et al., 1994), bei einer insgesamt hohen regionalen Variabilität von 15-56 % (Onda et al., 1996). Apoptotische Zellkerne sind in etwa 1 % der Tumorzellen präsent und finden sich häufiger in Arealen mit erhöhter mitotischer Aktivität (Schiffer et al., 1995). Teilweise lässt sich eine beginnende neuronale (30 %) oder astrogliale (10 %) Differenzierung nachweisen, selten eine myogene oder melanozytäre. Anhand ihres histologischen Erscheinungsbilds lassen sich konventionell-morphologisch verschiedene Formen des Medulloblastoms unterscheiden. Neben den drei selteneren Varianten, dem großzelligen, dem anaplastischen Medulloblastom sowie dem Medulloblastom mit extensiver Nodularität (cerebelläres Neuroblastom) findet man v.a. zwei histologische Subtypen:

1. Das klassische Medulloblastom (CMB)

Bei der klassischen Variante als häufigste Erscheinungsform handelt es sich um einen zellreichen Tumor aus dicht gepackten, zytoplasmaarmen Tumorzellen mit rund-ovalen, hyperchromatischen Kernen. Zusätzlich finden sich runde Zellen mit weniger kondensiertem Chromatin, die gelegentlich auch die Hauptpopulation bilden können. Neuroblastische Rosetten, so genannte Homer-Wright-Rosetten sind in ca. 40 % der Tumoren vorhanden. Diese zirkulär angeordneten Zellmuster sind häufig mit nukleärer Polymorphie und einer erhöhten mitotischen Aktivität assoziiert. Insgesamt zeigen 75 % der klassischen Medulloblastome Mitosen (Burger et al., 1987). Die zumeist in der Mittellinie lokalisierten Tumoren weisen nur bei oberflächlichem Wachstum im meningealen Bereich eine Faserbildung auf.

2. Das desmoplastische Medulloblastom (DMB)

Als charakteristisches Element zeigen desmoplastische Tumoren retikulinfreie Noduli (pale islands), umgeben von faserreichen, hoch proliferationsaktiven Tumoranteilen (Giangaspero et al., 1991; Katsetos et al., 1989). Dabei weisen die nodulären Bereiche eine reduzierte Zelldichte, eine deutliche nukleäre Uniformität sowie eine beginnende neuronale Differenzierung auf. Außerhalb der Noduli finden sich häufiger atypische Kernkonformitäten.

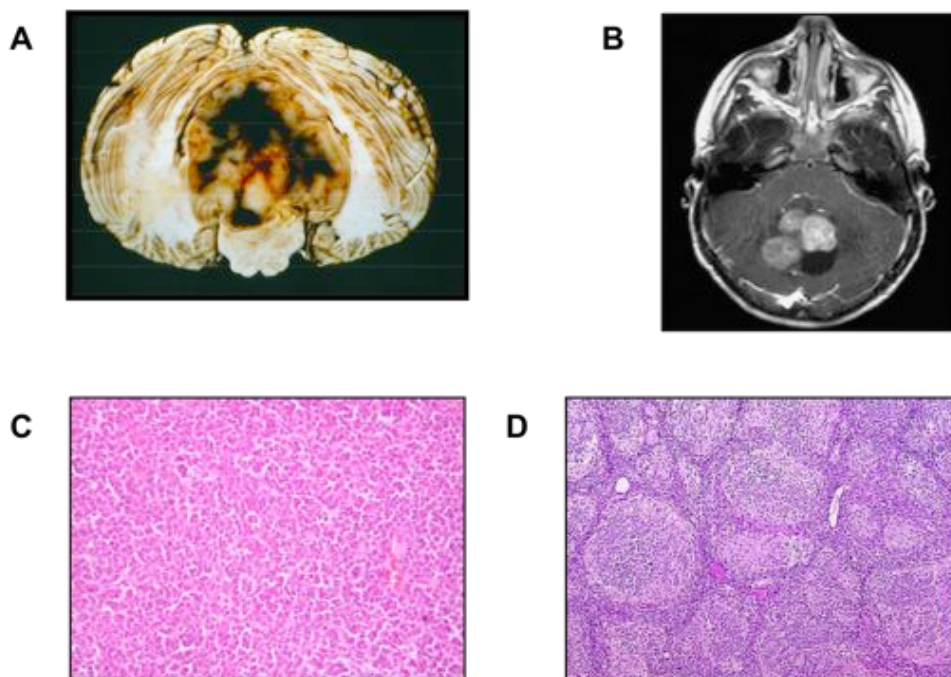


Abbildung 1: Das Medulloblastom: histologische Varianten, Makroskopie und Bildgebung

A: klassisches Medulloblastom in der cerebellären Vermis

B: Magnetresonanztomographische Darstellung eines klassischen Medulloblastoms

C: klassisches Medulloblastom (HE-Färbung, 40 X)

D: desmoplastisches Medulloblastom (HE-Färbung, 20 X)

2.1.7 Prädisponierende Genetik des Medulloblastoms

Eine genetische Suszeptibilität für das Auftreten von Medulloblastomen ist verschiedentlich beschrieben, obgleich der Tumor zumeist sporadisch auftritt. Über das Vorkommen von Medulloblastomen bei mono- und dizygoten Geschwistern wurde mehrfach berichtet (Bickerstaff et al., 1967; Hung et al., 1990; Yamashita et al., 1975). Auch wurden Assoziationen mit anderen Gehirntumoren (Farwell et al., 1984) und dem Wilms-Tumor (Olson et al., 1993; Rainov et al., 1995) beobachtet. Zusätzlich scheinen Verwandte eines an einem Medulloblastom erkrankten Patienten einem erhöhten Risiko für die Entwicklung anderer kindlicher Tumoren zu unterliegen (Farwell und Flannery, 1984; Kuijten et al., 1993). Bei Patienten mit hereditären Keimbahnmutationen in dem Tumorsuppressorgen *Patched* im Rahmen eines Goltz-Gorlin-Syndroms findet sich ebenso eine erhöhte Inzidenz (Lacombe et al., 1990). Gleiches gilt für eine familiäre Häufung im Rahmen der Adenomatösen Polyposis

Coli auf dem Boden von Wnt-Signalweg aktivierenden Mutationen des *APC*-Gens (Turcot et al., 1959).

2.1.8 Cytogenetik des Medulloblastoms

Isochromosom 17q

Als häufigste cytogenetische Veränderung zeigt sich das dizentrische Isochromosom 17q, eine unbalancierte strukturelle Chromosomenaberration in annähernd 50 % aller Medulloblastome (Bigner et al., 1988; Griffin et al., 1988). Der chromosomale Bruchpunkt ist in der Mehrzahl der Fälle auf dem proximalen Abschnitt des kurzen Armes zwischen den Markern D17S689 und D17S95 zu finden (Scheurlen et al., 1997). Ein dadurch entstehender Verlust der 17p-Region ist in wenigen Fällen auch auf einen partiellen oder kompletten Verlust des 17p Arms, eine unbalancierte Translokation oder eine Monosomie 17 zurückzuführen (Biegel et al., 1992). Bei vergleichenden genomischen Hybridisierungsexperimenten (CGH) wurde das häufige Auftreten eines 17p-Verlustes einhergehend mit einem 17q-Gewinn bestätigt (Schutz et al., 1996).

Chromosom 1

Auch auf dem Chromosom 1 finden sich häufig Alterationen, welche allerdings deutlich variabler als die Veränderungen des Chromosoms 17 ausfallen, und zumeist in einer partiellen Trisomie 1q resultieren (Bigner et al., 1988; Griffin et al., 1988).

Andere chromosomale Inbalancen

Zusätzlich finden sich häufige Verluste auf Chromosom 10q (41 %), 11 (41 %), 16q (37 %) und 8p (33 %) sowie Zugewinne auf Chromosom 7 (44 %) (Reardon et al., 1997). Trotz der Identifikation zusätzlicher, isolierter Deletionen auf 6q, 9q, 10q und 16q zeigen die chromosomalen Zugewinne eine höhere Prävalenz. Neben partiellen Deletionen auf Chromosom 6 wird auch eine Monosomie 6 beschrieben (Thompson et al., 2006). Etwa 60 % der untersuchten Zelllinien und Xenotransplantate weisen zusätzliche double-minute Chromosomen auf, die sich in bioptischen Proben nur gelegentlich (<5 %) wiederfanden (Bigner et al., 1990; Bigner et al., 1988).

2.1.9 Molekulargenetik des Medulloblastoms

Amplifikationen

Nahezu sämtliche über zusätzliche double-minute Chromosomen verfügende Medulloblastome zeigen eine Amplifikation des *c-myc*- (Badiali et al., 1991; Batra et al., 1994; Bigner et al., 1990) sowie des *N-myc*-Gens (Tomlinson et al., 1994). Die Amplifikationsfrequenz des *c-myc*-Gens insgesamt scheint bei ca. 20 % zu liegen (Scheurlen et al., 1998).

Chromosom 17

Die Lage putativer Tumorsuppressorgene auf dem kleinen Arm des Chromosom 17 wurde durch die zusätzliche Kartierung partieller 17p Deletionen auf den Lokus 17p13.3 eingegrenzt (Biegel et al., 1992; Koch et al., 1996; McDonald et al., 1994). Im in der Region 17p13.1 gelegenen *TP53*-Tumorsuppressorgen wurden in ca. 7 % der Medulloblastome Mutationen identifiziert (Adesina et al., 1994; Ohgaki et al., 1993). Die niedrige Mutationsfrequenz und die zum eingegrenzten Lokus proximale Position lassen eine führende Rolle des *TP53*-Gens im Rahmen des 17p-Verlustes allerdings unwahrscheinlich erscheinen. Andere Studien zeigen eine Assoziation der 17p-Verluste zu dem Tumorsuppressorgen HIC-1 (Rood et al., 2002).

Chromosom 1 und 10

Die häufigen Veränderungen des Chromosoms 1q (s.o.) lassen sich auf den Lokus 1q31-32 eingrenzen und mit einem in Mammakarzinomen gefundenen Lokus assoziieren (Benitez et al., 1997). Verluste auf dem langen Arm des Chromosoms 10 werden mit den Tumorsuppressorgen *PTEN* (Rasheed et al., 1997) und *DMBT1* (Mollenhauer et al., 1997) in Verbindung gebracht.

Chromosom 9 und der Hedgehog / Patched Signalweg

Auf dem langen Arm des Chromosoms 9 lokalisierte Allelverluste werden in 10 % - 18 % der Fälle beschrieben (Albrecht et al., 1994; Scheurlen et al., 1998; Schofield et al., 1995). Der Lokus der Keimbahnmutation beim Gorlin-Goltz-Syndrom (s.o.) wurde in dieser Region kartiert und das betroffene Gen als humanes Homolog des *patched* (Drosophila Segment-Polaritäts Gen), *PTCH* identifiziert (Hahn et al., 1996). Auch in annähernd 8 % der sporadischen Medulloblastome finden sich *PTCH*-Mutationen (Pietsch et al., 1997; Raffel et al., 1997; Vorechovsky et al., 1997; Wolter et al.,

1997), wobei diese Tumoren offenbar ausschließlich in desmoplastischen Tumoren vorkommen (Pietsch et al., 1997). Als weiteres Tumorsupressorgen des Hedgehog / Patched Signalwegs ist *SUFU* beschrieben, auch hier finden sich deaktivierende Veränderungen (Taylor et al., 2002). *SMOH*, ein weiteres Mitglied des Hedgehog / Patched Signalwegs zeigt in seltenen Fällen aktivierende Mutationen (Reifenberger et al., 1998).

Monosomie 6 und Mutationen in Komponenten des Wnt-Signalwegs

In sporadischen Medulloblastomen wurden Mutationen des *β-Catenin*-Gens in 4,5 % - 8,7 % eines Medulloblastomkollektivs gefunden (Huang et al., 2000; Zurawel et al., 1998). 4,3 % der Medulloblastome offenbarten eine Missense-Mutation im *APC*-Gen, so dass eine Involvierung des WNT-Signalwegs in der Tumorigenese bei 13 % der sporadischen Tumoren angenommen werden kann (Huang et al., 2000). Einen Zusammenhang scheint es mit dem Auftreten chromosomaler Veränderungen auf dem Chromosom 6 zu geben (Thompson et al., 2006).

2.1.10 Epigenetische Veränderungen

Neben Veränderungen der DNA-Sequenz sind auch verschiedene epigenetische Mechanismen an der Genese von Tumoren beteiligt (Jones und Baylin, 2002). Veränderungen der postreplikativen Methylierung der C₅ Position von Cytosinresten in CG-Sequenzen (CpG Islands) regulatorischer Einheiten stehen hier im Vordergrund. (Frühwald et al., 2001) detektierten Hypermethylierungen in etwa 1 % aller CpG-Islands von Medulloblastomen und fanden hierfür einen prognostisch ungünstigen Zusammenhang. Beispiele für durch CpG-Hypermethylierung transkriptionell inaktivierte Gene sind *HIC1* (Rood et al., 2002; Waha et al., 2003) und *SGNE1* (Waha et al., 2007).

2.1.11 Histogenese

Für die Erklärung der genauen histogenetischen Herkunft von Medulloblastomzellen liegen verschiedene Hypothesen vor. Die nach der pathologischen Erstbeschreibung (Bailey et al., 1925) des MBs zunächst angenommene Existenz undifferenzierter Medulloblasten als Vorläuferzellen wurde nicht bestätigt (Vandenberg et al., 1987). Divergente genetische Aberrationen und Expressionsprofile in klassischen und desmoplastischen Tumoren deuten auf eine unterschiedliche Histogenese beider

Subgruppen hin. Die distinkte Expression spezifischer Marker (Calbindin-D28k und β -Tubulin der Klasse III) suggeriert die Entstehung klassischer Tumore aus ventrikulären Matrixzellen (Katsetos und Burger, 1994; Katsetos et al., 1995). Auf die äußere Körnerzellschicht als zellulärer Ursprungsort der desmoplastischen Tumoren deutet die gemeinsame Expression des $p75^{\text{NTR}}$ Rezeptors (Bühren et al., 2000) sowie die Aktivität des Sonic Hedgehog Signalwegs (Pomeroy et al., 2002).

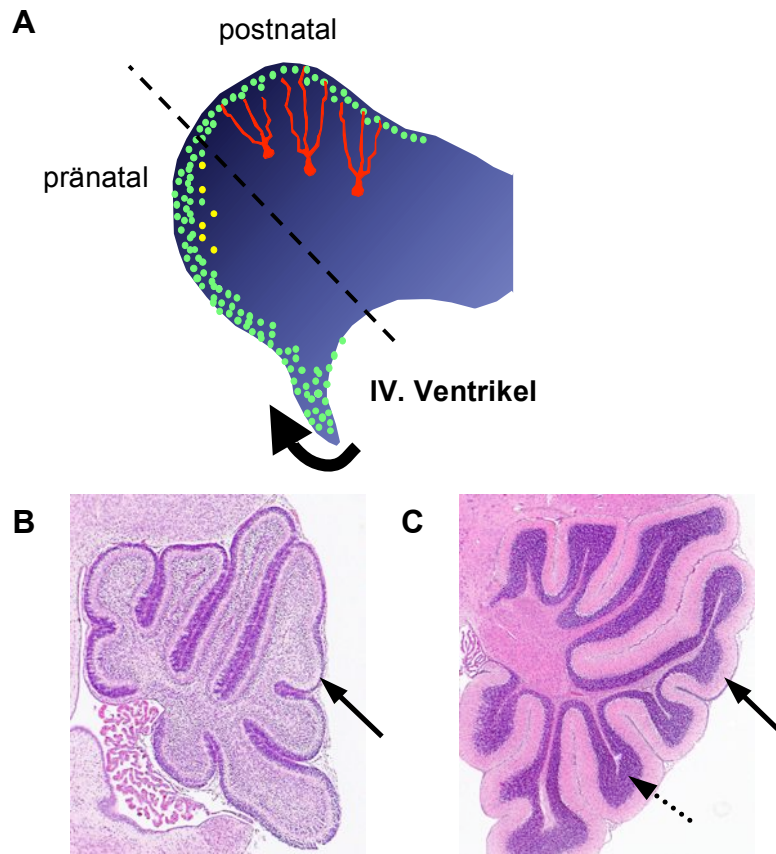


Abbildung 2: Histogenese der äußeren Körnerzellschicht

A: Schematische Darstellung der fetalen Körnerzellentwicklung:

Die Körnerzellprogenitoren (grün) wandern aus der Subventrikulärzone am IV. Ventrikel über die Rautenlippe in die äußere Körnerzellschicht des Cerebellums ein (Pfeil). Hier proliferieren die Körnerzellprogenitoren und beginnen im Verlauf mit der Migration in tiefere Schichten (gelbe Zellen). Später erfolgt die endgültige Differenzierung zu Körnerzellen (rot) unter Ausbildung von Fortsätzen.

B: Sagittalschnitt eines murinen Kleinhirns des postnatalen Tages 5. Zu erkennen ist die Umrahmung des Cerebellums mit der zeldichten äußeren Körnerzellschicht (Pfeil) aus der heraus die Differenzierung und Migration von Körnerzellen in tiefere Schichten erfolgt (HE-Schnitt, 5 X)

C: Sagittalschnitt eines murinen Kleinhirns des postnatalen Tages 15 mit weitgehend „leerer“ äußerer Körnerzellschicht (Pfeil) und zeldichter innerer Körnerzellschicht (gestrichelter Pfeil) nach vollendeter Körnerzellmigration (HE-Schnitt, 5 X)

2.1.12 Die Rolle des Sonic Hedgehog Signalwegs in der Tumorigenese

Die Identifikation von Mutationen im *PTCH*-Gen (Pietsch et al., 1997; Raffel et al., 1997) lässt auf eine Kausalität in Bezug auf die Tumorigenese desmoplastischer Tumoren schließen. Das *PTCH*-Gen kodiert für einen Zelloberflächenrezeptor (Ptch), der durch die Bindung spezifischer Liganden aus der Hedgehog-Familie eine zentrale Rolle in verschiedenen Entwicklungsvorgängen einnimmt (Goodrich und Scott, 1998). Damit ist der Patched-Rezeptor ein integraler Bestandteil des entwicklungsbiologisch hoch konservierten Sonic hedgehog Signalweges. Über die Hemmung einer weiteren Membrankomponente, Smoothed (Smoh), nimmt Patched eine regulative Funktion wahr. Durch die Bindung von Sonic Hedgehog (Shh) an den Patched-Rezeptor, wird Smoh enthemmt und kann seine proliferationsfördernde Aktivität, die z.T. über die Induktion der Transkription spezifischer Zielgene vermittelt wird, entfalten (Dean, 1996). An den Patched-exprimierenden Körnerzellvorläufern des sich entwickelnden Cerebellums, den histogenetischen Progenitoren desmoplastischer Medulloblastome, wirkt Shh als Mitogen und ist zudem für die Migration der Körnerzellvorläufer durch die Purkinje-Zellschicht in die innere Körnerzellschicht obligat (Wechsler-Reya und Scott, 1999). Inaktivierende Mutationen des Patched-Rezeptor-Gens bedingen einen anhaltenden Proliferationsstimulus auf die Körnerzellvorläufer der äußeren Körnerzellschicht. Im murinen Modell entwickeln Mäuse mit einer Haploinsuffizienz des *ptc*-Rezeptors in 15-20 % Medulloblastome, was die Bedeutung des Sonic Hedgehog / Patched Signalwegs in der Genese des Medulloblastoms untermauert (Goodrich et al., 1997).

2.1.13 Prognostische Aspekte

Durch die kontinuierliche Weiterentwicklung therapeutischer Konzepte und die Kombination verschiedener Therapiearten liegt die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate juvenil Erkrankter mittlerweile bei 60-70 % (Packer et al., 1994; Roberts et al., 1991). Auch im Erwachsenenalter Erkrankte weisen eine ähnliche 5-Jahres-Überlebensrate auf (Malheiros et al., 2002). Die Relevanz unterschiedlicher prognostischer Parameter wird diskutiert: Klinisch werden die Kriterien junges Manifestationsalter (< 3 Jahre), Metastasierung und postoperativer Resttumor aufgrund ihrer schlechten Prognose mit dem Begriff des „poor risk“ Medulloblastoms assoziiert (Packer, 1999). Histo- und molekularpathologisch wird die großzellige und anaplastische Variante des Tumors und das Auftreten spezifischer genetischer

Aberrationen, insbesondere eine myc-Amplifikation (Scheurlen et al., 1998) gleichfalls mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht. Eine prognostisch positive Bedeutung wird einer niedrigen proliferativen Aktivität (Ito et al., 1992), einer hohen Apoptoserate (Haslam et al., 1998) sowie der Expression des TrkC Rezeptors (Segal et al., 1994) beigemessen. Bei teilweise konträren Resultaten zeigen mehrere Studien einen besseren klinischen Verlauf von Patienten mit desmoplastischen Tumoren gegenüber Patienten mit den klassischen Tumoren im Kindesalter (Rutkowski et al., 2005; Sure et al., 1995).

2.2 Das Neurotrophin-System

Das Neurotrophin-System ist im an der Regulation multipler physiologischer Vorgänge beteiligt (Huang und Reichardt, 2001; Lewin und Barde, 1996). Im Rahmen der neuronalen Entwicklung, Funktion und Differenzierung werden hierdurch sowohl neurotrophe als auch biologisch entgegengesetzte Signale vermittelt. Die ambivalente Natur dieser Signalgebung erklärt sich zum Teil aus dem Vorkommen verschiedener Neurotrophine als Liganden zweier unterschiedlicher Neurotrophin-Rezeptorklassen, den Trk-Rezeptoren einerseits und dem niedrig affinen Neurotrophinrezeptor p75^{NTR} andererseits. Unterschiedliche Spezifitäten, Affinitäten und intrazelluläre Signalkaskaden der beiden Rezeptorklassen bedingen eine hohe Funktionsvielfalt der Neurotrophin-Wirkung (Chao, 2003).

2.2.1 Neurotrophine – Struktur und Funktion

Im zentralnervösen Gewebe von Säugetieren wurden vier Neurotrophine identifiziert: *nerve growth factor* (NGF), *brain-derived growth factor* (BDNF), Neurotrophin 3 (NT3) und Neurotrophin 4 (NT4). In ihrer Sequenz und Struktur weisen alle Neurotrophine Homologien auf. Prozessiert durch Proteasen entstehen die maturen Neurotrophine (12 - 13 kDa) aus Vorläuferproteinen, den Proneurotrophinen (30 - 35 kDa) (Lee et al., 2001; Seidah et al., 1996). Die Proneurotrophine selbst besitzen ebenfalls eine distinkte funktionelle Aktivität (Lee et al., 2001).

Der trophische Effekt maturer Neurotrophine auf neurales Gewebe ist vielfältig untersucht (Lewin und Barde, 1996). In das trophische Wirkspektrum ordnen sich neben dem Wachstumsreiz auch die Stimulation der zellulären Differenzierung, die Synaptogenese sowie die synaptische Plastizität ein. Demgegenüber steht die Beobachtung, dass Neurotrophine vor dem Hintergrund spezieller

Rezeptordistributionen Induktoren zellulärer Apoptosevorgänge sein können (Frade et al., 1996).

Die Verwirklichung der Neurotrophin-Wirkung erfolgt dabei über ein duales Rezeptorsystem, in dem die Rezeptoren der Trk-Familie dem niedrigaffinen Neurotrophinrezeptor p75^{NTR} gegenüberstehen.

2.2.2 Rezeptoren der Trk-Familie

Die Trk (Tropomyosin-Rezeptor-Kinase)-Familie besteht aus drei Rezeptor-Tyrosinkinasen (TrkA, TrkB, TrkC), mit Molekulargewichten von je ca. 140 kDa. Als Onkogen wurde zunächst TrkA identifiziert (Martin-Zanca et al., 1989), TrkB und TrkC wurden später aufgrund ihrer Homologien zu TrkA der Trk-Familie zugeteilt.

Charakteristisches Element der Trk-Familie ist die intrazelluläre Kinase-Domäne. Eine Ligandenbindung führt zur Dimerisierung der Rezeptoren und nachfolgender Autophosphorylierung definierter Tyrosinreste der Kinase-Domäne. Durch weitere phosphorylierungsabhängige Schritte stellt die aktivierte Kinase-Domäne Bindungsstellen für verschiedene Adaptoren und Enzyme bereit, und bildet damit die Schnittstelle der Rezeptoren mit ihren intrazellulären Signalwegen. Anbindungen finden die Trk-Rezeptoren an den PLC γ -Weg (Kaplan und Miller, 2000), den Ras-Raf-MAPK-Weg (Hagag et al., 1986) und den PI3K/AKT-Weg (Vaillant et al., 1999). Die Trk-Rezeptoren sind Mediatoren der trophischen Effekte der Neurotrophine und zudem für die neuronale Entwicklung obligat (Barbacid, 1994). Die Subtypen der Trk-Familie besitzen spezifische Präferenzen in den Affinitäten zu den einzelnen Neurotrophinen: TrkA bindet NGF, TrkB bindet BDNF und NT4 und TrkC bindet NT3 (Barbacid, 1994). Das Vorkommen von Spleißvarianten der *Trk*-mRNAs und die Expression dieser Isoformen mit differentiellen Affinitäten beeinflusst die neuronale Antwort auf Neurotrophine zusätzlich (Huang und Reichardt, 2003). Darüber hinaus ist die Spezifität der einzelnen Rezeptoren auch durch die gleichzeitige Präsenz des p75^{NTR}-Rezeptors modulierbar (Benedetti et al., 1993).

2.2.3 *low affinity* p75^{NTR}-Rezeptor

Ursprünglich wurde der p75^{NTR} als niedrig affiner Rezeptor für NGF identifiziert (Chao et al., 1986; Johnson und Taniuchi, 1987). Darüber hinaus bindet er die anderen Neurotrophine mit einer fast äquivalent niedrigen Affinität (Rodriguez-Tebar et al., 1990).

Struktur des p75^{NTR}-Gens und Proteins

Das p75^{NTR}-Gen ist auf dem Locus 17q21.33 kartiert und erstreckt sich über 23 kb. Es setzt sich aus sechs Exonen zusammen, die für eine 3,8 kb lange mRNA kodieren und von zwei untranslatierten Regionen eingefasst werden. Im Promotorbereich weist das Gen mehrere konservierte CpG Inseln auf. Der Einfluss verschiedener regulatoriver Elemente auf den p75^{NTR}-Promotor wird diskutiert, konnte aber nicht abschließend aufgeklärt werden (Roux und Barker, 2002).

Strukturelle Eigenschaften des p75^{NTR}-Proteins sind in Vertebraten hoch konserviert. Nach posttranslationeller Abspaltung des 28 Aminosäuren umfassenden Signalpeptids bilden die verbleibenden 399 Aminosäuren den Typ 1 Transmembran-Rezeptor p75^{NTR} (Large et al., 1989). Weitere posttranslationelle Modifikationen bestehen in der Palmitoylierung des Cysteins 279 (Barker et al., 1994) und Phosphorylierungen verschiedener Serin- und Threoninreste (Grob et al., 1985).

Charakteristische Elemente des extrazellulären Bereichs und zugleich verantwortlich für die Interaktion mit den Neurotrophinen sind vier Cystein-reiche Domänen (CRD1-4), die den p75^{NTR}-Rezeptor als Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie kennzeichnen (Baldwin et al., 1992; Chapman und Kuntz, 1995; Yan und Chao, 1991). Disulfidbrücken innerhalb der Domänen sind für die Rezeptorstruktur verantwortlich (Smith et al., 1994).

Auch der intrazelluläre Bereich des p75^{NTR} offenbart verschiedene konservierte Domänen und Bindungsmotive. Die juxtamembranäre Region (JM) ist verantwortlich für die differentielle Interaktion den TRAFs 4 und 6 (Khursigara et al., 1999; Krajewska et al., 1998). Durch die Aktivierung von NF- κ B und JNK sind die TRAFs Mediatoren trophischer und antitrophischer Prozesse und stellen eine Verbindung zu verschiedenen Signalkaskaden her (Bradley und Pober, 2001). Als weiteres intrazelluläres Motiv teilt der p75^{NTR}-Rezeptor mit anderen Mitgliedern der TNFR-Superfamilie das Vorkommen einer Todesdomäne (*death domain*, DD) (Liepinsh et al., 1997). Über die Rekrutierung verschiedener Adaptorproteine können DDs der TNFR-Superfamilie durch aktivierte Caspase-Kaskaden Apoptose induzieren (Nagata, 1997). Zusätzliche Relevanz kommt einem GTPase-aktivierendem Bereich innerhalb der DD zu (Dostaler et al., 1996). Abschließend bildet das c-terminale Tripeptid Ser-Pro-Val ein PDZ-Domänen-bindendes Sequenzmotiv, an dem FAP-1

bindet (Irie et al., 1999). Einen Überblick über den strukturellen Aufbau des Rezeptors gibt Abbildung 3.

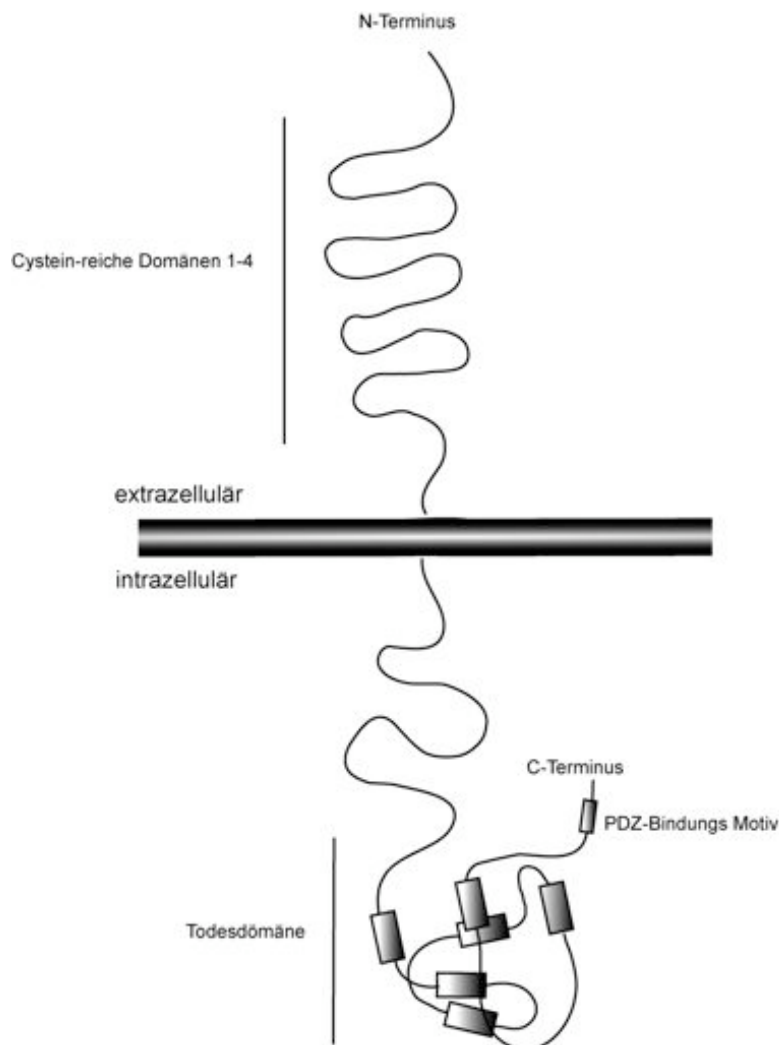


Abbildung 3: Struktureller Aufbau des p75^{NTR}, modifiziert nach Roux et Barker (2002)

p75^{NTR} Isoformen

Neben der Expression des vollständigen p75^{NTR} ist auch das Vorkommen einer Spleißvariante, die das Exon III ausspart und damit zur Synthese eines 38 kDa Proteins führt, beschrieben (Dechant und Barde, 1997). Ohne die von Exon III kodierten CRDs 2-4 ist die entstandene p75^{NTR}-Isoform (s-p75^{NTR}) nicht in der Lage, Neurotrophine zu binden. Die funktionelle Relevanz des s-p75^{NTR} ist unklar.

Cerebrale Distribution

Während früher Entwicklungsphasen lässt sich eine temporäre p75^{NTR}-mRNA Expression in verschiedenen zentralnervösen Zellpopulationen beobachten (Buck et

al., 1987). Besonders in Phasen der zellulären Differenzierung findet sich der $p75^{\text{NTR}}$ auf einer Vielzahl neuraler Zellen (Bothwell, 1991). Während Zellen des embryonalen Neuralrohrs noch eine deutliche $p75^{\text{NTR}}$ -Expression aufweisen (Heuer et al., 1990), beschränkt sich diese in späteren Phasen der cerebralen Entwicklung auf postmitotische und migrierende Zellen (Farinas et al., 1998). Im postnatalen ZNS ist die Expression insgesamt deutlich reduziert und auf spezifische Populationen beschränkt (Roux und Barker, 2002).

Im Kontext der cerebellären Entwicklung und Differenzierung lässt sich eine temporäre $p75^{\text{NTR}}$ -Expression der äußeren Körnerzellschicht, der Purkinje-Zellschicht sowie cerebellärer Kerngebiete beobachten (Yan und Johnson, 1988).

2.2.4 Funktionelle Aspekte

Hinsichtlich der $p75^{\text{NTR}}$ -vermittelten intrazellulären Signale sind unterschiedliche, teilweise in ihrer Wirkung konträre Funktionen, beschrieben. Auf diese Weise scheint der $p75^{\text{NTR}}$ in der Lage, in bestimmten Kontexten zelluläres Überleben (Hamanoue et al., 1999) zu sichern oder apoptotische Prozesse (Rabizadeh et al., 1993) zu induzieren. Zudem sind Interventionen in den Zellzyklus beschrieben (Bibel und Barde, 2000). Auch mit neuronaler Aussprossung, Myelinisierung und Differenzierung wird der $p75^{\text{NTR}}$ in Zusammenhang gebracht. Die hinsichtlich seiner proliferativen und apoptotischen Effekte bifunktionale Natur des $p75^{\text{NTR}}$ teilt dieser mit anderen Mitgliedern der TNFR-Familie. Dabei erlaubt die Möglichkeit der Aktivierung sowohl von Apoptosewegen als auch von proliferationsfördernden Signalen eine präzise Regulation der zellulären Bestimmung (Roux und Barker, 2002).

Im Gegensatz zu den Rezeptoren der Trk-Familie ist der $p75^{\text{NTR}}$ aufgrund des Fehlens einer eigenen enzymatischen Aktivität auf eine komplexe Interaktion mit verschiedenen intrazellulären Mediatoren angewiesen. Aus der Vielschichtigkeit dieser Interaktionen erklärt sich das breite Funktionsspektrum. Abbildung 4 gibt einen Überblick über die interagierenden Faktoren.

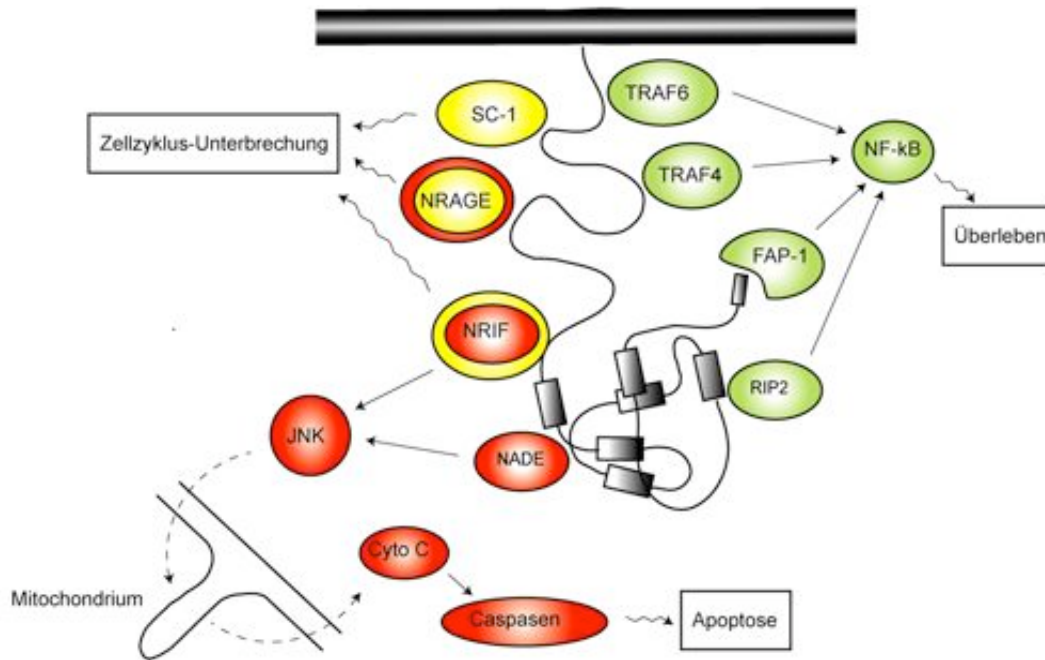


Abbildung 4: Schematische Darstellung der intrazellulären Interaktoren von p75^{NTR}. Grün hinterlegte Interaktoren vermitteln Wachstumssignale, rote hinterlegte Proteine haben eine proapoptotische Wirkung und gelbe Proteine vermitteln eine Unterbrechung des Zellzyklus, modifiziert nach Roux et Barker (2002)

p75^{NTR} als Promotor des zellulären Überlebens

Protective Eigenschaften des p75^{NTR} im Sinne des zellulären Überlebens sind vielfach beschrieben (Roux und Barker, 2002). NGF scheint als Ligand in diesem Zusammenhang essentiell zu sein. Als zentraler Faktor in der intrazellulären Realisierung trophischer Signale wird NF-κB angenommen, dessen DNA-Bindungsaktivität durch die NGF-Bindung an den p75^{NTR} deutlich erhöht wird (Carter et al., 1996). Eine zusätzliche Möglichkeit zur Aufrechterhaltung der zellulären Integrität durch den p75^{NTR} besteht in der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs (Roux et al., 2001).

p75^{NTR} als Induktor apoptotischer Prozesse

Die alleinige Überexpression von p75^{NTR} in neuronalen Zellen kann Apoptose fördern (Rabizadeh et al., 1993). In zahlreichen *in-vitro*-Studien ist allerdings die Abhängigkeit der apoptotischen Induktion von der Neurotrophin-Bindung an den p75^{NTR} beschrieben (Roux und Barker, 2002). Eine weitere Abhängigkeit ergibt sich aus der Koexpression der Trk Rezeptoren. Eine relevante Induktion des Zelltods durch Neurotrophine tritt besonders unter Abwesenheit der zelleigenen Trk-Rezeptoren auf (Bamji et al., 1998; Yoon et al., 1998). Ein Schwerpunkt des

proapoptotischen Signalwegs liegt deshalb in frühen Entwicklungsphasen von Geweben, deren p75^{NTR}-Expression der TrkA-Expression vorausgeht (Bamji et al., 1998; Yoon et al., 1998). Eine zentrale Rolle des Signalwegs ist dabei die Aktivierung des cytoplasmatischen Proteins c-Jun amino-terminal kinase (JNK) (Casaccia-Bonofil et al., 1996) durch das GTP-bindende Protein Rac (Harrington et al., 2002). Bindungsglieder zwischen Rac und den intrazellulären Bindungsdomänen des p75^{NTR} sind die Faktoren NT-receptor interacting factor (NRIF), NT-associated cell death executor (NADE), NT-receptor-interacting MAGE homolog (NRAGE) und TNF reseptor-associated factors (TRAFs) (Reichardt, 2006). Konsequenzen der JNK-Aktivierung sind neben der Phosphorylierung von c-jun die Aktivierung von p53 und den Mitgliedern der „BH3-domain only“ Familie Bim und Bad. Daraufhin kommt es zur mitochondrialen Translokation von Bax, zur Freisetzung des mitochondrialen Cytochroms C und konsekutiv zur Aktivierung der Caspasen 9, 6 und 3 (Nykjaer et al., 2005). Ein weiterer Apoptoseweg beruht auf der Abspaltung der intrazellulären Rezeptordomäne (p75^{NTR}-ICD) durch die Aktivität der Enzyme α - und γ -Sekretase (Kanning et al., 2003). Die abgespaltene p75^{NTR}-ICD ist voraussetzend für Transfer des DNA-Bindungsproteins NRIF in den Zellkern (Kenchappa et al., 2006), der in neuronalen Zellen Apoptose induziert (Linggi et al., 2005).

p75^{NTR} als Regulator des Zellzyklus

Neben der proapoptotischen Wirkung vermittelt p75^{NTR} auch zellzyklusregulierende Effekte. In murinem Retina-Gewebe ist als Folge NGF-induzierter p75^{NTR}-Aktivität ein Wiedereintritt postmitotischer Zellen in den Zellzyklus beschrieben (Frade, 2000). Frade diskutiert darüber hinaus die Induktion von Apoptose in p75^{NTR}-exprimierenden Geweben zumindest teilweise als Folge p75^{NTR}-vermittelter Störungen des Zellzyklus.

Interaktionen zwischen p75^{NTR} und den Trk-Rezeptoren

Die funktionelle Vernetzung des p75^{NTR} und der Trk-Rezeptoren ist vielfach beschrieben. Hempstead et al., 1991 beschreiben erstmals eine Erhöhung der NGF-Bindungsaffinität von TrkA Rezeptoren durch die Anwesenheit von p75^{NTR}. Auch die NGF-vermittelte TrkA Aktivität erscheint in der Anwesenheit von p75^{NTR} erhöht (Barker und Shooter, 1994; Mahadeo et al., 1994; Verdi et al., 1994). Besonders vor dem Kontext niedriger Neurotrophinkonzentrationen scheint p75^{NTR} für die TrkA-

Aktivierung relevant (Esposito et al., 2001). Verschiedene Autoren führen diese Interaktion v.a. auf einen verzögerten Abbau der Trk-Rezeptoren in Gegenwart des $p75^{NTR}$ -Rezeptors zurück (Geetha et al., 2005; Makkerh et al., 2005).

2.3 Ziele dieser Arbeit

Eine funktionelle Rolle des Oberflächenrezeptors $p75^{NTR}$ ist in verschiedenen Tumoren beschrieben und wird in der deutlichen Mehrzahl als wachstumshemmend eingestuft. Eine putative Rolle des $p75^{NTR}$ als Tumorsuppressor in der Genese des Medulloblastoms erscheint besonders vor dem Hintergrund der besseren klinischen Prognose des $p75^{NTR}$ -exprimierenden desmoplastischen Subtyps möglich. Aufgrund des beschriebenen breiten Wirkspektrums des $p75^{NTR}$ in neuralen Zellen steht im Rahmen dieser Arbeit die Exploration der Rolle des $p75^{NTR}$ in der Genese des Medulloblastoms im Vordergrund.

Neben Untersuchungen auf genetischer Ebene wird auch eine funktionelle Charakterisierung des $p75^{NTR}$ in Medulloblastomzellen angestrebt. Folgende Fragestellungen stehen dabei im Vordergrund:

- In welcher Frequenz und in welcher Verteilung unter den verschiedenen Histotypen weisen MB Allelverluste des chromosomalen $p75^{NTR}$ -Lokus 17q21.33 auf?
- Finden sich in MB Mutationen des in DMB möglicherweise wachstumshemmend und „protektiv“ wirkenden Gens $p75^{NTR}$?
- In wieweit besitzen gefundene Veränderungen eine transkriptionelle Konsequenz?
- Bestehen Veränderungen des Epigenoms im Sinne von Hypermethylierungen des $p75^{NTR}$ -Promotorbereichs?
- Lässt sich die unterschiedliche $p75^{NTR}$ Expression in CMB und DMB, gegebenenfalls im Kontext einer differentiellen Signalwegsaktivierung *in vitro* an murinen Körnerzellprogenitoren und murinem Gewebe von $ptc^{+/-}$ Tieren modellieren?

- Ist in einem, im Rahmen dieser Arbeit etablierten, stabilen und induzierbaren Zellsystem die funktionelle Rolle von p75^{NTR} und seiner intrazellulären Domänen eingrenzbar?

3 Material und Methoden

3.1 Tumorkollektiv

Das molekulargenetisch untersuchte Kollektiv umfasste 85 Medulloblastombiopsien, sowie teilweise zugehörige konstitutionelle DNA aus peripherem Blut. Die Behandlung der Patienten erfolgte gemäß dem Studienprotokoll der multizentrischen HIT-Studie der Deutschen Gesellschaft für pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Sämtliche Tumore wurden neuropathologisch charakterisiert und gemäß den aktuellen Richtlinien der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) histologisch klassifiziert.

| <u>Tumor ID</u> | <u>Blut ID</u> | <u>Entität (Zelllinie)</u> | <u>Tumor ID</u> | <u>Blut ID</u> | <u>Entität (Zelllinie)</u> |
|-----------------|----------------|----------------------------|-----------------|----------------|----------------------------|
| D40 | D39 | CMB | D499 | - | CMB (W-1580) |
| D83 | D38 | CMB | D523 | D489 | DMB |
| D192 | - | CMB (D556MED) | D540 | - | CMB |
| D193 | - | CMB (D283MED) | D545 | D551 | CMB |
| D210 | D211 | CMB | D546 | D541 | CMB |
| D220 | D221 | CMB | D567 | D575 | CMB |
| D224 | D225 | CMB | D569 | D577 | CMB |
| D226 | D227 | CMB | D663 | D664 | CMB |
| D239 | D240 | CMB | D802 | D792 | CMB |
| D243 | D244 | CMB | D803 | - | CMB (D341MED) |
| D245 | D246 | CMB | D804 | - | CMB (D425MED) |
| D262 | D261 | CMB | D806 | D752 | CMB |

| <u>Tumor ID</u> | <u>Blut ID</u> | <u>Entität (Zelllinie)</u> | <u>Tumor ID</u> | <u>Blut ID</u> | <u>Entität (Zelllinie)</u> |
|-----------------|----------------|----------------------------|-----------------|----------------|----------------------------|
| D280 | D281 | CMB | D810 | D818 | CMB |
| D282 | D283 | DMB | D819 | D847 | CMB |
| D286 | D553 | CMB | D848 | D850 | CMB |
| D288 | D712 | CMB | D849 | D865 | DMB |
| D289 | D542 | CMB | D978 | D979 | DMB |
| D293 | D543 | CMB | D980 | D981 | CMB |
| D295 | D662 | CMB | D999 | D1000 | CMB |
| D322 | D323 | DMB | D1002 | D1003 | CMB |
| D330 | D374 | CMB | D1028 | D1030 | DMB |
| D333 | D188 | CMB | D1088 | D1089 | DMB |
| D353 | D586 | CMB | D1103 | D1104 | CMB |
| D357 | D572 | DMB | D1106 | D1107 | CMB |
| D365 | - | DMB (Daoy) | D1121 | D1122 | CMB |
| D366 | D348 | CMB | D1127 | D1128 | CMB |
| D368 | D299 | CMB | D1144 | D1145 | DMB |
| D369 | D297 | CMB | D1165 | D1166 | CMB |
| D383 | D384 | DMB | D1173 | D1174 | CMB |
| D391 | D396 | CMB | D1177 | D1179 | CMB |
| D398 | D407 | DMB | D1185 | D1190 | CMB |
| D409 | D558 | CMB | D1186 | D1187 | CMB |
| D442 | D384 | DMB | D1346 | D1349 | CMB |
| D446 | D462 | CMB | D1573 | D1575 | DMB |
| D447 | D459 | CMB | D1579 | D1581 | CMB |
| D448 | D430 | DMB | D1622 | D1624 | CMB |

| <u>Tumor ID</u> | <u>Blut ID</u> | <u>Entität (Zelllinie)</u> | <u>Tumor ID</u> | <u>Blut ID</u> | <u>Entität (Zelllinie)</u> |
|-----------------|----------------|----------------------------|-----------------|----------------|----------------------------|
| D468 | - | CMB (MHH-MED1) | D1633 | D1635 | CMB |
| D471 | D479 | CMB | D1638 | D1640 | CMB |
| D480 | D498 | CMB | D1721 | D1723 | CMB |
| D481 | D488 | CMB | D1759 | D1761 | CMB |
| D486 | D487 | CMB | D1799 | D1797 | DMB |
| D491 | D496 | CMB | D1888 | D1889 | DMB |
| D492 | D548 | CMB | | | |

Tabelle 1: Auflistung des untersuchten Tumorkollektivs

3.2 Untersuchte Zelllinien

DNA der etablierten humanen Medulloblastom-Zelllinien DAOY (Jacobsen et al., 1985), D283MED (Friedman et al., 1985), D425MED (He et al., 1991), D556MED (Aldosari et al., 2000), MHH-Med1 (Pietsch et al., 1994), und 1580Wü (Pietsch, unpubliziert) wurde untersucht. Die Zelllinie D283MED wurde zusätzlich in Kultur gehalten (Kulturbedingungen: Kapitel 3.17).

3.3 Murines Gewebe

Paraffinmaterial

Zur immunhistochemischen Analyse wurden Cerebella aus C57Bl6 Mäusen verschiedener postnataler Stadien (postnataler Tag 1, 3, 5, 9, 11) entnommen und in Paraffin eingebettet. Murine Medulloblastome *ptc*-hemidefizienter Tiere (Goodrich et al., 1997) wurden aufgearbeitet.

Murine Körnerzellvorläufer

Die Isolierung muriner Körnerzellen aus 8 Tage alten Abkömmlingen von weiblichen C57BL/6BOM und männlichen CH3 Mäusen erfolgte nach publizierten Protokollen (Hartmann et al., 2005; Wechsler-Reya und Scott, 1999). Die Zellen wurden unter Serum-freien Kulturbedingungen gehalten (Kapitel: 3.18).

3.4 Referenzgewebe

Humanes Cerebellum:

DNA und RNA zweier fetaler Cerebella (Gestationsalter: 15,5 und 18 Wochen) wurde als Referenz zu Medulloblastomen untersucht. Das Gewebe wurde freundlicherweise durch Cynthia Goodyer (McGill University Health Center, Montreal, Canada) zur Verfügung gestellt. Die Gewebentnahme erfolgte von elektiv durchgeführten Aborten nach vorheriger Einwilligung der Mutter und entsprechend der Vorgaben der lokalen Ethikkommission.

3.5 Isolierung genomischer DNA aus Leukozyten

Die Extraktion genomischer DNA aus Leukozyten erfolgte nach der Methode von Blin und Stafford (Blin et al., 1976).

Material

Blut-Lysispuffer:

| | |
|-----------------------------|---------|
| NH ₄ Cl (155 mM) | (Merck) |
| KHCO ₃ (10 mM) | (Merck) |
| EDTA (0,1 mM, pH 8,0) | (Sigma) |
| pH 7,4 | |

Tumor-(Kern-)Lysispuffer:

| | |
|----------------------------|--------------------|
| Tris-HCl (10,0 mM, pH 8,0) | (Sigma) |
| EDTA (0,1 mM , pH 8,0) | (Sigma) |
| SDS (0,5 %) | (ICN LabSolutions) |

TE-Puffer:

| | |
|--------------------------|---------|
| Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) | (Merck) |
| EDTA (1 mM, pH 8,0) | (Sigma) |

| | |
|---|---------------------|
| RNase, DNase-frei | (Roche) |
| Proteinase K (10 mg/ml) | (Roche) |
| Phenol:Chloroform:Isoamyl-Alkohol (25:24:1) | (Life Technologies) |
| PBS | (Life Technologies) |
| Ammoniumacetat (3 M) | (Sigma) |

Ethanol

(KMF)

Durchführung

10 ml Heparinblut wurden mit 30 ml kaltem Blut-Lysispuffer versetzt, gemischt und 15-30 min auf Eis lysiert. Nachfolgend wurde die entstandene Suspension für 12 min bei 900 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und mit 6 ml Kern-Lysispuffer versetzt. Nach vollständiger Lösung des Pellet folgte eine RNase-Behandlung (100 µg/ml) für 1 Stunde bei 37 °C. Anschließend wurden 60 µl Proteinase K (10 mg/ml) beigemischt und bei 50 °C über Nacht inkubiert. Zur Aufreinigung wurde zu den Proben 1 Vol des Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol-Gemischs gegeben, für 30 min gemischt und 10 min bei 1800 g zentrifugiert. Nach Abnahme der DNA-haltigen wässrigen Phase wurde je zweimal hintereinander 1 Vol Chloroform zugegeben, gemischt, wie oben beschrieben zentrifugiert und die wässrige Phase abgenommen. Schließlich wurde die DNA durch Zugabe von 0,2 Vol 3 M Ammoniumacetat und 2,5 Vol Ethanol präzipitiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen in TE-Puffer resuspendiert.

3.6 Isolierung von DNA aus Tumormaterial

Am Kryostaten wurden jeweils 100 10 µm dicke Schnitte des Tumorgewebes angefertigt. Der mikroskopische Ausschluss einer Kontamination durch Normalgewebe oder nekrotische Anteile erfolgte an Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gefrierschnitten. Zur DNA-Extraktion wurde das geschnittene Tumorgewebe mit 6 ml Tumor-(Kern)-lysispuffer versetzt und wie unter Kapitel 3.5 beschrieben weiter verfahren.

3.7 Polymerase Ketten Reaktion

Die PCR ist eine molekularbiologische *in-vitro*-Methode zur exponentiellen Amplifikation definierter DNA-Sequenzen (Saiki et al., 1989). Einzelsträngige Oligonukleotide (Primer), in ihrer Sequenz komplementär zu den die Ziel-Sequenz (Template) flankierenden Bereichen, definieren die Startpunkte der PCR. Zu Beginn der Reaktion wird die DNA bei 94 °C denaturiert, um den Primern einen Zugang zu den vereinzelt DNA-Strängen zu ermöglichen. Die Hybridisierung der Primer an die zu ihnen komplementären Sequenzen (Annealing) stellt den nächsten Schritt dar. Das Annealing erfolgt bei individuellen Temperaturen, die sowohl durch die Länge

des Primers als auch durch ihre spezifische Basenzusammensetzung bedingt werden. Den Einzelstrang als Matrize nutzend erfolgt im Anschluß die Elongation der von den Primern ausgehenden Einzelstränge in die Richtung ihrer freien 3'Hydroxylgruppen (Extension). Dabei werden durch eine hitzestabile Polymerase zur Matrize komplementäre Nukleosidtriphosphate bei einem Temperaturoptimum von 72 °C miteinander verknüpft. Durch zyklische Wiederholungen der beschriebenen Schritte lassen sich die neu synthetisierten DNA-Doppelstränge annähernd exponentiell vermehren. Eine initiale 5-minütige Phase bei 95 °C zur optimalen Denaturierung sowie eine finale Extensionsphase bei 72 °C umrahmen das zyklische Programm.

Material (für einen 10 fachen PCR-Ansatz)

Invitrogen Taq Polymerase

| | | |
|----------|---|--------------|
| 10 µl | 10x PCR-Puffer | (Invitrogen) |
| 10 µl | dNTPs [dATP, dGTP, dCTP, dTTP] (200 mM) | (Promega) |
| 5 µl | Primer forward (10 pmol) | (MWG) |
| 5 µl | Primer reverse (10 pmol) | (MWG) |
| 2/3/4 µl | MgCl ₂ (50mM) | (Invitrogen) |
| 0,5 µl | Taq Polymerase (5 U / µl) | (Invitrogen) |
| | evtl. DMSO (10%) | (Sigma) |
| | aqua bidest. ad 90 µl | |

Roche Fast Start Taq Polymerase

| | | |
|--------|---|-----------|
| 10 µl | 10x PCR-Puffer (15 mM MgCl ₂) | (Roche) |
| 10 µl | dNTPs [dATP, dGTP, dCTP, dTTP] (200 mM) | (Promega) |
| 5 µl | Primer forward (10 pmol) | (MWG) |
| 5 µl | Primer reverse (10 pmol) | (MWG) |
| 0,8 µl | Fast Start Taq Polymerase (5 U / µl) | (Roche) |
| | evtl. GC-Solution (10%) | (Roche) |
| | aqua bidest. ad 90 µl | |

Solis BioDyne

| | | |
|-------|--------------------------|-----------------|
| 30 µl | 10x Puffer B | (Solis BioDyne) |
| 30 µl | MgCl ₂ (25mM) | (Solis BioDyne) |

| | | |
|------------------------|--|-----------------|
| 24 µl | dNTPs [dATP, dGTP, dCTP, dTTP] (10 mM) | (Promega) |
| 6 µl | Primer forward (10 µM) | (MWG) |
| 6 µl | Primer reverse (10 µM) | (MWG) |
| 3 µl | Hot FIREPol DNA Polymerase (5 U/µl) | (Solis BioDyne) |
| aqua bidest. ad 280 µl | | |

Durchführung

Die PCR-Reaktionen mit den Reaktionsreagenzien der Firmen Invitrogen und Roche wurden unter Einsatz von je 1 µl DNA-Lösung (10-50 ng, Template) in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Die Reaktionen fanden, soweit nicht anders gekennzeichnet, in einem 500 µl Reaktionsgefäß der Firma Eppendorf statt. In Kapitel 3.11 wurden die PCR-Reagenzien der Firma Solis BioDyne zu Reaktionsansätzen von je 30 µl verwendet. Unter Zugabe von 2 µl DNA-Lösung fanden die Reaktionen in 200 µl Reaktionsgefäßen statt. Zudem wurde die initiale Denaturierungsphase auf 15 min bei 97 °C verlängert. Die individuell für jedes Primerpaar optimierten Bedingungen in Bezug auf die MgCl₂-Konzentration, Annealing-Temperatur, Zykluszahl, Zugabe von DMSO / GC-Solution sind in den entsprechenden Kapiteln angegeben.

3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese lassen sich Nukleinsäurestränge (DNA oder RNA) ihrer Länge nach trennen und detektieren. Das Agarosegel dient dabei als Matrix für die Bewegung der negativ geladenen Stränge in einem elektrischen Feld. Durch die Interkalation des fluoreszierenden Farbstoffs Ethidiumbromid in die Nukleinsäurestränge lassen sich diese sichtbar machen. Die gleichzeitige Auftrennung von unterschiedlichen Molekülen definierter Länge (Längenstandards) ermöglicht eine Bestimmung der Länge.

Material

Agarosegel (Peqlab):

| | |
|---|----------|
| Agarose | (Peqlab) |
| 10 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) auf 100 ml | (Roth) |
| aqua bidest. | |

Agarosegel (Biozym):

| | |
|---|----------|
| LE GP Agarose | (Biozym) |
| 10 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) auf 100 ml aqua bidest. | (Roth) |

Ladepuffer:

| | |
|---------------------------------|---------|
| Ficoll Typ 400 (15 %) | (Sigma) |
| Bromphenolblau (0,25 %) | (Sigma) |
| Xylencyanol (0,25 %) | (Merck) |
| Verdünnung 2:5 mit aqua bidest. | |

10x TBE:

| | |
|--------------------|---------------------|
| 108 g/l Tris Base | (Sigma) |
| 40 ml EDTA, 0,5 M | (Life Technologies) |
| 55 g/l Borsäure | (Sigma) |
| ad 1l aqua bidest. | |

Agarose-Laufpuffer:

0,5 x TBE

Längenstandards:

| | |
|--------------------|--------|
| pUC19 MspI (L-505) | (MBBL) |
| 100 bp DNA Ladder | (NEB) |
| 1 kb DNA Ladder | (NEB) |

Durchführung

Wenn nicht anders angegeben, wurde die Agarose der Firma Peqlab verwendet. 1 Vol PCR-Produkt wurde mit 1 Vol Ladepuffer versetzt. Die Proben liefen unter 120-200 V 10-30 min im elektrischen Feld der Agarosekammer Mighty Bright der Firma Hofer.

3.9 Mikrosatellitenanalyse

Die Darstellung von Allelverlusten (*Loss of heterozygosity*, LOH) durch die Mikrosatellitenanalyse beruht auf dem Vorhandensein polymorpher, heterozygoter genomischer Merkmale (SNPs, Mikrosatelliten) in einem Genlocus. Unter Mikrosatelliten versteht man nicht kodierende repetitive Di-, Tri- oder Tetra-Nukleotidsequenzen, die in regelmäßigen Abständen von ca. 30 kb über das gesamte menschliche Genom verteilt vorkommen. Diese auch als „Simple Sequence Repeats“ (SSRs) bezeichneten Wiederholungseinheiten zeigen innerhalb einer Population eine hohe Heterozygotenfrequenz bezüglich ihrer Länge. Dieser Polymorphismus erklärt ihre besondere Eignung als Marker für Analysen von Allelverlusten (Hamada und Kakunaga, 1982).

3.9.1 LOH-Analyse auf denaturierenden Polyacrylamidgelen

Bei der LOH-Analyse werden mittels PCR aus der DNA sowohl des Normalgewebes als auch des Tumors entsprechende Mikrosatelliten amplifiziert und die PCR-Produkte nach ihrer Länge auf denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Im informativen Fall eines heterozygoten Mikrosatelliten lassen sich die Allele im Normalgewebe unterscheidbar darstellen. Während der Tumorigenese auftretende Allelimbalancen lassen sich anschließend in der korrespondierenden Tumor-DNA nachweisen. Von den verwendeten Marker sind jeweils zwei up- bzw. downstream des p75^{NTR}-Gens lokalisiert. Abbildung 5 gibt einen schematischen Überblick über die chromosomale Region.

Material

Gelstocklösung für 8 %-iges Polyacrylamidgel (in Klammern Angaben für 10

%-iges Gel):

| | | |
|-----------------|-----------------------|---------------------|
| 14 ml (17,5 ml) | Acrylamidlösung, 40 % | (Life Technologies) |
| 7 ml | 10x TBE (siehe oben) | |
| 32,2 g | Harnstoff | (Sigma) |
| ad 70 ml | aqua bidest. | |
| 400 µl | APS (20 %) | (Sigma) |
| 40 µl | TEMED | (Biorad) |

LOH-Ladepuffer:

Formamid (98 %) (Sigma)

EDTA (1 mM) (Sigma)

Xylencyanol (0,25 %) (Merck)

Bromphenolblau (0,25 %) (Sigma)

LOH-Laufpuffer:

1x TBE

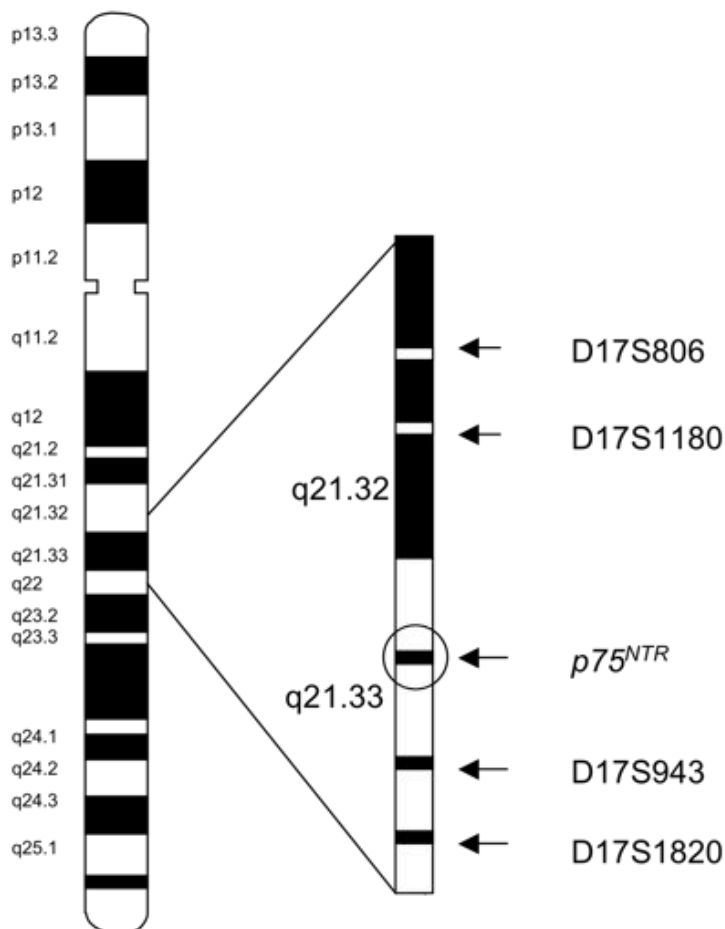


Abbildung 5: Die chromosomale Region 17q21.32 - 17q21.33 mit den untersuchten Mikrosatellitenmarkern, die den Locus des $p75^{NTR}$ -Gens umfassen.

Durchführung

Die PCR der Marker wurden in einem Endvolumen von 10 μ l durchgeführt. Sämtliche Reaktionen erfolgten auf einem PCR-Gerät der Firma Biometra. Anschließend wurde dem PCR-Produkt im Verhältnis 1:1 LOH-Ladepuffer zugegeben, 5 min bei 94 °C denaturiert, auf Eis gestellt und auf 10-12 %ige denaturierende Polyacrylamidgelen geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 35 mA für 3-6 h. Zur

anschließenden Silberfärbung der Gele siehe 3.9.2. In der Tabelle 2 sind die PCR- und Gelbedingungen aufgeführt.

| <u>Mikrosatellit</u> | <u>Primer-Sequenz</u> | <u>PCR-Bedingung</u> | <u>Polyacrylamidgel, Laufzeit</u> |
|----------------------|--|--|---------------------------------------|
| D17S1180 | Forward: 5'-GGCAACAAGAGCAAAACTGT-3' Reverse: 5'-CAAATGGCACGGTAGAAATC-3' | 1,5 mM MgCl ₂ , (Roche), 34 x (95°×35 s / 52°×40 s / 72°×30 s) | 10 % Harnstoff, 3 h |
| D17S806 | Forward: 5'-AGCTTTACTGCACTAGCCCC-3' Reverse: 5'-GGAGATTGGGATTTGGTGAC-3' | 1,5 mM MgCl ₂ , 10 % DMSO, (Invitrogen), 34 x (95°×35 s / 58°×40 s / 72°×40 s) | 12 % Harnstoff, 5 h |
| D17S943 | Forward: 5'-TGACTGTAGCCCTCACCC-3' Reverse: 5'-TTCCAACCATCGTTTGTGTA-3' | 1,5 mM MgCl ₂ (Invitrogen), 34 x (95°×35 s / 56°×40 s / 72°×40 s) | 12 % Harnstoff, 6 h |
| D17S1820 | Forward: 5'-CATGAGGTCTTCCAGAAGG-3' Reverse: 5'-AACACACTTGCTGATGTGC-3' | 2 mM MgCl ₂ (Invitrogen), 34 x (95°×35 s / 54°×40 s / 72°×40 s) | 10 % Harnstoff, 4 h |

Tabelle 2: Primer und PCR-Bedingungen für die untersuchten Mikrosatellitenmarker

3.9.2 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung stellt eine sensitive Methode zur Darstellung von DNA-Banden in Polyacrylamidgelen dar (Budowle et al., 1991). Sie beruht auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, mit Silberionen im sauren Milieu Komplexe zu binden. Komplexassoziierte Silberionen lassen sich mit alkalischem Formaldehyd zu elementarem Silber reduzieren. Die ausgefallenen Silbermoleküle lassen die DNA-Banden bräunlich bis schwarz erscheinen. Die Nachweisgrenze liegt bei 5 ng DNA pro Bande.

Material

| | |
|---------------------|------------------|
| Ethanol, 10 % | (Riedel de Haën) |
| Salpetersäure, 1 % | (Merck) |
| Silbernitrat, 0,2 % | (Serva) |
| Essigsäure, 10 % | (Merck) |

Natriumbicarbonatlösung:

| | |
|---------------------------------------|---------|
| 150 g Na ₂ CO ₃ | (Merck) |
| 2,5 ml Formaldehyd, 35 % | (Merck) |
| ad 5 l aqua bidest. | |

Durchführung

Zur Fixierung der Nukleinsäuren in der Gelmatrix wurden die Gele für 5 min mit 10 %-igem Ethanol inkubiert. Nach 1-2 min Schwenken in 1 %-iger Salpetersäure folgte eine kurze Spülung mit aqua bidest., und eine anschließende 20-minütige Inkubationsphase in 0,2 %-iger Silbernitratlösung. Durch Zugabe der Na₂CO₃-Formaldehyd-Lösung erfolgte die Reduktion der Silberionen, bis die DNA-Banden deutlich sichtbar waren. Mit 10 %-iger Essigsäure wurde die Reaktion gestoppt. Nach erneuter Spülung mit aqua dest. wurden die Gele auf einem Vakuumtrockner der Firma Hoefer (Slab Gel Dryer, SE 1160) bei 75 °C etwa 2 h getrocknet.

3.10 SSCP-Analyse

Als Screeningverfahren erlaubt die Single Strand Conformational Polymorphism-Analyse (SSCP) die Identifikation von Sequenzvariationen in DNA-Proben (Hayashi, 1992; Orita et al., 1989). Dazu werden denaturierte PCR-Produkte auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Unter diesen Bedingungen kommt es zu Wechselwirkungen innerhalb des denaturierten DNA-Einzelstränge, die eine Ausbildung spezifischer räumlicher Strukturen (Konformation) bedingen. Als entscheidender Parameter bestimmt neben der Länge die Konformation eines Fragments ihr Laufverhalten in der Elektrophorese. Veränderungen der Primärsequenz eines Allels verursachen Konformationsänderungen, die sich als aberrante Banden (Shift) neben den Wildtyp-Banden darstellen. Unter optimierten Bedingungen bezüglich Temperatur und Zusammensetzung des Polyacrylamidgels können schon singuläre Basensubstitutionen detektiert werden (Orita et al., 1989). Diese hohe Sensitivität lässt sich allerdings nur mit Fragmentgrößen von unter 300 bp erreichen (Michaud et al., 1992; Savov et al., 1992; Sheffield et al., 1993). Zur Analyse wurde der translatierte Bereich der p75^{NTR}-Sequenz in neun Fragmente unterteilt. Jedes Fragment wurde amplifiziert und unter zwei verschiedenen Bedingungen analysiert. Beim Auftreten von aberranten Bandenmustern wurde zur weiteren Abklärung eine

Sequenzierung des entsprechenden Fragments durchgeführt. Eine Übersicht über die verwendeten Primersequenzen sowie die PCR- und Gelbedingungen zeigt Tabelle 3. Abbildung 6 zeigt eine schematische Übersicht des untersuchten $p75^{NTR}$ Gens und dessen Unterteilung in die neun Fragmente.

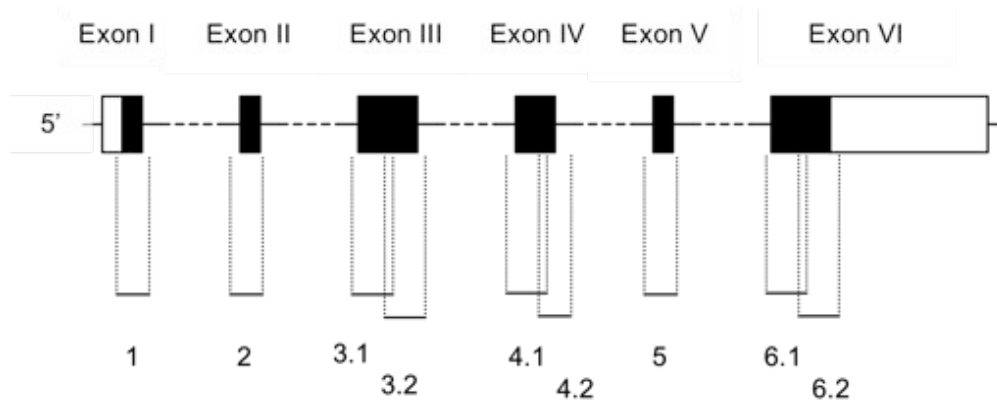


Abbildung 6: $p75^{NTR}$ -Genstruktur mit Darstellung der für die SSCP-Analyse amplifizierten PCR-Fragmente

| <u>Exon</u> | <u>Primer-Sequenz</u> | <u>Länge</u> | <u>PCR-Bedingung</u> | <u>Gelbedingungen</u> (AA:BAA, AA-Konzentration) |
|-------------|--|--------------|---|--|
| 1 | Forward: 5'-AAAGCGGACCGAGCTGGAAG-3' Reverse: 5'-TCTCGGAGTTCTGATCCCGG-3' | 165 bp | 1,5 mM MgCl ₂ , DMSO, (Invitrogen), 34 x (95°x35 s / 60°x40 s / 72°x40 s) | 1:49, 14 %, 5 % Glycerol 1:79, 14% Temperatur: 4°C |
| 2 | Forward: 5'-AGTCTGACCCTCCGATCTCC-3' Reverse: 5'-TTCTTCTCCCCTCCTCCTGC-3' | 210 bp | 1,0 mM MgCl ₂ , DMSO, (Invitrogen), 34 x (95°x35 s / 58°x40 s / 72°x40 s) | 1:79, 14 % 1:49, 10 % Temperatur: 22°C |
| 3.1 | Forward: 5'-AAATCTGGTGTCCGCTGCGC-3' Reverse: 5'-GTTGGCCTCGTCGGAATACG-3' | 293 bp | 1,5 mM MgCl ₂ , (Invitrogen), 34 x (95°x35 s / 54°x40 s / 72°x40 s) | 1:49, 14 %, 5 % Glycerol 1:79, 14 % Temperatur: 22°C |

| <u>Exon</u> | <u>Primer-Sequenz</u> | <u>Länge</u> | <u>PCR-Bedingung</u> | <u>Gelbedingungen</u> (AA:BAA, AA-Konzentration) |
|-------------|---|--------------|---|---|
| 3.2 | Forward: 5'-TGCCAGGACAAGCAGAACAC-3' | 221 bp | 1,5 mM MgCl ₂ (Roche), 34 x (95°x35 s / 56°x40 s / 72°x40 s) | 1:29, 10 % |
| | Reverse: 5'-CCCCGAACCGCACTCAC-3' | | | 1:29, 10 %, 5 % Glycerol Temperatur: 22 °C |
| 4.1 | Forward: 5'-ACTCCTGTGGCCTTTTCTCC-3' | 218 bp | 1,0 mM MgCl ₂ , DMSO, (Invitrogen), 34 x (95°x35 s / 52°x40 s / 72°x40 s) | 1:79, 14 % |
| | Reverse: 5'-AGACAGGGATGAGGTTGTCG-3' | | | 1:29, 10 % Temperatur: 22 °C |
| 4.2 | Forward: 5'-TGTTGGTGACCACAGTGATGG-3' | 182 bp | 1,5 mM MgCl ₂ (Roche), 34 x (95°x35 s / 54°x40 s / 72°x40 s) | 1:49, 14 %, 5 % Glycerol |
| | Reverse: 5'-CCTTGAGGGCAAACATCTCC-3' | | | 1:29, 10%, 5 % Glycerol Temperatur: 22 °C |
| 5 | Forward: 5'-GATACTCAGCTGCATCGGCC-3' | 278 bp | 1,5 mM MgCl ₂ (Roche), 34 x (95°x35 s / 61°x40 s / 72°x40 s) | 1:79, 14 % |
| | Reverse: 5'-GTTTCCTCAGCCTCAGCTCC-3' | | | 1:29, 10 % Temperatur: 22 °C |
| 6.1 | Forward: 5'-AGGACCTGACTCTCCTCTGG-3' | 192 bp | 1,0 mM MgCl ₂ , DMSO, (Invitrogen), 34 x (95°x35 s / 54°x40 s / 72°x40 s) | 1:29, 10 % |
| | Reverse: 5'-GCAGGCCTCATGGGTAAAGG-3' | | | 1:29, 10 %, 5 % Glycerol Temperatur: 4 °C |
| 6.2 | Forward: 5'-CTACCAGCCCGAGCACATAG-3' | 229 bp | 1,5 mM MgCl ₂ , DMSO, (Invitrogen), 34 x (95°x35 s / 58°x40 s / 72°x40 s) | 1:79, 14 % |
| | Reverse: 5'-TCGGTTGTCCGAATGTGGGG-3' | | | 1:29, 10 % Temperatur: 22 °C |

Table 3: Informationen zu den Sequenzen und PCR-Bedingungen der in der SSCP-Analyse des p75^{NTR}-Gens verwendeten Primer. AA, Acrylamid; BAA, Bisacrylamid

Material

Gelstocklösung: (Beispiel für 10 %-iges Gel, Vernetzung 1:29)

48,34 ml Acrylamid, 40 % (Life Technologies)

33,34 ml Bisacrylamid, 2 % (Life Technologies)

| | | |
|--------------------------|-----------------------|----------|
| 10 ml | 10 x TBE (siehe oben) | |
| ad 200 ml | aqua bidest. | |
| evtl. 10 % | Glycerol | (Roth) |
| auf 20ml Gelstocklösung: | 200 µl APS, 20 % | (Sigma) |
| | 20 µl TEMED | (Biorad) |

SSCP-Ladepuffer:

| | | |
|--------|-----------------------|--------------------|
| 90 % | Formamid | (Sigma) |
| 10 % | 10 x TBE (siehe oben) | |
| 0,01 % | SDS | (ICN LabSolutions) |
| 1 mM | EDTA | (Sigma) |
| 0,25 % | Bromphenolblau | (Merck) |
| 0,25 % | Xylencyanol | (Merck) |
| 0,06 M | NaOH | (Merck) |

SSCP-Laufpuffer: 0,5 x TBE

Durchführung

Die PCR-Produkte der verschiedenen Fragmente (sämtliche Reaktionen erfolgten in einer PCR-Maschine der Firma Biometra) wurden mit SSCP-Ladepuffer versetzt, bei 94 °C für 5 min denaturiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie auf die Polyacrylamidgele geladen. Die Gelelektrophorese wurde bei 60 V (80 V bei 4 °C) für etwa 16 h bei den in der Tabelle angegebenen Temperaturen durchgeführt. Anschließend wurden die DNA-Banden durch Silberfärbung sichtbar gemacht (Kapitel 3.9.2). Aberrantes Laufverhalten wurde im Vergleich zu korrespondierendem Normalgewebe in einem Wiederholungsexperiment verifiziert, die Banden aus diesen Gelen wurden vor dem Trocknen ausgeschnitten.

3.10.1 Isolierung von DNA aus aberranten Banden

Für die Sequenzanalyse der DNA auffälliger Banden wurde aus den zuvor ausgeschnittenen Banden die DNA eluiert. Nach einer anschließenden Aufreinigung diente die extrahierte DNA als Matrize für eine Reamplifikation.

MaterialDNA-Elutionspuffer:

| | |
|-----------------------|--------------------|
| 0,5 M Ammoniumacetat | (Sigma) |
| 10 mM Magnesiumacetat | (Sigma) |
| 1 mM EDTA | (Sigma) |
| 0,1 % SDS | (ICN LabSolutions) |

Durchführung

Die ausgeschnittenen Banden wurden mit je 50 µl des DNA-Elutionspuffers versetzt und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Nach dem Entfernen des Gels wurde die DNA aus dem Eluat mit 125 µl Ethanol (100 %) gefällt und bei 4 °C für 30 min bei 10000 g pelletiert. In 125 µl Ethanol (70%) resuspendiert erfolgte die erneute Pelletierung, sowie die Aufnahme in 10 µl aqua bidest. Eine Reamplifikation erfolgte unter dem Einsatz von 1 µl des gewonnenen Eluats.

3.10.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Entfernung der in der Reamplifikationsreaktion eingesetzten Primer, Salze und überschüssiger Nukleotide sowie der Taq Polymerase erfolgte eine Aufreinigung der PCR-Produkte.

Material

| | |
|--|----------|
| QIAquick-spin PCR Purification Kit 250 | (Qiagen) |
|--|----------|

Durchführung

Die Durchführung erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die im letzten Schritt in aqua bidest. eluierte, gereinigte DNA konnte nach Abschätzung der Konzentration des Eluats mittels Vergleich mit einem Längenstandard bekannter Konzentration direkt in die Sequenzierreaktion eingesetzt werden.

3.10.3 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung von Fragmenten mit aberrantem Laufverhalten im SSCP-Gel erfolgte nach der enzymatischen Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977). Hierbei dienen den normalen Nukleotiden zugesetzte 2',3'-Dideoxynukleotide (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) als Fluoreszenz-markierte Terminatoren einer linearen Amplifikationsreaktion. Auf diese Weise entstehen Kettenabbrüche in allen möglichen Positionen der zu analysierenden Sequenz. Das

Produkt der beschriebenen Sequenzierreaktion wird auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Durch die Kopplung der Terminatoren mit Fluoreszenzen unterschiedlicher Farbe lassen sich diese in jedem Fragment spezifisch bestimmen. In einem Chromatogramm lässt sich die Sequenz anschließend abbilden.

Material

PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit
(PerkinElmer)

Sequenzierreaktion

| | |
|----------|-------------------|
| 2 µl | Terminator Premix |
| 20 ng | Template |
| 1,6 pmol | Primer |
| ad 10 µl | aqua bidest. |

6 %-iges Sequenziergel

| | | |
|--------------------------------|--|---------------------|
| 30 g | Harnstoff | (Sigma) |
| 9 ml | Acrylamid-Stammlösung, 40 % | (Life Technologies) |
| 6 ml | 10 x TBE (siehe oben) | |
| 23,5 ml | aqua bidest. | |
| Induktoren der Polymerisation: | | |
| 180 µl | APS, 20 % | (Sigma) |
| 24 µl | TEMED | (Biorad) |
| Laufpuffer: | 1 x TBE | |
| Ladepuffer (4:1): | Formamid (98 %) : EDTA (50 mM, pH 8,0) | |

Durchführung

Die Sequenzierreaktion wurde auf dem Gene Amp 9600 Thermocycler der Firma PerkinElmer wie folgt durchgeführt: Initiale Denaturierung bei 96 °C für 2 min, 25 Zyklen des Programms (Denaturierung bei 96 °C für 10 s, Alignment bei 50 °C für 10 s, Extension bei 60 °C für 4 min). Im Anschluß an die Sequenzierreaktion wurde die Probe mit 0,1 Vol 3 M NaAc (pH 5,3) und 2,5 Vol Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Es folgten ein Waschvorgang mit 70 %-igem Ethanol und die Vakuumtrocknung. Anschließend wurde das Pellet in 4 µl Ladepuffer aufgenommen. Nach der Hitzedenaturierung bei 94 °C für 2 min wurde die Probe auf Eis gestellt und

umgehend auf 6 %-ige Polyacrylamidgele des Sequenzierers geladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 2500 V, 40 mA und 30 W für 8-10 h. Die Daten wurden mit Hilfe der Programme „Data Collection“ (Version 1.2.0) und „Data Analysis“ (Version D1.7.1) der Firma Applied Biosystems prozessiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software „Sequence Editor 1.0.3“ derselben Firma.

3.11 Epigenetische Analyse der $p75^{NTR}$ -Promotorregion

Veränderungen des Epigenoms im Sinne eines veränderten Methylierungsstatus von regulativen DNA-Abschnitten wie Promotorbereichen können die transkriptionelle Aktivität eines Gens supprimieren oder auch erhöhen. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den CpG (Cytidin - Phosphorsäure - Guanin)-Inseln zu, in denen eine im Vergleich zum restlichen Genom erhöhte Frequenz der Dinukleotidabfolge Cytosin-Guanin (5'-CpG-3') auftritt. Während die Cytosine solcher Dinukleotidabfolgen (CpG-Orte) außerhalb der CpG-Inseln meist eine palindromische Methylierung aufweisen, entziehen sie sich innerhalb dieser Regionen einer solchen. Nach dem Protokoll von Herman und Baylin (Herman et al., 1996) lassen sich Veränderungen im Methylierungsmuster eines Genoms darstellen. Zu Grunde liegt dieser Methode die Natriumbisulfitbehandlung genomischer DNA von Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe. Die Behandlung einzelsträngig vorliegender DNA mit Natriumbisulfit führt zu einer chemischen Konversion von unmethylierten Cytosin in Uracil. Methylierte Cytosine hingegen entgehen dieser Modifikation. Über die anschließende Amplifikation der DNA, Klonierung und Sequenzierung einer repräsentativen Zahl von Einzelklonen kann eine statistische Aussage über den Methylierungsstatus beider Allele eines genomischen Abschnitts getroffen werden. Zwei repräsentative Regionen des Promotorbereichs mit Häufungen von CpG-Sequenzen wurden ausgewählt. Die analysierten Regionen des $p75^{NTR}$ -Gens lagen im 5'-Bereich des Transkriptionsstarts, sowie dem angrenzenden Exon I (Basen – 335 bis –158 und Basen –38 bis +188). Zur Orientierung gibt Abbildung 7 einen Überblick über den ausgewählten Bereich.



Abbildung 7: Schematische Darstellung des Exon 1 sowie des angrenzenden 5'-Bereiches des *p75^{NTR}*-Gens. Die Fragmente A (cDNA-Position: -350 bis -158) und B (cDNA-Position: -38 bis 188) werden mittels Natrium Bisulfit Sequenzierung hinsichtlich Ihres CpG-Methylierungsstatus untersucht.

3.11.1 Natrium-Bisulfit-Behandlung von DNA

Insgesamt wurden 9 DNA Proben bisulfitmodifiziert, darunter 3 klassische Medulloblastome (D1165, D1177, D1346), 3 desmoplastische Tumoren (D810, D849, D1144) sowie 3 fetale Cerebella (D1339, D1583, D1601).

Material

Qiagen EpiTect Bisulfite Kit

(Qiagen)

Durchführung

Gemäß dem Protokoll der Firma Qiagen erfolgte die Bisulfitbehandlung der oben aufgeführten DNA-Proben.

3.11.2 Bisulfit-PCR

Die Amplifikation der Ziel-Abschnitte erfolgte unter den in Tabelle 4 angegebenen Konditionen mit den PCR-Reagenzien der Firma Solis BioDyne gemäß dem Protokoll aus dem Kapitel 3.7 auf einem Thermocycler der Firma Biometra.

| Fragment | Primer-Sequenz | Länge | PCR-Bedingung |
|----------------------|---|--------|--|
| A (-350 bis -158) | Forward: 5'-GATGGGTAAGAGAGTGAATTT-3' | 174 bp | 0,8 mM MgCl ₂ , 40 x (95°x60 s / 54°x60 s / 72°x60 s) |
| | Reverse: 5'-TCCCTACCTTATCCCTTAAAA-3' | | |

| <u>Fragment</u> | <u>Primer-Sequenz</u> | <u>Länge</u> | <u>PCR-Bedingung</u> |
|----------------------------|--|--------------|---|
| B (-38 bis +188) | Forward: 5'-GTAGTATTGGTTTTATTTAGTTTT-3' | 226 bp | 0,8 mM MgCl ₂ , 40 x (95°x60 s / 51°x60 s / 72°x60 s) |
| | Reverse: 5'-CAAAAACAACAACAACAACAAA-3' | | |

Tabelle 4: Informationen über die Sequenzen und PCR-Bedingungen der verwendeten Primer

3.11.3 Re-Isolierung der Fragmente

Die Re-Isolierung diente der Purifikation und Anreicherung von spezifischen PCR-Produkten unter Ausschluß von Polymerase- und Primerrückständen.

Material

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

Durchführung

Je 20 µl der PCR-Produkte (siehe Kapitel 3.11.2) wurden mit 6 µl eines sechsfach konzentrierten Ladepuffers auf einem 3 %igen Agarosegel (Biozym) elektrophoretisch getrennt. Die spezifischen Banden wurden anhand des Längenstandards identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Nach dem Herstellerprotokoll des QIAquick Gel Extraction Kit wurde die DNA aus den extrahierten Banden isoliert und in 50 µl eluiert. Anschließend wurden die gewonnenen Eluate auf der Speed-Vac SC 110 (Savant) für 30 min auf der höchsten Trockenstufe eingedampft und in 5 µl H₂O aufgenommen, woraus je 1 µl, zusammen mit 1 µl 6 X Ladepuffer auf einem 3 %igen Agarosegel (LE GP Agarose) zur Qualitätskontrolle aufgetragen wurde.

3.11.4 TOPO-Klonierung der PCR-Fragmente

Die Klonierung der Fragmente ermöglichte eine Optimierung der Sequenzierqualität und die statistische Auswertung der Ergebnisse.

Material

TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)

LB-Medium

10 g Trypton (Difco)

| | |
|------------------------------------|---------|
| 5 g Hefeextrakt | (Difco) |
| 5 g NaCl | (Merck) |
| 1 ml 1 N NaOH | |
| ad 1 l aqua bidest., autoklavieren | |

| | |
|----------------|--------------|
| LB Agarplatten | (Invitrogen) |
| Glycerol | (Sigma) |

Durchführung

Entsprechend der Konzentrationen wurden je 1-2 µl der Re-Isolate aus 2.6.3. in die Ligationenreaktion eingesetzt. Die chemische Ligation des PCR-Produktes in den TOPO-Vektor erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Die Transformation der chemisch kompetenten TOP 10 *Escherichia Coli* Bakterien folgte ebenfalls dem Herstellerprotokoll gefolgt. Die Bakterien wurden im Anschluss auf Ampicillin-haltige LB-Selektionsagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Klone wurden mit einem autoklavierten Zahnstocher in 50 µl LB-Medium übernommen und für 2 h bei 37 °C aufgeschüttelt. Nach der Anlage eines 5 %-igen Glycerolstocks der übernommenen Klone wurde dieser bei -80 °C konserviert.

3.11.5 Bisulfit-Sequenzierung

Durch die Sequenzierung von klonierten Bisulfit-PCR-Produkten lässt sich eine Konversion von Cytosinen zu Uracil bzw. die Nicht-Konversion im Methylierungsfall nachweisen.

Material

| | |
|----------------------------|--------|
| 96-Loch LB-Agarstichplatte | (GATC) |
|----------------------------|--------|

Durchführung

Aus den bei -80 °C gefrorenen Glycerolstocks der Klone wurden mit einem autoklavierten Zahnstocher LB-Platten angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Angewachsene Klone wurden in eine 96-Loch-LB-Agarstichplatte überführt und durch die Firma GATC mittels der Methode nach Sanger analysiert (Sanger et al.,

1977). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Software Biq Analyzer (Bock et al., 2005).

3.12 Isolierung von RNA

Zelluläre Total-RNA wurde mit Trizol-Reagenz nach dem Protokoll des Herstellers Life Technologies isoliert. Um eine Kontamination mit Resten genomischer DNA auszuschließen, wurde im Anschluss an die Isolierung ein Verdau der residualen DNA durchgeführt.

Material

RNA-Isolierung

| | |
|--|---------------------|
| Trizol-Reagenz | (Life Technologies) |
| Chloroform | (Merck) |
| Isopropanol | (KMF) |
| Ethanol (75 %) | (KMF) |
| DEPC-behandeltes Wasser | (Sigma) |
| (0,1 % DEPC, 2 h. bei 37 °C inkubieren, autoklavieren) | |

DNase Verdau

| | |
|-------------------------------|-----------|
| DNase I, RNase-frei (10 U/µl) | (Roche) |
| 10 x DNase-Puffer | (Roche) |
| RNasin (40 U/µl) | (Promega) |

Durchführung

Das tiefgefroren gelagerte Tumormaterial wurde mit dem Kryostaten in 10 µm dicke Schnitte raspelt, in 750 µl Trizol-Reagenz suspendiert und homogenisiert. Für die Isolierung von RNA aus Zelllinien wurden Zellpellets in dem gleichen Volumen suspendiert. Anschließend wurden 150 µl Chloroform zugegeben, die Proben wurden geschüttelt und für 15 min bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert. Die RNA-haltige obere, wässrige Phase wurde entnommen und die RNA mit 250 µl Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA und Protein enthaltende untere Phase wurde entfernt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Es erfolgte dann für 10 min bei 4 °C eine weitere Zentrifugation bei 12000 g. Nach Verwerfen des Überstands wurde das RNA-Pellet mit 75 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet

und in 24 µl DEPC behandeltem aqua bidest. resuspendiert. Zum DNase-Verdau wurde die RNA-Lösung jeweils mit 3 µl DNase-Puffer, 2 µl RNasin und 1 µl DNase I versetzt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung der DNase wurde eine weitere Trizol-Extraktion wie oben beschrieben durchgeführt. Die RNA wurde hierbei in 30 µl DEPC-behandeltem aqua bidest. suspendiert. Konzentration und Reinheit der RNA wurden bei 260 nm und 280 nm auf einem Spektralphotometer bestimmt. Die extrahierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.13 Synthese von cDNA - reverse Transkription

Mit der reversen Transkription lässt sich RNA in eine DNA-Kopie (cDNA) umschreiben. Dabei binden zufällig zusammengesetzte Hexamer an die isolierte mRNA. Das Enzym Reverse Transkriptase ergänzt die komplementären Hexamer durch Nukleotideinbau zur vollständigen cDNA. Dabei bildet die entstandene cDNA die Gesamtheit aller RNAs ab.

Material

SuperScript™ Preamplification System (Invitrogen)

Durchführung

Die RNA wurde mit dem *SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis* (Life Technologies) gemäß den Anweisungen des Herstellers revers transkribiert. 250-500 ng RNA wurden mit 1 µl Zufallsprimer (random hexamer; 50 ng/ml) versetzt und das Gesamtvolumen wurde mit DEPC-behandeltem aqua bidest. auf 12 µl ergänzt. Auf eine 10-minütige Inkubation bei 70 °C und anschließendes Abkühlen auf Eis folgte die reverse Transkription. Dazu wurden nach dem Protokoll von Life Technologies 10x-PCR-Puffer, MgCl₂, dNTP-Mix, DTT und 0,7 µl reverse Transkriptase (200 U/ml) zugegeben. Auf eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation bei 42 °C für 50 min. Die Reaktion wurde durch 15-minütiges Erhitzen auf 70 °C beendet, die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.14 Kompetitive RT-PCR zur Quantifizierung von Gentranskripten

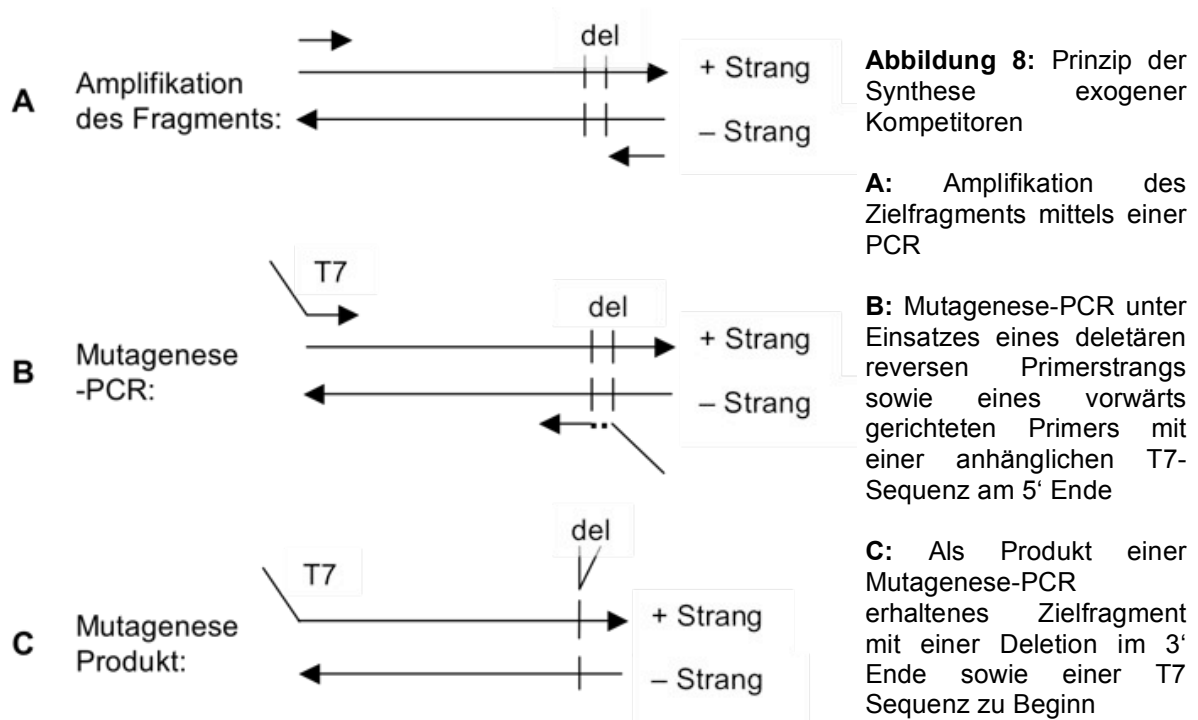
Zur semiquantitativen Bestimmung der Expression von *p75^{NTR}* wurde eine kompetitive RT-PCR durchgeführt. Die cRT-PCR besitzt eine hohe Sensitivität zur Detektion geringer mRNA-Mengen. Zu Grunde liegt der Einsatz exogener, zu den

Zielgenen sequenz-homologer RNA-Kompetitoren. Die Kompetitoren weisen eine 10-20 Basen umfassende interne Deletion auf, die sie in einer Elektrophorese von den Zielgenen unterscheidbar machen, und werden zusammen mit der gesamtzellulären RNA in verschiedenen Titrationsstufen revers transkribiert. Die Zugabe definierter Mengen der Kompetitoren sowie der zellulären RNA zur reversen Transkription erlaubt über die Analyse des Verhältnisses RT-PCR-Produkte (Ziel-RNA) / RT-PCR-Produkt (Kompetitor-RNA) einen Rückschluss auf die mRNA Menge eines Zielgens (Waha et al., 1998).

Zusätzlich wurde eine Messung eines konstant exprimierten Housekeeping-Gens durchgeführt. Housekeeping-Gene kodieren häufig Proteine zellulärer Stoffwechselprozesse, für unsere Messung haben wir uns für das etablierte Gen der Aminolävulinat-Synthase (ALAS) als Referenz verwendet (Bishop et al., 1990). Als Kontrolle für die Qualität und Menge der eingesetzten zellulären RNA sowie der Effizienz der reversen Transkription wurden sämtliche Daten zur Erfassung der Zielgene mit diesen Werten verrechnet, um Vergleichbarkeit zwischen den Proben zu sichern.

3.14.1 Synthese exogener Kompetitor-RNA-Moleküle

Die Synthese der deletierten RNA-Kompetitoren erfolgt aus PCR-Amplifikaten von cDNAs der entsprechenden Ziel- und Housekeeping-Gene. Zu ihrer Herstellung wurde die Addition des T7 Promotors und die Mutagenese in einem PCR-Schritt vollzogen. Die T7 Sequenz dient dabei der folgenden Transkription als Promotor. Zur T7-Addition ist dem 5'-Ende des Forward-Primers eine solche Promoter-Sequenz angefügt, welche mit amplifiziert wird. Die Mutagenese erfolgt durch den Einsatz eines modifiziertem Reverse-Primers, welcher den zu deletierenden Bereich in seiner Sequenz auslöst. Das Prinzip der T7-Addition und Mutagenese gibt Abbildung 8 wieder.



Material

| | |
|--|-------------|
| QIAquick Gel-Extraction Kit | (Qiagen) |
| T7-RNA-Polymerase Kit | (Fermentas) |
| QIAquick-spin PCR-Purification Kit 250 | (Qiagen) |
| DNase I, RNase-frei (10 U/μl) | (Roche) |
| 10 x DNase-Puffer | (Roche) |
| RNasin (40 U/μl) | (Promega) |
| DEPC-behandeltes aqua bidest. | |

Durchführung

Aus verschiedenen Tumor- und Normalgeweben wurde ein cDNA Pool vorbereitet. Aus diesem wurden Exon-übergreifende Fragmente des verwendeten Housekeeping- und $p75^{NTR}$ -Gens amplifiziert. Zur Durchführung der PCR siehe Kapitel 3.7. Die jeweiligen Primersequenzen und -bedingungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die PCR-Produkte wurden auf 2%-ige Agarosegele aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und aus dem Gel ausgeschnitten. Mit dem QIAquick Gel-Extraction Kit wurden die Produkte gemäß dem Herstellerprotokoll aus den extrahierten Banden isoliert und aufgereinigt. Je 2 μl der extrahierten DNA wurden als Template die folgende T7-Additions und Mutagenese-PCR zu einem

Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt, und nach den in Tabelle 5 angegebenen Bedingungen amplifiziert. Für jedes Fragment wurden je drei der 20 µl PCR-Reaktionen durchgeführt und die Produkte zu einem Gesamtvolumen von 60 µl zusammengeführt. Der anschließenden Aufreinigung mit dem QIAquick-spin PCR-Purification Kit nach dem Herstellerprotokoll folgte die *in-vitro*-Transkription in einem Volumen von 40 µl mit je 2-3 µl der aufgereinigten T7-cDNA entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Residuelle cDNA wurde im Anschluss durch Zugabe von 100 U RNase-freier DNase I und 40 U RNasin in einem Reaktionsvolumen dem Vorgaben des Herstellers gemäß verdaut. Aufgereinigt mit RNeasy Quickspin-Säulen nach dem vorgegebenen Hersteller-Protokoll wurde die RNA in 30 µl DEPC-behandeltem Wasser eluiert und ihre Konzentration mittels Photospektrometrie bestimmt.

| <u>Gen</u> | <u>Primer-Sequenz</u> | <u>Länge</u> | <u>PCR-Bedingung</u> |
|--------------------------|---|--------------|--|
| <i>p75^{NTR}</i> | Forward: 5'-TGTGGTGACCACAGTGATGG-3' | 154 bp | 1,0 mM MgCl ₂ , (Invitrogen), 39 x (95°x35 s / 56°x40 s / 72°x40 s) |
| | Reverse: 5'-GTTCTGCTTGCAGCTGTTCC-3' | | |
| | Mutagenese-Primer: 5'-GTTCTGCTTGCAGCTGTTCCCT AGGCCACAAGGCCCAACC-3' | | |
| | T7-Primer: 5'- <u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGG</u> <u>GAGGTGTGGTGACCACAGTGATGG</u> -3' | | |
| | Forward: 5'-GACAGATGCTAATGGATGCC-3' | | |
| | Reverse: 5'-GGTAATTGATTGCTTGCACG-3' | | |
| <i>ALAS</i> | Mutagenese-Primer: 5'-GGTAATTGATTGCTTGCACGC TCATTAGTTCATCACAGAC-3' | 147 bp | 2,0 mM MgCl ₂ , (Invitrogen), 39 x (95°x35 s / 55°x40 s / 72°x40 s) |
| | T7-Primer: 5'- <u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGG</u> <u>GAGGGACAGATGCTAATGGATGCC</u> -3' | | |

Tabelle 5: Primer-Sequenzen und PCR-Bedingungen für die cRT-PCR

3.14.2 Semiquantitative RT-PCR

Zur Abschätzung nötiger Verdünnungsstufen der einzusetzenden Kompetitoren der Zielgene wurde zunächst eine serielle Verdünnungsreihe der Kompetitor-RNA mit einem Pool definierter Mengen gesamtzellulärer RNA aus verschiedenen Tumoren revers transkribiert. Zur Feststellung der optimalen Titration wurden die PCR-Reaktionen fluoreszierenden Primern durchgeführt und die Produkte auf einem halbautomatischen Sequenziergerät (ABI 373A, Applied Biosystems) quantifiziert. Diejenigen Verdünnungen wurden als optimal bewertet, bei der sich die Produkte der Kompetitor-RNA und die der Tumor-RNA quantitativ entsprachen. Um den optimalen Titrationspunkt wurde die zur Messung des Expressionsstatus vorgesehene serielle Verdünnungsreihe der Kompetitoren etabliert. Definierte Mengen RNA der zu untersuchenden Tumorproben, in Tabelle 6 gelistet, wurden in diese Verdünnungsreihe eingesetzt.

| <u>Tumor ID</u> | <u>Histologie</u> | <u>Tumor ID</u> | <u>Histologie</u> |
|-----------------|-------------------|-----------------|--------------------|
| D293 | CMB | D282 | DMB |
| D286 | CMB | D448 | DMB |
| D567 | CMB | D523 | DMB |
| D288 | CMB | D849 | DMB |
| D1173 | CMB | D1088 | DMB |
| D1759 | CMB | D1144 | DMB |
| D1165 | CMB | D1028 | DMB |
| D1103 | CMB | R 1626 | fetales Cerebellum |
| D1185 | CMB | R 1628 | fetales Cerebellum |

Tabelle 6: Probenkollektiv von Tumoren für die Analyse der p75^{NTR}-Expression

Material

6 %-iges Sequenziergel (siehe Kapitel 3.10.3)

Längenstandard

Internal Lane Standard 600

(Promega)

Durchführung

Einer Verdünnungsreihe der RNA-Kompetitoren von jeweils 50 ng bis 200 fg unter Zugabe von je 200 ng eines repräsentativen RNA-Pools wurde revers transkribiert (Kapitel 3.13). Die einzelnen Zielgene und ihre Kompetitoren wurden unter den in Tabelle 5 aufgeführten Bedingungen amplifiziert. Abweichend zur normalen PCR wurden sequenzhomologe fluoreszenzmarkierte Primer eingesetzt. Die Produkte wurden mit 10 µl Ladepuffer versetzt, für 4 min bei 94 °C denaturiert, auf Eis gestellt und auf einem 6 %-igen Sequenziergel elektrophoretisch getrennt. Die Elektrophorese sowie die optische Erfassung der Produkte erfolgte auf einem halbautomatischen Sequenziergerät (ABI 373A, Applied Biosystems). Die Auswertung wurde mit der entsprechenden Software („Genescan collection“ und „Genescan analysis“, Version 1.2.1, Applied Biosystems) durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 1500 V, 40 mA und 40 W für 1-2 h. Entsprechend der so abschätzbaren optimalen Menge der Kompetitoren wurde ein Gemisch der Kompetitor-RNAs hergestellt. Dazu wurden jeweils 50 ng beider Kompetitoren zusammengeführt. In einer Mikrotiterplatte wurde für jede zu analysierende Probe eine Verdünnungsreihe (T1-T7) des o.g. Gemisches der Kompetitor-RNA vorgelegt und mit jeweils 200 ng der einzelnen RNA-Extrakte, in Tabelle 6 aufgelistet, ergänzt. Diese Proben wurden wie oben beschrieben revers transkribiert, mit den jeweiligen fluoreszenzmarkierten Primern unter den in Tabelle 5 genannten Bedingungen amplifiziert und wie beschrieben auf einem 6 %-igen Sequenziergel analysiert.

3.14.3 Auswertung der Gene-Scan Rohdaten

Als Maß für die Quantität eines PCR-Produktes bestimmt das Sequenziergerät die Fluoreszenzintensität der farbmarkierten Primer, und stellt diese graphisch dar. Dabei entspricht das Integral der Kurve der Menge des PCR-Produktes und stellt auf diese Weise ein Maß für die mRNA-Quantität dar. Durch die Division des Tumor-Produkts des Zielgens durch das entsprechende Kompetitor-Produkt berechnet sich das individuelle Ausmaß der Gen-Expression. Als interne Kontrolle und zur Normalisierung auf das Expressionsniveau eines Housekeeping-Gens wurde der Quotient durch den entsprechenden Quotienten des „Housekeeping“-Gens *δ-Aminolävulinat-Synthase (ALAS)* dividiert. Dies geschieht unter der Prämisse, dass ein Housekeeper eine nahezu konstante Expression in den Tumor- und

Normalgewebeproben aufweist, d.h. keine differentielle Regulation vorliegt. Unter dieser Annahme beruhen Unterschiede zwischen individuellen Proben im Quotienten Patient/Standard für denselben Housekeeper auf unterschiedlichen RNA-Ausgangsmengen bzw. unterschiedlicher RNA-Qualität. Zusammenfassend wurden die Expressionswerte nach folgender Formel berechnet:

$$Expression \approx \frac{p75^{NTR}_{Tumor} / p75^{NTR}_{Kompetitor}}{ALAS_{Tumor} / ALAS_{Kompetitor}}$$

3.15 Duplex-PCR

Eine andere Methode zur Erfassung des Expressionsniveaus ist die Duplex-PCR. Dabei wird ein Ziel- und ein Housekeeping-Gen aus einer cDNA Probe synchron in einem gemeinsamen PCR-Ansatz Gen-amplifiziert. Als murines Housekeeping-Gen wurde murines *α-tubulin* verwendet, *β₂-Mikroglobulin* diene als humanes Referenzgen. Der Einsatz zweier Primerpaare erlaubt eine relative Analyse der Expression, jedoch keinen Rückschluss auf absolute mRNA-Mengen in der Probe. Voraussetzung für die Duplex-PCR ist die Möglichkeit, beide Produkte bei gleichen Konditionen amplifizieren zu können. Zudem muss die Amplifikation beider Produkte in der exponentiellen Phase einer PCR-Reaktion analysiert werden. Dazu wurde für jede durchgeführte Duplex-PCR die Konzentration der Primer, sowie die Zyklenzahl in diesem Sinne ausgetestet. Tabelle 7 zeigt die angewandten Duplex-PCRs sowie ihre Bedingungen.

| Zielgen | Primer | Länge | PCR-Bedingung |
|----------------------------------|--|--------|---|
| murines <i>p75^{NTR}</i> | Forward (10 pmol): 5'-TCCAGAGCGAGACCTCATAG-3' | 258 bp | 1,5 mM MgCl ₂ , DMSO, (Invitrogen), 33 x (95°x35 s / |
| | Reverse (10 pmol): 5'-TCGCTGTGCAGTTTCTCTCC-3' | | |
| murines <i>α-tubulin</i> | Forward (1 pmol): 5'-TGAGACAGGAGCTGGCAAGC-3' | 157 bp | 56°x40 s / 72°x40 s) |
| | Reverse (1 pmol): 5'-GCCACGAGCATAGTTATTGG-3' | | |

| | | | |
|------------------------------------|---|--------|---|
| <i>p75^{NTR}</i> | Forward (10 pmol): 5'-TGTGGTGACCACAGTGATGG-3' | 154 bp | 1,5 mM MgCl ₂ , (Roche), 31 x (95°x35 s / 56°x40 s / 72°x40 s) |
| | Reverse (10 pmol): 5'-GTTCTGCTTGCAGCTGTTCC-3' | | |
| <i>β₂-Mikroglobulin</i> | Forward (0,67 pmol): 5'-GCTACTCTCTCTTTCTGGCC-3' | 336 bp | |
| | Reverse (0,67 pmol): 5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3' | | |
| <i>TrkA</i> | Forward (10 pmol): 5'-TTTGAGTATATGCGGCACGG-3' | 281 bp | 1,5 mM MgCl ₂ , GC (Roche), 36 x (95°x35 s / 56°x40 s / 72°x40 s) |
| | Reverse (10 pmol): 5'-CGGTAATAGTCGGTGCTGTA-3' | | |
| <i>β₂-Mikroglobulin</i> | Forward (2 pmol): 5'-TGAGACAGGAGCTGGCAAGC-3' | 148 bp | |
| | Reverse (2 pmol): 5'- GATGCTGCTTACATGTCTCG -3' | | |
| <i>TrkB</i> | Forward (10 pmol): 5'-TAGGAAACATTTCCGTCACC-3' | 177 bp | 1,5 mM MgCl ₂ , (Invitrogen), 38 x (95°x35 s / 57°x40 s / 72°x40 s) |
| | Reverse (10 pmol): 5'-TTGGGTATCTGCAGGTTTGC-3' | | |
| <i>β₂-Mikroglobulin</i> | Forward (2 pmol): 5'-TGAGACAGGAGCTGGCAAGC-3' | 148 bp | |
| | Reverse (2 pmol): 5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3' | | |
| <i>TrkC</i> | Forward (10 pmol): 5'-GACTATCCAGTCCACATCAGGAAGG-3' | 138 bp | 1,5 mM MgCl ₂ , (Roche), 30 x (95°x35 s / 56°x40 s / 72°x40 s) |
| | Reverse (10 pmol): 5'-TTCCGCATGAACATCAGTCAGTGTG-3' | | |
| <i>β₂-Mikroglobulin</i> | Forward (2 pmol): 5'-GCTACTCTCTCTTTCTGGCC-3' | 336 bp | |
| | Reverse (2 pmol): 5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3' | | |

Tabelle 7: Primer-Sequenzen und PCR-Bedingungen der Duplex-PCRs

Durchführung

Die PCR-Reaktion wurde entsprechend Kapitel 3.7 durchgeführt. Abweichend wurde der Reaktion neben dem Zielgen- ein Housekeeping-Primerpaar entsprechend der Menge aus Tabelle 7 zugesetzt.

3.15.1 Photometrische Auswertung der Duplex-PCR

Die Intensität zweier Banden lässt sich mit der Software ImageJ quantitativ in Beziehung setzen. ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) ist ein Public Domain Java Programm zur Bildverarbeitung und –analyse. Das Programm erfasst das Helligkeitsprofil einer Fläche definierter Größe. Unter Ausschluss der Leuchtintensität des Hintergrunds lässt sich das Integral des Helligkeitsprofils in eine Zahl umsetzen. Werden beide Banden einer Duplex-PCR auf diese Weise erfasst, lassen sich diese in ein Verhältnis setzen.

3.16 Immunhistochemie

Immunhistochemisch lassen sich mit spezifischen Antikörpern Proteine im Gewebe visualisieren. Ein solcher Nachweis von Proteinen beruht auf der Affinität zwischen dem Antikörpern und strukturellen Eigenschaften (Epitope) von Proteinen. Dabei ist ein primärer Antikörper gegen das Epitop gerichtet, während ein sekundärer, markierter (z.B. fluoreszierender) Antikörper, gegen den primären Antikörper gerichtet ist, und den gebildeten Komplex sichtbar macht. Die Detektierung der Fluoreszenz-Emission erfolgt bei gleichzeitiger Anregung durch Licht einer definierten Wellenlänge auf einem Fluoreszenzmikroskop. Der hier verwendete primäre Antikörper stammt aus dem Kaninchen und ist gegen murines p75^{NTR} gerichtet. Durch den sekundären, unspezifisch IgG Antikörper des Kaninchen bindenden Antikörper aus der Ziege erfolgt die Detektierung des murinen p75^{NTR}. Dazu ist der sekundäre Antikörper mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy2 konjugiert, und erscheint bei einer Anregung durch Licht der Wellenlänge 492 nm grün. Zur Darstellung der histologischen Architektur erfolgte eine Gegenfärbung mit dem nukleären Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), der bei einer Anregung im Bereich von 358 nm blau erscheint.

Material

| | |
|-----------------------------------|------------------|
| Xylol | (Riedel de Häen) |
| Ethanol (100 %, 90 %, 70 %, 50 %) | (Riedel de Häen) |

Blockierlösung

| | |
|---------------------------|------------|
| 5 % normales Ziegen Serum | (DAKO) |
| 0,1 % Triton X-100 | (Sigma) |
| 1 x PBS | (Biochrom) |

primäre Antikörperlösung (1:1000)

| | |
|---|--------------------------|
| Blockierlösung | (siehe oben) |
| polyklonaler Kaninchen Anti-Maus p75 ^{NTR} -Antikörper | (Chemicon International) |

sekundäre Antikörperlösung (1:100)

| | |
|---|---|
| Blockierlösung | (siehe oben) |
| Cy TM 2-konjugierter Ziege Anti-Kaninchen-IgG Antikörper | (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) |
| 4',6-Diamidino-2-phenylindol (1 µg / ml) | (Invitrogen) |

Durchführung

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der Leerschnitte. Dazu wurden diese nach einer initialen Inkubation in Xylol in einer absteigenden Alkohohlreihe (100 %, 100 %, 90 %, 90 %, 70 %, 50 %) jeweils 5 min inkubiert, und für 60 min bei Raumtemperatur in der Blockierlösung belassen. Daraufhin erfolgte eine 18 stündige Inkubation in der primären Antikörperlösung bei 4 °C. Diese wurde durch dreimaliges Spülen mit PBS, und zweimaliges Spülen mit der Blockierlösung entfernt. Die anschließende Inkubation mit dem Sekundärantikörper fand für 2 h bei Raumtemperatur statt, und wurde durch zweimaliges Spülen mit PBS beendet. Für die Gegenfärbung wurden die Schnitte in 4',6-Diamidino-2-phenylindol-Lösung für 10 min inkubiert und zweimalig in PBS gespült. Anschließend wurden die Schnitte mit 24 x 24 mm großen Deckgläschen unter Verwendung von wasserlöslichem Eindeckmedium eingedeckelt.

3.17 Kultivierung und Passagierung der Zelllinie D283MED

Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt in sterilen, 25 cm² Kulturflaschen der Firma Corning. Bei einer 70-80 %igen Konfluenz der adhären wachsenden Zellen erfolgte die Passagierung der Zellen und eine optionale Subkultivierung.

Material

PBS (37 °C) (Gibco / Invitrogen)

Trypsin / EDTA Lösung (37 °C)

Trypsin (0,1 %) (Invitrogen)

EDTA (1,06 mM) (Sigma)

PBS (Biochrom)

Zellmedium

RPMI 1640 (Invitrogen)

fetales Kälberserum (10 %) (Invitrogen)

Durchführung

Nach der Entfernung des Mediums wurden die adhären Zellen mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml Trypsin / EDTA Lösung und 20 minütiger Reinkubation bei 37 °C wurden die ko- und adhäsiven Bindungen gelöst. Die Zellen wurden anschließend in ein steriles Eppendorf-Röhrchen überführt, durch Zugabe von 5 ml frischen Mediums wurde die Trypsinwirkung inaktiviert. In einer Zentrifuge wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 3 min bei 900 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in frischem Medium resuspendiert. In individuellen Verdünnungen wurden die Zellen rekultiviert.

3.18 Präparation und Kultivierung muriner Körnerzellvorläufer

Die Isolierung muriner Körnerzellen erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Karl Schilling (Institut für Anatomie, Universität Bonn). Zur Herstellung wurden 8 Tage alte Abkömmlinge von weiblichen C57BL/6BOM und männlichen CH3 Mäusen verwendet (Mertz et al., 2002).

MaterialHanks MediumNaHCO₃ (4,17 mM)Na₂HPO₄ (0,7 mM)

pH 7,2

Trypsin / EDTA Lösung (siehe Kap. 2.12)Trypsin-Inhibitor Lösung

Trypsin-Inhibitor, Soybean (Invitrogen)

bovines Serum Albumin (Sigma)

PBS

Neurobasal Medium

serum-freies Neurobasal-Medium + B27 (Invitrogen)

L-Glutamin (2 mM) (Life Technologies)

L-Glutamat (25 µM) (Life Technologies)

Durchführung

Unter sterilen Konditionen wurden die Kleinhirne der Tiere in Hanks-Medium aufgenommen, die Meningen verworfen und für 20 min bei 37 °C in Trypsin inkubiert. Die Inaktivierung der Trypsinaktivität erfolgte durch die Zugabe eines doppelten Volumens des Trypsin-Inhibitors. Die entstandenen Gewebsfragmente wurden mit einer weitlumigen Plastikpipette dissoziiert und per Filtration durch ein Nylonnetz (Porengröße: 250 µm) vereinzelt. Die Zellen wurden in einem Zentrifugationsschritt (7 min, 1.000 g) sedimentiert und in Neurobasal Medium aufgenommen.

3.18.1 Inkubation muriner Körnerzellvorläufer mit Sonic Hedgehog**Material**

rekombinantes murines Sonic Hedgehog-Protein (R+D Systems)

Durchführung

Im Anschluss an die Präparation wurden die kultivierten Zellen in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen pro ml Neurobasalmedium (ohne B27 Supplement) zu je 3 ml in

poly-L-Lysin beschichtete 6-Loch Platten (Sigma) ausgebracht. Die Inkubation mit Sonic Hedgehog fand in einer Konzentration von 0,625 µg/ml für 7 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre statt.

3.19 Erstellung eines induzierbaren Zellsystem

Zur funktionellen Untersuchung des p75^{NTR} standen vier modifizierte Konstrukte des Gens zur Verfügung. Während das uns zur Verfügung gestellte Vollängen-p75^{NTR} Konstrukt (p75^{NTR}-FL) in einem pcDNA 3.1 Vektor (Invitrogen) vorlag, waren die deletären Varianten (p75^{NTR}-ΔICD und p75^{NTR}-ΔDD) in dem induzierbaren pIND/Hygro (Invitrogen) kloniert (freundlich zur Verfügung gestellt von C. Vincenz, University of Michigan Medical School). Die deletären Konstrukte befanden sich in den pIND/Hygro Vektoren jeweils zwischen den Schnittstellen Kpn I und Xba I der Multiple Cloning Site. Innerhalb des pcDNA 3.1 Vektors befand sich das p75^{NTR}-FL Konstrukt ebenfalls zwischen den oben genannten Schnittstellen. Abbildung 9 zeigt den Aufbau der verschiedenen Konstrukte. Eine Vereinheitlichung der verschiedenen Konstrukte hinsichtlich ihres Vektors im pIND/Hygro System ermöglichte vergleichende Untersuchungen sowie für alle Varianten die Etablierung stabiler, induzierbarer Zelllinien. Als Kontrolle wurde ein leerer pIND/Hygro Vektor ohne Insertion in der Multiple Cloning Site benötigt. Als Induktor des Zellsystems fungierte PonasteronA, ein Homolog des Insektenhormons Ecdyson, das an die fünfmal vorliegenden E/GREs (Ecdyson / Glucocorticoid Response Elements) des pIND Vektors bindet, und den folgenden Promotor PΔHSP (minimal heat shock promotor) aktiviert. Voraussetzend für diese Bindung ist die Co-Transfektion der Zellen mit einem pERV3 Vektor. Dieser stellt mit der konstitutiven Expression der beiden sich zu einem Heterodimer zusammenschließenden Rezeptoren EcR (Ecdyson Rezeptor) und RXR (Retinoid X Rezeptor) die Co-Faktoren der PonasteronA Bindung an E/GREs der pIND/Hygro Vektoren (No et al., 1996).

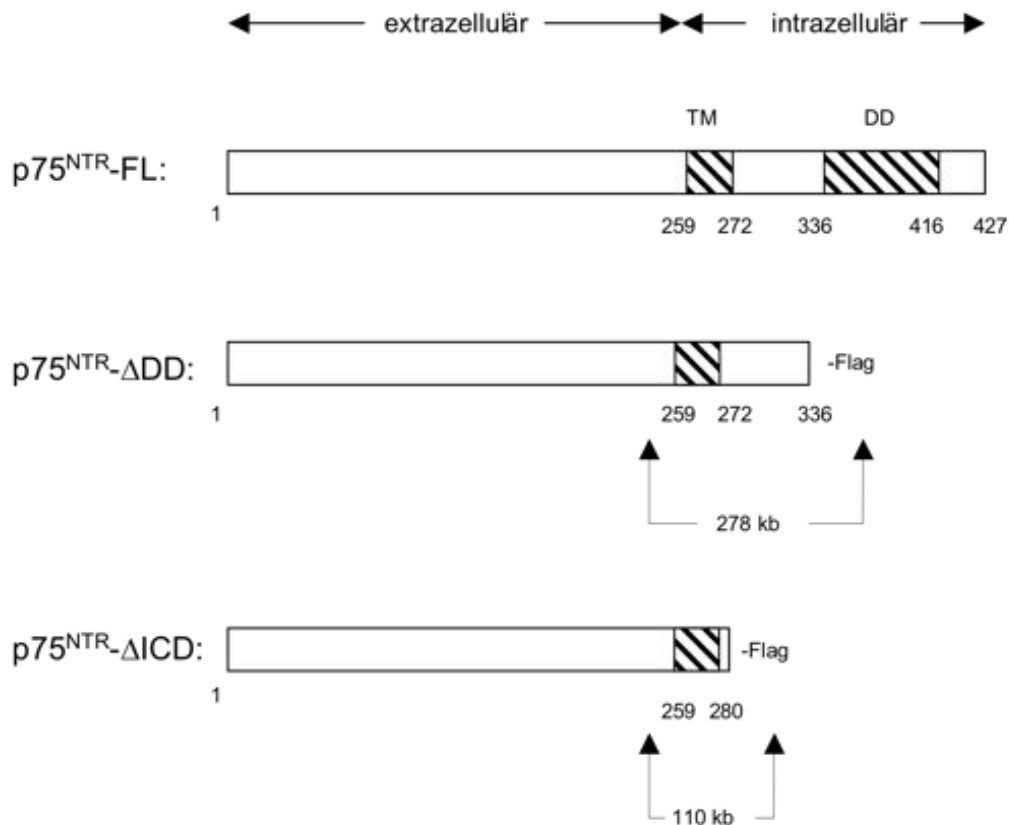


Abbildung 9: Schematische Darstellung des verwendeten Vektorsystems. Die Aminosäurepositionen sind markiert. Zwischen den Pfeilen ist die Länge des spezifischen eingeschlossenen PCR-Produkts angegeben.

3.19.1 Synthese eines pIND-Leervektors

Mit einem PmeI-Restriktionsverdau wurde das p75^{NTR}-ΔDD Konstrukt aus seinem pIND/Hygro Vektor entfernt. Die entstandenen versetzten („sticky“) Schnittenden wurden unter Ausschluss des herausgeschnittenen Konstruktes mit einem Ligationenzym religiert, und das entstandene Produkt kloniert. Das entstandene Produkt wurde durch zwei charakteristische Restriktionsverdau verifiziert.

1. PmeI-Restriktion

Material

| | | |
|-------|--|-------|
| 3 µl | Plasmid (pIND-p75 ^{NTR} -ΔDD, 1530 µg/µl) | |
| 2 µl | PmeI | (NEB) |
| 2 µl | 10 x Puffer | (NEB) |
| 23 µl | aqua bidest. | |

Durchführung

Der oben aufgeführte Restriktionsansatz wurde für 2 h bei 37° C inkubiert und anschließend mit 20 µl Lade-Puffer versetzt. Auf einem 1 %igen Agarosegel wurden der gesamte bei 120 V für 1 h elektrophoretisch getrennt. Die Bande des entstandenen Leervektors aus dem Agarosegel exzidiert.

2. Aufreinigung des Restriktionsproduktes

Material

QIAquick Gel-Extraction Kit (Qiagen)

Durchführung

Die exzidierten Banden wurden gemäß des Herstellerprotokolls aufgereinigt und in 20 µl aqua bidest. eluiert. Das Produkt wurde in der Folge erneut auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert.

3. Ligierung der „sticky-ends“

Material

8 µl DNA (Eluat aus 2.)
 1 µl T4 DNA Ligase (NEB)
 1 µl 10 x T4-Puffer (NEB)

Durchführung

Der Ligationsansatz wurde bei 16° für 16 h inkubiert.

4. Transformation

Material

TOP 10 *Escherichia coli* (Invitrogen)

LB-Medium:

siehe Kap. (topo klonierung bisulfit)

LB Agarplatten (Invitrogen)

Durchführung

Die Transformation der chemisch kompetenten TOP 10 *Escherichia Coli* Bakterien erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Die Bakterien wurden auf LB-Selektionsagarplatten (mit Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Klone wurden in 1 ml LB-Medium übernommen und für 6 h bei 37 °C aufgeschüttelt.

5. Präparation der Vektor-DNA mit dem Qiagen Plasmid-Mini-Kit

Material

Qiagen Plasmid-Mini-Kit (Qiagen)
aqua bidest.

Durchführung

Aus 900 µl der Bakteriensuspension aus 4. wurde entsprechend dem vorgegebenen Herstellerprotokoll die Vektor-DNA präpariert und in 20 µl aqua bidest. eluiert. 100 µl der Suspension wurden zuvor bei -80 °C konserviert, und später in die Qiagen Plasmid Midi Präparation eingesetzt.

6. Kontrolle durch PmeI und Rsa Restriktion

Material

| | |
|-----------------------------------|---|
| <u>PmeI-Restriktion pIND-Leer</u> | <u>PmeI-Restriktion pIND-p75^{NTR}ΔDD</u> |
| 3 µl Eluat (aus 5.) | 1 µl Plasmid (pIND-p75 ^{NTR} ΔDD) |
| 2 µl PmeI (NEB) | 2 µl PmeI (NEB) |
| 2 µl 10 x Puffer (NEB) | 2 µl 10 x Puffer (NEB) |
| 13 µl aqua bidest. | 15 µl aqua bidest. |
| | |
| <u>Rsa-Restriktion pIND-Leer</u> | <u>Rsa-Restriktion pIND-p75^{NTR}ΔDD</u> |
| 3 µl Eluat (aus 5.) | 1 µl Plasmid (pIND-p75 ^{NTR} ΔDD) |
| 2 µl Rsa (Fermentas) | 2 µl Rsa (Fermentas) |
| 2 µl 10 x Puffer (Fermentas) | 2 µl 10 x Puffer (Fermentas) |
| 13 µl aqua bidest. | 15 µl aqua bidest. |

Durchführung

Die beiden Restriktionsreaktionen wurden jeweils mit dem Produkt aus 5. sowie dem zur Verfügung gestelltem pIND-p75^{NTR}- Δ DD Vektor durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 2 h. Auf einem 1 %igen Agarosegel wurden je 20 μ l der Restriktionsprodukte mit 20 μ l Lade-Puffer versetzt, parallel zu den ungeschnittenen Plasmiden und zwei Längenstandards elektrophoretisch für 1 h bei 150 V getrennt. Die Verifizierung des Vektors erfolgte über eine Längenabschätzung des jeweiligen Schnittfragmentes.

7. Aufbereitung mit dem Qiagen-Midi-Kit

Material

Qiagen Plasmid-Midi-Kit (Qiagen)
aqua bidest.

LB-Medium:

siehe Kap. (topo klonierung bisulfit)

Durchführung

Zu 50 ml LB-Medium wurden 50 μ l der konservierten Bakteriensuspension aus 5. zugegeben. Die Bakterien wurden für 18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Aus den 50 ml wurde entsprechend dem Protokoll der Firma Qiagen die Vektor-DNA präpariert und in 100 μ l aqua bidest. eluiert.

3.19.2 Synthese eines pIND- p75^{NTR}-FL Vektors

Mit einem sequenziellen NheI und ApaI Restriktionsverdau wurde das p75^{NTR}-FL Fragment aus dem pcDNA 3.1 Vektor isoliert sowie der pIND-p75^{NTR}- Δ DD von seiner p75^{NTR}- Δ DD Insertion befreit. In dem linearisiert vorliegenden, leeren pIND Vektor wurde das p75-FL Fragment eingebracht und die Schnittstellen ligiert. Das entstandene Vektor-Produkt pIND-p75^{NTR}-FL wurde wie oben beschrieben aufgearbeitet und in seiner Identität durch ein charakteristisches Restriktionsmuster bestätigt.

1. Sequentielle NheI / KpaI-Restriktion

MaterialNheI-Restriktion pcDNA 3.1-p75^{NTR}-FL NheI-Restriktion pIND-p75^{NTR}- Δ DD

| | | | |
|------------|--------------------------------|------------|---------------------------------|
| 10 μ l | Plasmid (483 μ g/ μ l) | 3 μ l | Plasmid (1530 μ g/ μ l) |
| 3 μ l | NheI (NEB) | 3 μ l | NheI (NEB) |
| 4 μ l | 10 x Puffer (NEB) | 4 μ l | 10 x Puffer (NEB) |
| 23 μ l | aqua bidest. | 30 μ l | aqua bidest. |

Ammoniumacetat (0,5 M, ph 5,3) (Sigma)

Ethanol (100 %, 70 %) (KMF)

Apal-Restriktion pcDNA 3.1-p75^{NTR}-FL Apal-Restriktion pIND-p75^{NTR}- Δ DD

| | | | |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Pellet aus NheI-Restriktion | | Pellet aus NheI-Restriktion | |
| 3 μ l | Apal (Fermentas) | 3 μ l | Apal (Fermentas) |
| 4 μ l | 10 x Puffer (Fermentas) | 4 μ l | 10 x Puffer (Fermentas) |
| 0,4 μ l | BSA (NEB) | 0,4 μ l | BSA (NEB) |
| 32,6 μ l | aqua bidest. | 32,6 μ l | aqua bidest. |

Durchführung

Die NheI-Restriktionsansätze wurden für 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Präzipitierung der DNA wurden die Ansätzen nach einer Zugabe von je 4 μ l Ammoniumacetat und 100 μ l Ethanol (100 %) für 30 min bei -20 °C inkubiert und anschließend für 20 min bei 4 °C und 1800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet in Ethanol (70 %) erneut in Suspension gebracht und für 10 min bei 4 °C und 1800 g zentrifugiert. Nach erneuter Pelletierung der DNA und Resuspension wurde das Volumen zum oben beschriebenen Apal-Restriktionsansatz ergänzt, und für 2 h bei 25 °C inkubiert. Nach Zugabe von 40 μ l Lade-Puffer wurden die gesamten Restriktionsansätze auf einem 1 %igem Agarosegel bei 120 V für 1 h elektrophoretisch getrennt. Die Banden des isolierten p75^{NTR}-FL Fragments sowie des Insertions-freien pIND-Vektors wurden aus dem Agarosegel exzidiert.

2. Aufreinigung des Restriktionsproduktes

Material

QIAquick Gel-Extraction Kit (Qiagen)

Durchführung

Die exzidierten Banden wurden gemäß Herstellerprotokoll aufgereinigt und in 30 µl aqua bidest. eluiert. Die beiden Eluate wurden nach Aufreinigung erneut auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert.

3. Synthese des pIND-p75^{NTR}-FL Vektors**Material**Ligationsansatz

1 µl pIND Vektor (aus 2.)

7 µl p75^{NTR}-FL (aus 2.)

1 µl T4-Ligase (NEB)

1 µl 10 x Puffer (NEB)

Durchführung

Der Ligationsansatz wurde für 18 h bei 16 °C inkubiert.

4. Transformation

analog zu 3.19.1 / 4.

5. Präparation der Vektor-DNA mit dem Qiagen Plasmid-Mini Kit

analog zu 3.19.1 / 5.

6. Kontrolle des Produktes durch eine NheI/ApaI-Restriktion

analog zum ersten Syntheseschritt

7. Präparation der Vektor-DNA mit dem Qiagen Plasmid-Midi Kit

analog zu 3.19.1 / 7.

3.19.3 Transfektion der D283MED-Zelllinie

Die Transfektion ermöglicht die Einschleusung von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen. Lipofektion als spezielle Transfektionstechnik nutzt die Bindung anionischer DNA an kationischen Lipid-Molekülen. DNA-Lipid-Komplexe können mit der Zellmembran fusionieren und auf diesem Weg die DNA ins Zellinnere transportieren. Zur Transfektion der Zelllinie D283MED mit den unter Kapitel 3.19.1-2 synthetisierten p75^{NTR}-Konstrukten wurde das Transfektionskit FuGene 6 der Firma Roche verwendet (Jacobsen et al., 2004). Da die pIND- und pERV-Vektoren Hygromycin- sowie Neomycin-Resistenzen tragen, konnte unter Zugabe von Hygromycin und G418 die für beide Vektoren positive Zellpopulation selektioniert werden.

Material

| | |
|------------------|--------------------------|
| FuGene 6-Reagenz | (Roche) |
| RPMI 1640-Medium | (Invitrogen) |
| G418 | (PAA, Pasching, Austria) |
| Hygromycin | (Invitrogen) |

Durchführung

Zu 100 µl RPMI 1640-Medium ohne Serum-Supplement wurden 3-6 µl FuGene 6-Reagenz und 1-2 µl Vektor-DNA gegeben und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Transfektionslösung zu den zu transfizierenden Zellen in einem Volumen von 5 ml. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und Hygromycin (50 µg/ml) sowie G418 (200 µg/ml) zugegeben. Diese Konzentrationen wurden in vorgeschalteten Titrationsversuchen an Wildtypzellen als letal für nicht-transfizierte Zellen ermittelt.

3.19.4 Aktivierung und Bestätigung des stabilen Zellsystems

Über die Inkubation mit dem aktivierenden Faktor PonasteronA werden die eingebrachten Vektoren in den transfizierten Zelllinien aktiviert. Eine Bestätigung der Aktivierung ist über den Nachweis der Transkription vektorspezifischer Inhalte möglich. Dazu wird RNA aus aktivierten Zelllinien isoliert und mittels einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und in der PCR amplifiziert (Kapitel 3.12-13). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8, die Lokalisation der amplifizierten Fragmente schematisch in Abbildung 9 wiedergegeben.

| <u>Fragment</u> | <u>Primer-Sequenz</u> | <u>Länge</u> | <u>PCR-Bedingung</u> |
|---|--|--------------------|---|
| p75 ^{NTR} -FL | Forward: 5'-ACTACAAGGACGACGATGAC-3' Reverse: 5'-TCGTCTCATCCTGGTAGTAG-3' | 290 bp | 1,5 mM MgCl ₂ , (Roche), 34 x (95°x35 s / 56°x40 s / 72°x40 s) |
| p75 ^{NTR} -ΔDD / p75 ^{NTR} -ΔICD | Forward: 5'-ACCTCATCCCTGTCTATTGC-3' Reverse: 5'-TCATCGTCGTCCTTGAGTC-3' | 278 bp / 110 bp | 1,5 mM MgCl ₂ , (Roche), 34 x (95°x35 s / 56°x40 s / 72°x40 s) |
| β ₂ -Mikroglobulin | Forward: 5'-GCTACTCTCTCTTTCTGGCC-3' Reverse: 5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3' | 336 bp | 1,5 mM MgCl ₂ , (Invitrogen) 34 x (95°x35 s / 57°x40 s / 72°x40 s) |

Tabelle 8: Primer-Sequenzen und Reaktionsbedingungen der Vektor-PCRs

Material

| | |
|-------------------------------|--------------|
| PonasteronA (5 μM) | (Invitrogen) |
| Serum-freies Neurobasalmedium | (Invitrogen) |

Durchführung

Nach 18 stündiger Kultivierung erfolgte der Austausch des Serum-haltigen Mediums durch Serum-freies Neurobasalmedium unter Zugabe von PonasteronA (5 μM). Weitere 48 h später erfolgte die Isolierung der zellulären RNA und anschließende RT-PCR zur Dokumentation der Expression.

3.20 NGF-Behandlung von transfizierten Zellen

Für durchflusszytomtrische Untersuchungen und morphologischen Apoptosenachweis wurden die aktivierten Zellen selektiv mit NGF behandelt.

Material

rekombinantes NGF

(R&D Systems)

Durchführung

Die Zugabe von NGF (200 ng/ml) erfolgte selektiv 24 h nach der Aktivierung durch PonasteronA für weitere 24 h.

3.21 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können neben basalen zytomorphologischen Daten unter Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper und Farbstoffe definierte zelluläre Eigenschaften erfasst werden. Methodisch werden Zellen in Einzelzellsuspension durch eine Kapillare eines FACS-Geräts (*fluorescence activating cell scanner*) gesaugt und Laserstrahlen unterschiedlicher Farbe ausgesetzt. Emittedes Streulicht und Fluoreszenzimpulse der Zellen werden anschließend von zwei Seiten registriert und erlauben die Ableitung verschiedener Parameter sowie eine Aussage über gebundene Farbstoffmarkierte Antikörper.

3.21.1 Färbung von Zellen

Zur differenzierten Analyse zellulären Wachstums werden die Zellen vor einer zytometrischen Untersuchung mit unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und die DNA gefärbt. Zur Detektion apoptotischer Zellen erfolgt die Inkubation mit einem Phycoerythrin (PE)-markierten Antikörper (Anregung bei 565 nm, Emission bei 488 nm) gegen ein 85 kDa großes Fragment des nukleären Enzyms Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP). Das intakte PARP-Enzym (113 kDa) katalysiert den Transfer von ADP-Ribosen auf eine Vielzahl zellulärer Proteine. Neben einer zellbiologischen Rolle in der Reparatur von DNA-Schäden ist das PARP-Enzym ein Ziel der Protease-Aktivität Apoptose-assoziiierter Caspasen. Resultat dieses bereits in frühen Phasen der Apoptose stattfindenden Ereignisses ist die Spaltung des Enzyms in zwei unterschiedlich große Fragmente (24 und 89 kDa) (Patel et al., 1996). Der PARP-Antikörper besitzt eine spezifische Affinität zu dem 89 kDa-Fragment und erlaubt somit eine Markierung von Zellen bereits in frühen Phasen der Apoptose.

Als Marker mitotischer Aktivität dient ein Alexa Fluor 647-markierter Antikörper (Anregung bei 650 nm, Emission bei 665 nm) gegen das phosphorylierte Histon H3 (pHH3). Histon 3 ist ein wichtiger Baustein des eukaryoten Nucleosoms und unterliegt verschiedenen Histonmodifikationen innerhalb des Zellzyklus. Die Phosphorylierung des an Ser10 korreliert mit der initialen Kondensation der Chromosomen während der Mitose (Hendzel et al., 1997) und stellt damit einen Marker für mitotische Aktivität dar.

Der Farbstoff Farbstoff 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) bindet selektiv DNA. Nach Anregung durch ultraviolettes Licht (Absorptionsmaximum: 358 nm) fluoresziert DAPI bei einem Emissionsmaximum von 461 nm. Eine Färbung der DNA durch den Farbstoff DAPI dient der Ermittlung des DNA-Gehalts einzelner Zellen und stellt damit ein Maß für die Zellzyklusverteilung der Zellen dar.

Material

| | |
|--------------------------|---------------------|
| PBS | (Life Technologies) |
| PFA (4 %, in PBS gelöst) | (Merck) |
| Triton X | (Roche) |

primäre Antikörperlösung

| | |
|---|-----------------------------|
| phospho-Histon H3 (Ser10) Antikörper (1:20) | (Cell Signaling Technology) |
| PE Mouse anti-Cleaved PARP (Asp214) | (BD Biosciences) |
| PBS | (Life Technologies) |

4',6'-Diamidino-2-phenylindol -Färbelösung

| | |
|---|---------|
| 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (1 µg/ml) | (Sigma) |
| RNase | |

Durchführung

1 Millionen Zellen der verschiedene p75^{NTR}-Varianten exprimierenden Zelllinien wurden in 1 ml PBS aufgenommen und pelletiert (300 g; 5 min). Anschließend erfolgte die Fixierung in 2 % PFA für 30 min bei Raumtemperatur sowie die erneute Pelletierung unter den oben genannten Bedingungen. Nach einem Waschschrift mit 1 ml PBS und anschließender Pelletierung (siehe oben) wurden die Zellen im nächsten Schritt in einer 10 minütigen Inkubation mit 0,01 % Triton X / PBS

permeabilisiert und erneut mit PBS gewaschen. Die Co-Inkubation beider Antikörper in einem Ansatz fand bei Raumtemperatur für 30 min statt. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS erfolgte die DAPI Färbung bei 37 °C für 30 min.

3.21.2 Zytometrische Analyse

Die zytometrische Messung fand einem LSR II flow cytometer der Firma BD Biosciences statt. Die gemessenen Parameter beinhalteten die Integrale der Lichtbrechung (SSC-A) und –beugung (FSC-A), der selektiven DAPI-Emission (DAPI-A) sowie der spezifischen Fluoreszenzen der beiden verwendeten Antikörper. Zur Auswertung der Daten wurde die Software FlowJo v8.53 (Tree Star, Inc. 1997 - 2007) eingesetzt. Die Zuordnung der Zellen zu den Zellzyklusphasen erfolgte mit der Software ModFit LT (Verity Software House).

3.22 Morphologischer Nachweis von Apoptose durch DAPI-Färbung

4'-6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) ist ein DNA-bindender Fluoreszenz-Farbstoff. Nach einer Anregung durch ultraviolettes Licht (Absorptionsmaximum: 358 nm) fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit einem Emissionsmaximum von 461 nm. Die Anfärbung von Zellkernen mit DAPI ermöglicht deren morphologische Beurteilung. Im Rahmen apoptotischer Vorgänge folgen der unregelmäßigen Begrenzungen von Kernmembranen Kernkondensationen und –fragmentierungen bis zu völligen Kernzerfällen.

Material

| | |
|--------------------------|---------------------|
| PBS | (Life Technologies) |
| PFA (4 %, in PBS gelöst) | (Merck) |
| DAPI (1 µg/ml) | (Sigma) |
| Fluoromount | (SouthernBiotech) |

Durchführung

1 Millionen vereinzelte Zellen wurden isoliert und mit 1 ml PBS gewaschen, pelletiert (1200 rpm, 5 min). 400 µl PFA (4 %) wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und erneut pelletiert. Die Färbung mit DAPI erfolgte in einem Volumen von 400 µl bei Raumtemperatur für 5 min. Nach Pelletierung und einem weiteren Waschschrift mit PBS erfolgte die Resuspension in 30 µl PBS. Zur Analyse

wurden 10 µl der Suspension mit jeweils 5 µl Fluoromount-Eindeckmedium vermischt und auf Objektträgern eingedeckt.

4 Ergebnisse

4.1 Mikrosatellitenanalyse des 17q21.33 Genlokus

In 58 der untersuchten 61 MB-Fälle lag eine Heterozygotie für mindestens einen der untersuchten polymorphen Marker des Genlokus 17q21.33 vor. Exemplarisch zeigt Abbildung 10 charakteristische Bandenmuster der Analyse. 17 % (10 von 58) der informativen Fälle zeigten ein Verlust eines Allels der chromosomalen Region 17q21.33. Verluste fanden sich in beiden histologischen Varianten (CMB: 15,9 %; DMB: 21,4 %). Ein signifikanter Unterschied bezüglich der auffälligen Befunde zwischen desmoplastischen und klassischen Tumoren ließ sich auf Grundlage des untersuchten Kollektivs nicht ermitteln. Tabelle 9 zeigt die detaillierten Analyseergebnisse für die Fälle mit Allelverlust in der Mikrosatellitenanalyse.

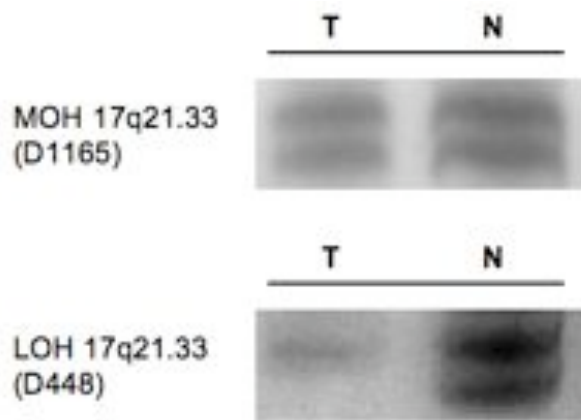


Abbildung 10: Allelstatus von Tumor (T) und korrespondierendem Normalgewebe (N) an zwei Beispielen. MOH: Erhalt beider Allele (engl. maintenance of heterozygosity), LOH: Verlust eines Allels (engl. loss of heterozygosity)

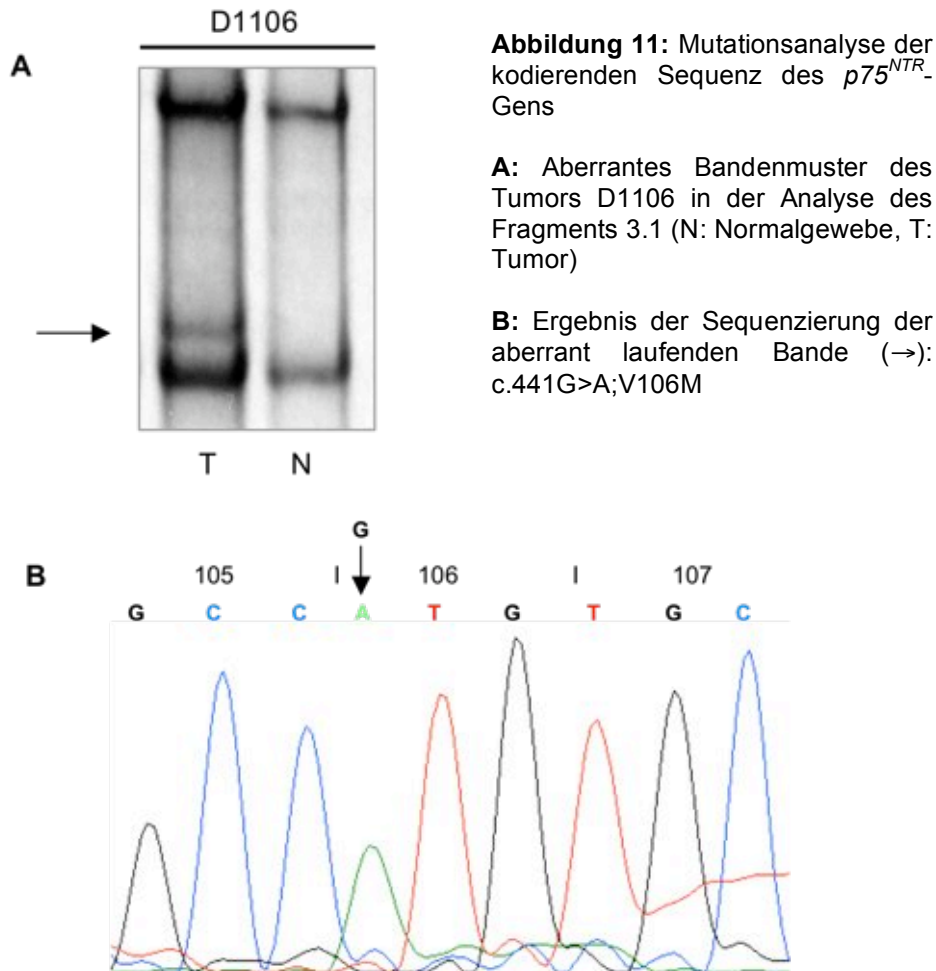
| <u>Tumor-ID</u> | <u>Entität</u> | <u>D17S1180</u> | <u>D17S806</u> | <u>D17S943</u> | <u>D17S1820</u> |
|-----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|
| D282 | DMB | ○ | ● | n.i. | ● |
| D448 | DMB | n.u. | n.i. | n.u. | ● |
| D1002 | CMB | n.u. | n.u. | ● | n.u. |
| D1173 | CMB | n.u. | ● | n.i. | ○ |
| D802 | CMB | n.i. | ● | n.i. | n.i. |
| D1759 | CMB | ● | n.i. | n.u. | n.i. |
| D1028 | DMB | n.u. | ● | n.u. | ● |
| D1106 | CMB | ● | n.i. | n.u. | n.u. |
| D1185 | CMB | ● | n.i. | n.u. | ● |
| D1622 | CMB | n.u. | ○ | n.u. | ● |

Tabelle 9: Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse. Dargestellt sind nur Fälle mit Allelverlust.

○, Verlust der Heterozygotie; ●, Erhalt der Heterozygotie; n.i., nicht informativ; n.u., nicht untersucht

4.2 Mutationsanalyse des $p75^{NTR}$ -Gens

73 Medulloblastomproben – 56 klassische und 14 desmoplastische Tumoren - und die Zelllinien MHH-Med3 und MHH-Med4 wurden mittels SSCP auf Sequenzänderungen im $p75^{NTR}$ -Gen untersucht. Dabei zeigte sich eine Mutation (c.441G>A;V106M) in Exon 3 eines klassischen Tumors (D1106). Die Basensubstitution ließ sich in einer aberrant gelaufenen Bande nachweisen und hat einen Aminosäureaustausch von Valin zu Methionin im Codon 106 zur Folge. Aberrantes Bandenmuster und korrespondierendes Sequenz-Chromatogramm sind in Abbildung 11 dargestellt.



4.3 $p75^{NTR}$ -Expression in Medulloblastomen

Die $p75^{NTR}$ Expression wurde an 15 Tumorproben sowie zwei fetalen Cerebella als Referenzgewebe analysiert. Unter den ausgewählten Proben befanden sich sechs desmoplastische und neun klassische Tumoren, in sieben Tumoren war zuvor ein LOH 17q21.33 detektiert worden, in neun Tumoren ein Erhalt der Heterozygotie (MOH) 17q21.33. Kein signifikanter Expressionsunterschied fand sich in den Tumoren mit MOH 17q21.33 gegenüber den Tumoren mit LOH 17q21.33. Auch innerhalb der histologischen Subtypen (CMB oder DMB) bestand keine signifikante Differenz bezüglich der $p75^{NTR}$ -Expression zwischen den Tumoren mit MOH 17q21.33 und LOH 17q21.33. Eine Signifikanz (U-test, $p < 0,001$) bestand hingegen zwischen den desmoplastischen und klassischen Tumoren (Abbildung 12). Die $p75^{NTR}$ -Expression in den fetalen Cerebella war signifikant höher als in den CMB (U-Test, $p < 0,05$) und nicht signifikant niedriger als in DMB.

In der Abbildung 12 zusätzlich dargestellt ist der durch Duplex-PCR ermittelte Expressionsstatus der Trk-Rezeptoren, durch Duplex-PCR ermittelt. Starke Expression ist durch ein höheres Signal als das Signal der parallel untersuchten mRNA von β_2 -Mikroglobulin definiert. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen diesen und dem Allelstatus zeigte sich nicht.

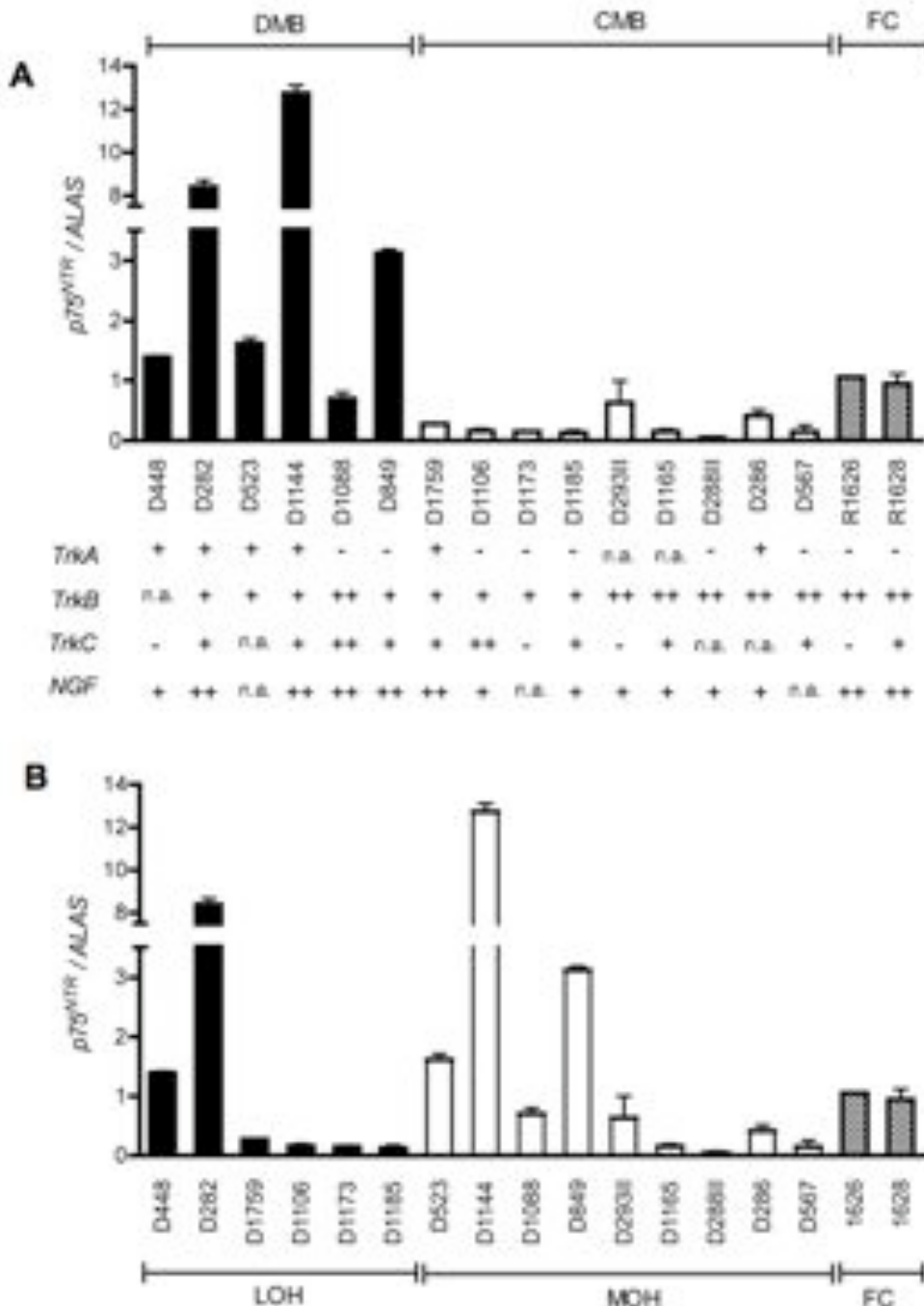


Abbildung 12: $p75^{NTR}$ -mRNA-Expression

A: Gegenüberstellung desmoplastischer und klassischer Tumoren unter der Angabe der spezifischen Trk-Expressionen (+ : Expression, ++ : starke Expression (im Vergleich zur β_2 -Mikroglobulin-mRNA Expression stärker), - : keine Expression, n.a. : nicht analysiert)

B: Gegenüberstellung der Tumoren mit LOH 17q21.33 und MOH 17q21.33

4.4 Epigenetische Untersuchung des $p75^{NTR}$ -Gens

In allen untersuchten Geweben (CMB, DMB und fetales Cerebellum) fanden sich sporadische Methylierungen. Eine signifikante Häufung von Methylierungen ließ sich weder einzelnen CpG-Orten noch Gewebeentitäten zuordnen. Abbildung 13 zeigt den Anteil der methylierten CpG-Orte in allen drei Entitäten.

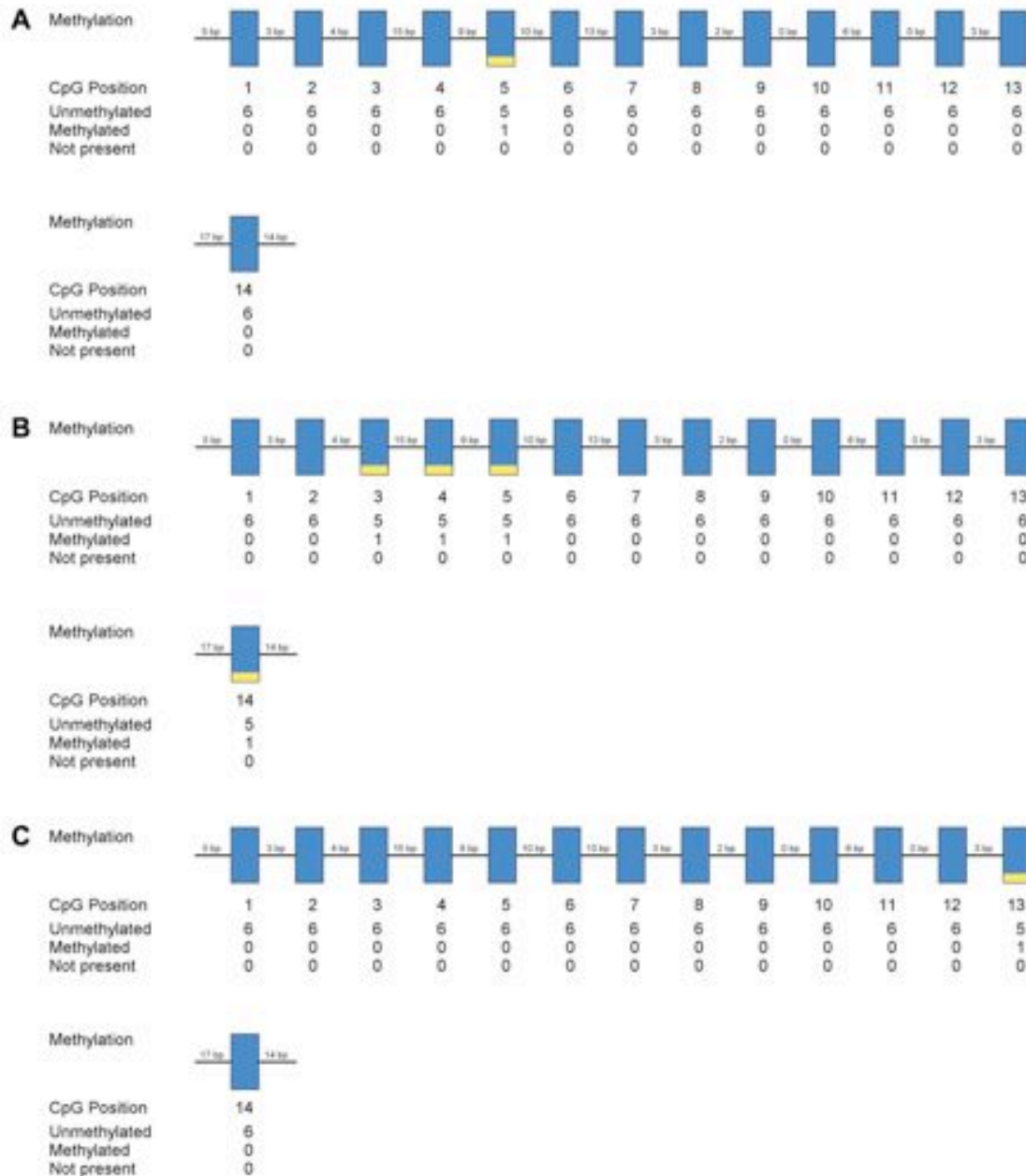


Abbildung 13: Vergleichende epigenetische Analyse der 5'-Region von $p75^{NTR}$ in MB und fetalem Cerebellum. Dargestellt sind repräsentative Methylierungsmuster der drei untersuchten Gewebe. Die Abbildung ist durch die Biq Analyzer Software (Bock et al., 2005) erstellt.

- A:** klassisches Medulloblastom
B: desmoplastisches Medulloblastom
C: fetales Cerebellum

4.5 $p75^{NTR}$ -Induktion in murinen Körnerzellprogenitoren

Nach Simulation muriner Körnerzellprogenitoren mit rekombinantem, murinem Shh zeigte sich eine signifikante (U-test, $p < 0,0001$) Steigerung der murinen $p75^{NTR}$ -Expression in Relation zu konstitutiv expimiertem murinem α -tubulin. Die mit Shh über einen Zeitraum von 7 h inkubierten Zellen zeigten im Vergleich zu einer unbehandelten Körnerzellpopulation eine ca. 5-fach erhöhte Expression des murinen $p75^{NTR}$ (Abbildung 14).

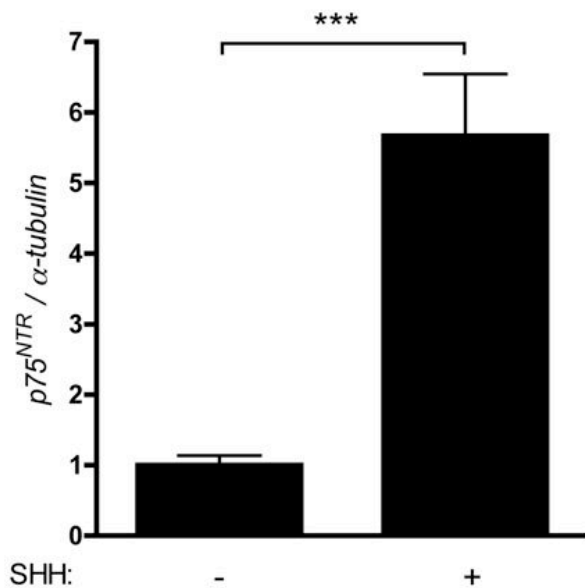


Abbildung 14: murine $p75^{NTR}$ mRNA-Expression muriner Körnerzellprogenitoren vom postnatalen Tag P8 nach Inkubation mit rekombinantem Shh über 7 h (t -test, $p < 0,05$)

4.6 Immunhistochemische $p75^{NTR}$ -Färbung

Murine Tumoren zeigten ein deutliches $p75^{NTR}$ -Signal. Dabei ließ sich der Rezeptor bevorzugt am Plasmalemm der Tumorzellen darstellen. In der murinen Entwicklungsreihe stellt sich bevorzugt die äußere Körnerzellschicht $p75^{NTR}$ -positiv dar. Eine Progression bezüglich der Signalstärke und Selektivität ist mit fortschreitender Entwicklung des murinen Cerebellums zu beobachten. Beispiele fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen sind in Abbildung 15 zusammengefasst.

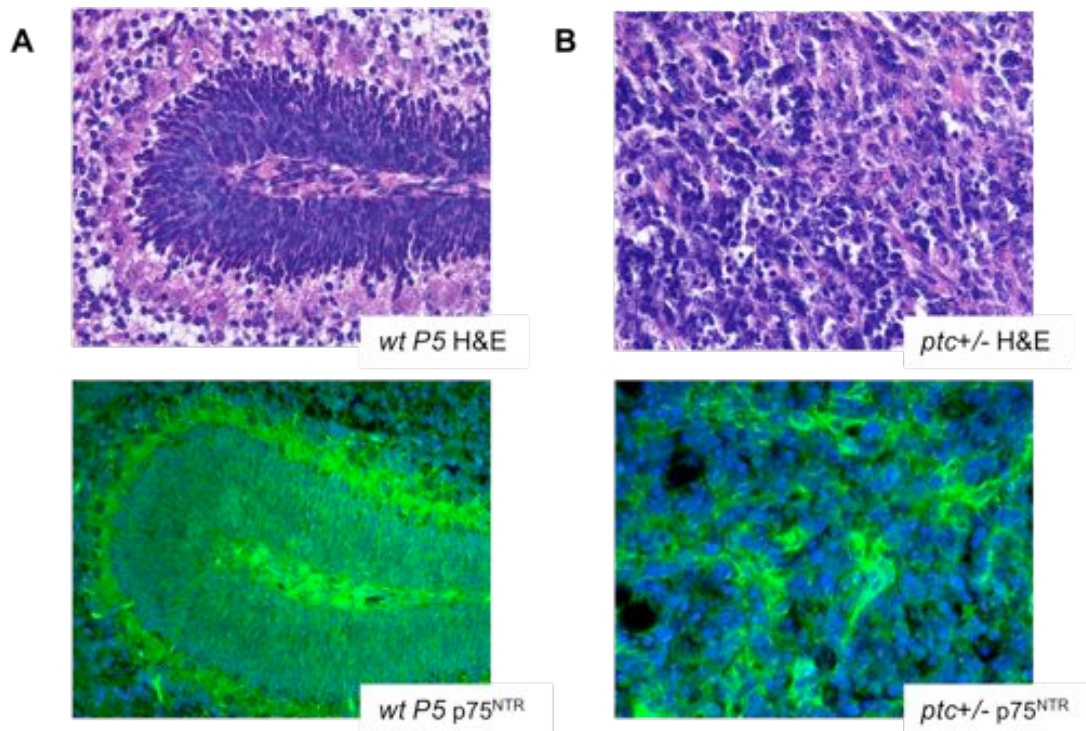


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des $p75^{NTR}$ -Rezeptors

- A:** Expression des $p75^{NTR}$ -Rezeptors im Cerebellum einer Wild-Typ Maus vom postnatalen Tag P5
- B:** Expression des $p75^{NTR}$ -Rezeptors in einem murinen *ptc*-hemidefizienten MB

4.7 Induktion der $p75^{NTR}$ -Varianten im Modellsystem

PCR-Produkte der unterschiedlichen $p75^{NTR}$ -Varianten stellen sich in den Ponasteron A-aktivierten Zellen im Gegensatz zu den nicht aktivierten Zellen deutlich dar (Abbildung 16). Ein PCR-Produkt aus dem β_2 -Mikroglobulin-Transkript zeigte die Vitalität aller untersuchten Zellen.

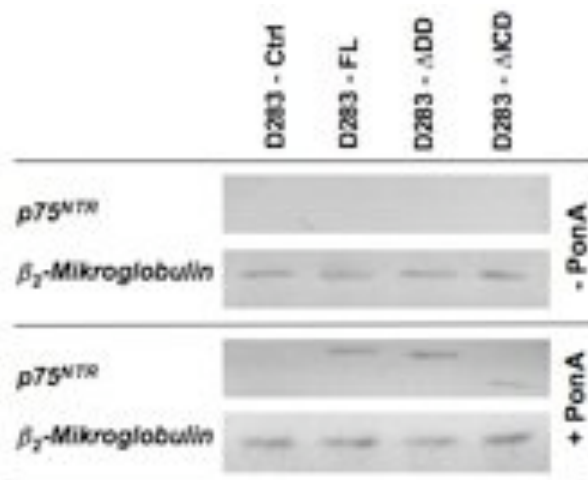


Abbildung 16: Induktion der Expression unterschiedliche $p75^{NTR}$ -Konstrukte durch Ponasteron A (PonA)

Fragmentlängen:
 D283-FL: 290 bp
 D283-ΔDD: 278 bp
 D283-ΔICD: 110 bp

4.8 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

In der Gegenüberstellung PE-A-PARP gegen AlexaFluor 647-A pHH3 (Abbildung 17) stellten sich 3 distinkte Populationen dar. PARP und pPH3 negative (PARP-/pPH3-) Zellen bildeten die quantitativ führende Population. Eine doppelt positive Population ergab sich nicht. Populationen selektiv positiver Zellen (PARP+ und pPH3+) ließen sich jeweils deutlich abgrenzen und quantitativ bestimmen.

Der Anteil der pPH3+-Population zeigte sich in allen untersuchten Varianten sowie der selektiven NGF-Stimulation etwa gleich (0,5 % bis 1,1 %). Dahingegen variiert die PARP+ Population in den unterschiedlichen Varianten nach selektiver NGF-Behandlung signifikant. Während die nicht nicht NGF-behandelten Zellvarianten einen basalen Anteil der PARP+-Zellen von 2 – 3 % aufwiesen, ergab sich eine signifikante Steigerung dieser Population in den NGF-behandelten Zellen der Zelllinie D283MED-FL auf 11 % (U-Test, $p < 0,0001$) und der Zelllinie D283MED- Δ DD auf 7,8 % (U-Test, $p < 0,0001$). Die PARP+ Populationen der Zelllinien D283MED-CTRL und D283MED- Δ ICD zeigte keinen signifikanten Anstieg nach NGF Behandlung.

In der Analyse der Zellzyklusphasen der untersuchten Zellvarianten unter selektiver NGF-Behandlung ergaben sich keine signifikanten Verschiebungen.

| Zelllinie | pHH3 (Ser 10) | | | Cleaved PARP (Asp 214) | | |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------|------------------------|-------------------|-------------|
| | Ctrl | + NGF | Signifikanz | Ctrl | + NGF | Signifikanz |
| D283-Ctrl | 1,12(\pm 0,05) | 0,99(\pm 0,03) | n.s. | 1,76 (\pm 0,04) | 2,06(\pm 0,99) | n.s. |
| D283-FL | 0,76(\pm 0,04) | 0,63(\pm 0,18) | n.s. | 2,20(\pm 0,01) | 11,1(\pm 0,20) | *** |
| D283- Δ DD | 0,51(\pm 0,02) | 0,60(\pm 0,04) | n.s. | 2,90(\pm 0,02) | 7,82(\pm 0,91) | *** |
| D283- Δ ICD | 0,85(\pm 0,16) | 0,78(\pm 0,01) | n.s. | 1,22(\pm 0,30) | 2,56(\pm 0,35) | n.s. |

Tabelle 10: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der D283MED Varianten nach selektiver NGF-Behandlung. Angezeigt werden die jeweiligen Durchschnittswerte der Populationen sowie in Klammern deren Standardabweichung. U-Test: ***, $p < 0,0001$; n.s., nicht signifikant

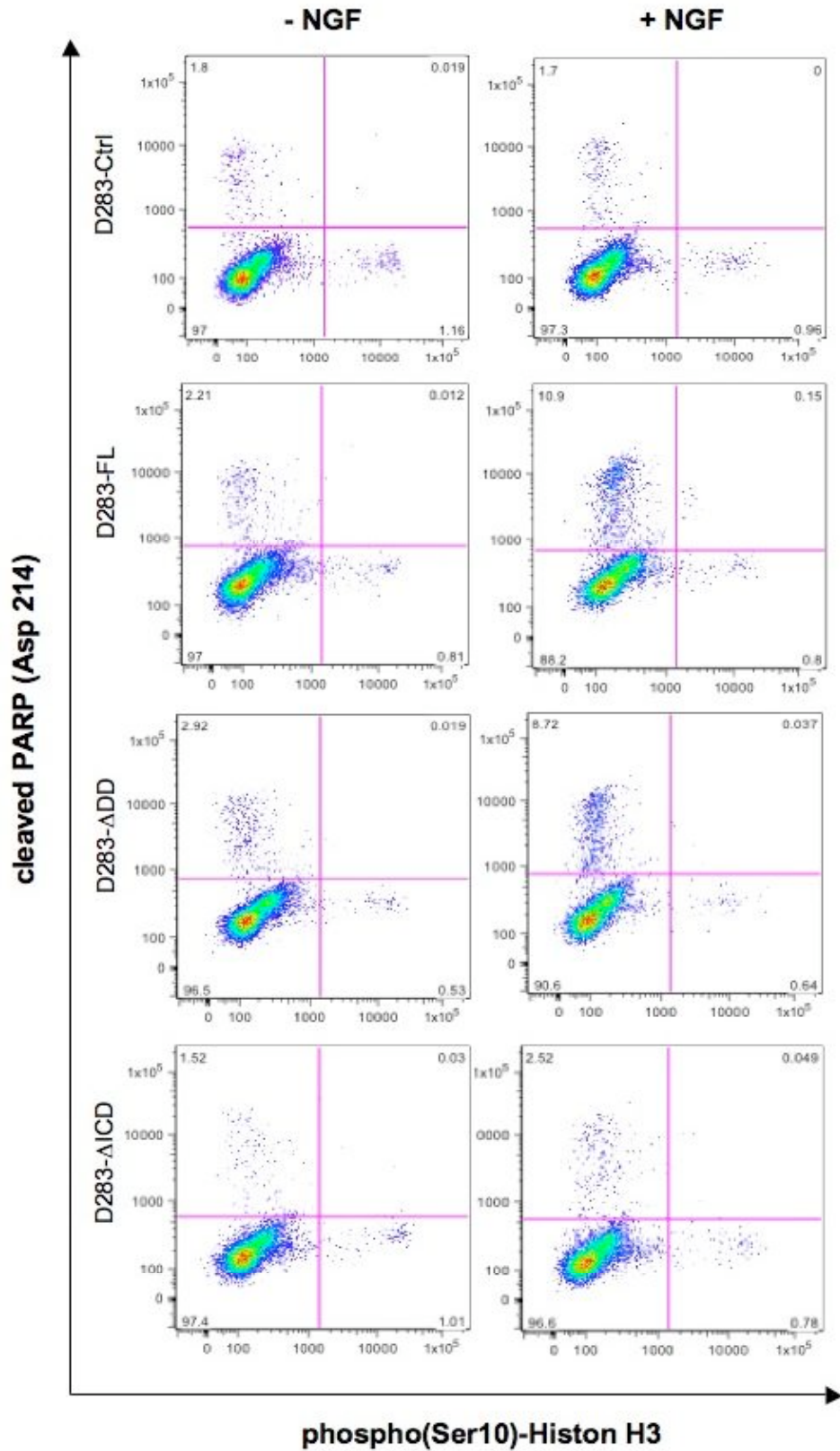


Abbildung 17: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von mit unterschiedlichen p75^{NTR}-Varianten transfizierten D283MED-Zellen. Abgebildet sind die Originaldaten der Flowjo Analysesoftware.

4.9 Morphologischer Nachweis von Apoptose

Ohne die Stimulation mit NGF zeigten die Zelllinien D283-Ctrl und D283- Δ ICD eine geringe Rate (unter 2 %) an apoptotischen Kernfragmentierungen, während die Linien D283-FL und D283- Δ DD unter diesen Bedingungen eine diesbezügliche Erhöhung auf 4 % (D283-FL) bzw 3 % (D283- Δ DD) aufwiesen. Die Stimulation durch NGF führte in den Zelllinien D283-FL und D283- Δ DD zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate auf 12 % (*t*-test, $p < 0,001$) und 6 % (*t*-test, $p < 0,001$). Die Zelllinien D283-Ctrl und D283- Δ ICD zeigten unter der Behandlung mit NGF keine signifikante Veränderung der Apoptoserate (Abbildung 18).

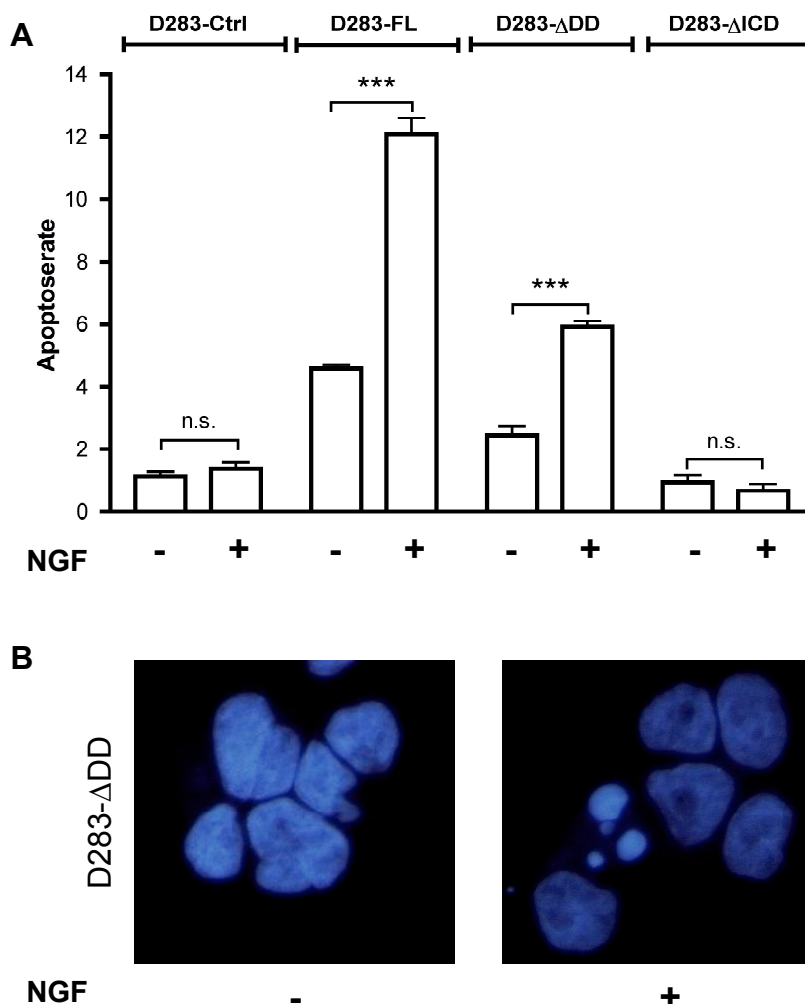


Abbildung 18: Morphologische Bestimmung der Apoptoseraten von mit unterschiedlichen p75^{NTR}-Varianten transfizierten D283MED MB-Zellen

A: Apoptoseraten der verschieden transfizierten D283MED Zellen nach selektiver NGF-Behandlung (*t*-test: ***, $p < 0,005$; n.s. nicht signifikant)

B: Beispielhafte Ergebnisse der NGF-Behandlung der Zelllinie D283- Δ DD

5 Diskussion

Zur Molekularpathologie des Medulloblastoms

Das Medulloblastom ist ein ganz überwiegend im Kindesalter auftretender Tumor des Cerebellums. Verschiedenste molekulare Mechanismen der Tumorgenese sind beschrieben und betreffen zum Teil die Aktivität entwicklungsgeschichtlich hochkonservierter Signalwege der cerebralen Entwicklung. Histologisch sind verschiedene Varianten zu klassifizieren, dabei bilden die klassischen und die desmoplastischen MB die häufigsten Formen. Neben einer unterschiedlichen Tumorbiologie unterscheiden sich diese hinsichtlich ihrer klinischen Prognose. Rutkowski et al. (2005) beschreiben eine signifikant höhere progressionsfreie Überlebensrate von jungen Kindern mit desmoplastischen gegenüber klassischen Tumoren. Eine weitere variantenspezifische Eigenschaft besteht in der Expression von p75^{NTR} in desmoplastischen Tumoren - im Gegensatz zur klassischen Variante (Bühren et al., 2000). Die hier durchgeführten Untersuchungen basieren auf der Hypothese, dass die ungünstigere klinische Prognose klassischer Tumoren möglicherweise in einem pathogenetischen Zusammenhang mit der hier fehlenden p75^{NTR}-Expression steht.

Als Mitglied der TNFR-Familie (Liepinsh et al., 1997) und integraler Bestandteil des Neurotrophin-Systems ist die Expression von p75^{NTR} in unterschiedlichen Geweben und Tumorarten beschrieben (Roux und Barker, 2002). Mitunter wird eine funktionelle Relevanz in der Biologie verschiedener Tumoren des zentralen Nervensystems diskutiert (Kruttsgen et al., 2006). Eine Funktion als Tumorsuppressor ist für p75^{NTR} in unterschiedlichen Neoplasien beschrieben (Dimaras et al., 2006; Khwaja et al., 2004; Tabassum et al., 2003).

Zur Aufklärung der molekularen Grundlage der divergenten p75^{NTR}-Expression in den beiden häufigsten Varianten des Medulloblastoms sowie zur Analyse einer putativen Rolle als Tumorsuppressorgen, war zunächst die Ermittlung etwaiger genomischer Dysbalancen der chromosomalen Region des p75^{NTR} relevant. Verluste chromosomalen Materials auf einem Allel stellen entsprechend ein häufiges initiales Ereignis in der Genese von Tumoren dar und bilden die Grundlage für eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgen. Der Allelstatus der chromosomalen Region 17q21.33, in der p75^{NTR} kartiert ist, wurde in MB bislang nicht detailliert untersucht. In breit angelegten CGH Analysen wurden keine Allelverluste des kurzen Arms von Chromosom 17 dargestellt (Schutz et al., 1996).

Die von uns vor diesem Hintergrund durchgeführte Analyse chromosomal unmittelbar benachbarter Mikrosatelliten zur Erfassung von Verlusten der $p75^{NTR}$ -Region zeigten genomische Dysbalancen im Sinne eines möglichen LOH des Locus 17q21.33 in 17 % (10 von 58) der untersuchten Fälle. Auffällige Ergebnisse fanden sich dabei in klassischen und desmoplastischen Tumoren in einer ähnlichen Frequenz. Trotz umfangreicher Untersuchungen zu genomischen Imbalancen im Medulloblastom wurde ein solcher Verlust noch nicht beschrieben. Verschiedene Publikationen zeigen in anderen Tumorarten genetische Verluste in diesem Bereich, in einer häufigen Frequenz u.a. in Mamma- (Cropp et al., 1993) und Lungentumoren (Abujiang et al., 1998).

Unsere Ergebnisse erscheinen allerdings konträr zu bisherigen Publikationen, die vorrangig genomische Zugewinne auf dem Chromosomenarm 17q zeigen (Reardon et al., 1997; Schutz et al., 1996). Möglicherweise reflektieren die gefundenen allelischen Dysbalancen auch einen genomischen Zugewinn des entsprechenden Locus, erklärbar durch das Ungleichgewicht der beiden Allele nach Vervielfachung eines Allels. Die Unterscheidung zwischen einer Vervielfachung des einen oder Verlust des anderen Allels ist in einer Mikrosatellitenanalyse nicht sicher möglich. Weiterführende Untersuchungen zur direkten Alleldarstellung wie die *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung* wären hier sicherlich sinnvoll. Von Relevanz erscheint die mögliche Assoziation eines LOH 17q21.33 mit anderen komplexen Aberrationen von Chromosom 17 im Medulloblastom: Verluste chromosomalen Materials auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 als häufigste Ereignisse (Cogen und McDonald, 1996), während der lange Arm mit genetischen Zugewinnen in Zusammenhang gebracht wird (Reardon et al., 1997). Ein Mechanismus, der beide Arme involviert, ist die Ausbildung eines Isochromosoms 17q (Bigner et al., 1988; Griffin et al., 1988). Ein initialer LOH 17q21.33 ließe sich durch die Ausbildung eines Isochromosoms 17q kompensieren, ebenso könnte ein Allelverlust 17q21.33 durch ein Isochromosom 17q bedingte genetische Zugewinne kompensieren. Vor diesem Hintergrund wird erkennbar, dass breit angelegte CGH-Untersuchungen des $p75^{NTR}$ -Locus bislang nicht als verändert gefunden haben: Es bleibt die Frage, ob erst der LOH oder der chromosomale Gewinn im Rahmen der Isochromosombildung auftritt. In weiterführenden zukünftigen Untersuchungen dieses Locus sollte auch eine genauere Eingrenzung des gefundenen LOH in Medulloblastomen sowie die

Möglichkeit einer Assoziation mit anderen chromosomalen Veränderungen im Vordergrund stehen.

Da nach Knudsons „Two-Hit Hypothese“ der Kanzerogenese, unter Annahme einer Tumorsupressorrolle für $p75^{NTR}$, eine zweite inaktivierende Veränderung vorliegen sollte, führten wir ein Screening der kodierenden Sequenz des Gens auf Mutationen durch (Knudson, 1971). Ein gängiger Mechanismus, der zur Inaktivierung eines Genproduktes führen kann, besteht in somatischen Sequenzalterationen. In der Literatur sind Mutationen des $p75^{NTR}$ -Gens während der Tumorgenese in zwei Melanomzelllinien beschrieben (Papandreou et al., 1996). Dabei handelt es sich um eine Basensubstitution in der Transmembrandomäne des Rezeptors, deren funktionelle Konsequenz allerdings nur bedingt untersucht wurde, von der aber gezeigt werden konnte, dass sie mit einer deutlich verminderten Expression des $p75^{NTR}$ in Melanom-Zelllinien assoziiert ist. Zur Aufklärung möglicher Sequenzänderungen in Medulloblastomen - als Grundlage eines funktionellen Verlustes des zweiten Allels - führten wir eine SSCP-Analyse durch. Dabei fand sich unter 73 Medulloblastomproben im klassischen Medulloblastom D1106 die Sequenzänderung c.441G>A;Val106Met in Exon 3. Sie resultiert in einem Austausch von Valin durch Methionin. Ein Polymorphismus des betroffenen Codons ist nicht beschrieben. Das veränderte Codon lässt sich dem Bereich der extrazellulären CRD2 zuordnen. Dieser Proteinabschnitt ist essentiell für die Interaktion mit Rezeptorliganden. Mutationen in diesem Bereich führen zu einer verminderten Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden NGF (Yan und Chao, 1991). Die biochemischen Eigenschaften der substituierten Aminosäuren gleichen sich allerdings hinsichtlich Polarität und isoelektrischem Punkt; Veränderungen der Sekundärstruktur des Rezeptors erscheinen somit unwahrscheinlich. Das Auftreten zusätzlicher Splice-Stellen wurde mit einem splice-site prediction code (Reese et al., 1997) als unwahrscheinlich angegeben. Da sich abgesehen von der solitären Sequenzänderung eines singulären Tumors keine Auffälligkeiten ergaben, kann ein gehäufte funktioneller Verlust des $p75^{NTR}$ aufgrund von Sequenzmutationen ausgeschlossen werden. Die Frage nach der transkriptionellen Konsequenz der gefundenen Allelverluste erscheint daher umso gewichtiger.

Deshalb erfolgte die Analyse des $p75^{NTR}$ -Expressionsniveaus in Tumoren mit einem LOH 17q21.33 und solchen mit einem nachgewiesenem biallelischen Lokus 17q21.33. Eine signifikante Differenz in der Expression zwischen gleichartigen

Tumoren unterschiedlicher Allelstatus konnten wir ausschließen. Nachweisen lässt sich eine deutlich höhere $p75^{NTR}$ -Expression in desmoplastischen gegenüber klassischen Tumoren. Damit können wir zeigen, dass die von Bühren et al. (2000) auf Proteinebene gezeigte starke $p75^{NTR}$ -Expression desmoplastischer Medulloblastome bereits auf mRNA-Ebene vorliegt. Die differentielle Regulierung der Expression scheint somit schon auf der transkriptionellen Ebene angesiedelt. Ebenfalls zeigen konnten wir ein deutlich erhöhtes Niveau von $p75^{NTR}$ -mRNA gegenüber dem cerebellären Referenzgewebe. Hier sehen wir einen deutlichen Hinweis auf eine tumorbiologische Induktion des Rezeptors jenseits der Beibehaltung der Eigenschaften des Ursprungsgewebes. Eine Zuordnung verschiedener Expressionsmuster der Trk-Rezeptoren zu den unterschiedlichen Allelstatus ergaben sich in den ergänzenden RT-PCR Untersuchungen nicht. Dieses Ergebnis lässt die gefundenen Allelverluste als Ursache für die divergente Expression des $p75^{NTR}$ in der cerebellären Tumorigenese unwahrscheinlich erscheinen, ebenso scheint $p75^{NTR}$ nicht der im Rahmen der Allelverluste primär betroffene Tumorsuppressor zu sein. Dies eröffnet die Frage nach alternativen Kandidatengenen, hierunter erscheint insbesondere das BRCA1-Gen interessant für weiterführende Analysen (Miki et al., 1994).

Da offenbar sowohl Allelverluste als auch Mutationen als Ursache für die fehlende Expression von $p75^{NTR}$ in klassischen Medulloblastomen ausscheiden, stellt sich die Frage nach alternativen Mechanismen. Eine in Tumoren häufige biologische Ursache einer reduzierten transkriptionellen Aktivität eines Gens besteht in epigenetischen Methylierungsvorgängen (Jones und Baylin, 2002). Hierbei werden CpG-Inseln, welche in 5'-Abschnitten von Genen - insbesondere ihren Promotorregionen - gehäuft vorliegen, durch Methylierungen von Cytosinen modifiziert. Resultat ist dann eine verringerte Akzessibilität u.a. für Transkriptionsfaktoren.

Aufgrund des Vorhandenseins von CpG-Inseln im Promotorbereich des $p75^{NTR}$ -Gens kommt die DNA-Hypermethylierung als Ursache für die variantenspezifische Expression von $p75^{NTR}$ in Frage. Bei Fehlen diskrepanter Methylierungsmuster in klassischen und desmoplastischen Tumoren sowie den fetalen Kontrollgeweben konnten wir pathogenetisch relevante Hypermethylierungen der untersuchten 5'-Sequenz des $p75^{NTR}$ -Gens ausschließen. Trotz des unveränderten Methylierungsmusters sind andere epigenetische Mechanismen als potentielle Ursache der divergenten Expression weiterhin möglich: so stellt sich die Möglichkeit

eines variantenspezifischen Histon-Kodes dar, der im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden konnte.

Tumorbiologie des Medulloblastoms

Jenseits genetischer und epigenetischer Aspekte stellt sich umso mehr die Frage nach einer funktionellen Einbindung des $p75^{NTR}$ in „übergeordnete“ Signalwege. Daher untersuchten wir, ob primär tumorbiologische Eigenschaften der Varianten des MB die gefundenen transkriptionellen Unterschiede begründen können. Ein möglicher regulatorischer Zusammenhang könnte aus der spezifischen Aktivität des Shh / Patched Signalwegs in desmoplastischen Medulloblastomen resultieren (Goodrich et al., 1997; Pietsch et al., 1997; Raffel et al., 1997). Die Induktion verschiedener Zielgene in der Folge einer gesteigerten Shh / Patched Signalwegsaktivität in desmoplastischen Tumoren ist beschrieben (Pomeroy et al., 2002; Zhao et al., 2002), wobei $p75^{NTR}$ in diesem Zusammenhang bisher nicht auffiel. Mit der Stimulation muriner Körnerzellvorläufer durch das rekombinante Protein Shh steht uns ein etabliertes *in-vitro*-Modell der cerebellären Tumorigenese zur Verfügung. Shh aktiviert dabei die für Körnerzellprogenitoren essentielle Hedgehog-Signalgebung. Shh führt sowohl zu einem deutlichen Proliferationsanstieg der GCPs als auch zu einer verminderten Differenzierung (Dahmane und Ruiz i Altaba, 1999; Kenney und Rowitch, 2000; Wechsler-Reya und Scott, 1999).

Unsere Untersuchungen in diesem System offenbarten eine um das 5-fach erhöhte $p75^{NTR}$ -Expression durch Shh in nativen murinen Körnerzellprogenitoren, was den Rezeptor als Zielgen charakterisiert. Das Korrelat im „maturen“ Tumor stellt die $p75^{NTR}$ -Expression in der desmoplastischen Variante mit der aktivierten Hedgehog-Signalgebung dar. Eine solche Rolle des $p75^{NTR}$ als transkriptionelles Zielgen des Hedgehog-Signalwegs ist in Gehirntumoren bisher nicht beschrieben. Das gleichzeitige Vorhandensein eines aktivierten Hedgehog-Signalwegs und einer konsistenten $p75^{NTR}$ -Expression ist auch für das klarzellige Sarkom der Niere beschrieben, ein Indiz für einen entitätsübergeordneten Zusammenhang (Cutcliffe et al., 2005). Als mögliche Mediatoren der Hedgehog-bedingten Hochregulation der $p75^{NTR}$ -Expression kommen die Zink-Finger Proteine Gli1 und Gli2 in Frage. Die Gli-Proteine sind wichtige Ziele der Hedgehog-Kaskade und verantwortlich für die Aktivierung unterschiedlicher Shh-Zielgene während der neuronalen Entwicklung (Ruiz i Altaba, 1998; Ruiz et al., 2002). Zudem ist eine Deregulierung der Shh-Gli1

Signalgebung in der Pathogenese verschiedener cerebraler Tumoren, einschließlich des Medulloblastoms, beschrieben (Dahmane et al., 2001). Kinzler und Vogelstein (1990) gelang erstmals die Identifikation eines Gli1-Bindungsmotivs im Promotorbereich transkriptioneller Zielgene, weitere putative Bindungsmotive sind mittlerweile dazugekommen (Yoon et al., 2002). Ein solches potentiell Gli1-Bindungsmotiv ließ sich innerhalb der regulativen 5'-Region (5000 bp) des murinen $p75^{NTR}$ -Gens in einer Datenbankrecherche (<http://www.ensembl.org>) nicht finden. Dies deutet darauf hin, dass $p75^{NTR}$ ein indirektes Zielgen ist.

Zur Bestätigung der *in-vitro*-Ergebnisse erfolgte eine immunhistochemische Aufarbeitung muriner Medulloblastome aus *ptc*^{+/-} Tieren. Diese Mäuse besitzen eine inaktivierende *ptc*-Mutation und entwickeln frühzeitig Medulloblastome des Kleinhirns, deren Pathogenese einer übermäßigen Aktivierung des Shh / *ptc* Signalwegs zugeschrieben wird (Goodrich et al., 1997). Die von uns immunhistochemisch nachgewiesene deutliche Expression von murinem $p75^{NTR}$ in solchen Tumoren deuten wir analog zu den oben diskutierten *in-vitro*-Ergebnissen als Folge der Aktivität des murinen Hedgehog-Signalwegs *in vivo*. Neben der erwarteten Bestätigung der funktionellen Einbindung des $p75^{NTR}$ in die cerebelläre Tumorgenese ergab sich hier ein zusätzlicher Hinweis auf den desmoplastischen Charakter von Tumoren solcher Genese. Passend zum bekannten Signalwegsgeschehen konnten wir auch in murinen Präparaten der Entwicklungsstufen der cerebellären Organogenese ein hohes $p75^{NTR}$ -Niveau detektieren. Ähnliche Untersuchungen konnten wir somit bestätigen (Carter et al., 2003).

Funktionelle Untersuchung des $p75^{NTR}$

Weitgehende Unklarheit besteht hinsichtlich der molekularen Effekte des $p75^{NTR}$ auf zellulärer Ebene in MB. Ein antiproliferativer Effekt des Rezeptors wäre mit der besseren Prognose der desmoplastischen Variante sinnvoll in Einklang zu bringen. Um Aufschluss über mögliche Konsequenzen der $p75^{NTR}$ -Expression zu erhalten, erfolgte die stabile Transfektion der MB-Zelllinie D283MED mit verschiedenen $p75^{NTR}$ -Konstrukten unter Verwendung eines induzierbaren Systems. Ein ähnliches Modell wurde zuerst an der striatalen Zelllinie ST14A etabliert (Wang et al., 2001). Neben einem vollständigen $p75^{NTR}$ -Konstrukt ($p75^{NTR}$ -FL) und einem leeren Kontrollvektor standen zwei trunkierte Konstrukte mit einer defizienten Death-Domain

(p75^{NTR}- Δ DD), sowie einem defizienten intrazellulären Anteil (p75^{NTR}- Δ ICD) zur Verfügung, so dass mögliche Effekte einzelnen Rezeptordomänen zugeordnet werden können.

Unterschiedliche Faktoren nehmen Einfluss auf das zelluläre Wachstum und sind somit von Interesse: proliferative Aktivität, Apoptose und Zellzyklusverteilung (G1, S, G2). Sämtliche zelluläre Parameter ließen sich in einer einzelnen durchflusszytometrischen Untersuchung darstellen. Die Zelllinie D283MED stammt von einem klassischen Medulloblastom (Friedman et al., 1985). Endogene Expression von p75^{NTR} wurde für die Linie D283MED ausgeschlossen (Pleasure et al., 1990), p75^{NTR}-Signalgebungen abseits der eingebrachten Rezeptorvarianten sind daher nicht zu erwarten. Die endogene Ausstattung der Zelllinie D283MED mit Faktoren des Neurotrophinsystems umfasst die Rezeptoren TrkA und TrkB sowie die Neurotrophine NGF und BDNF (Chiappa et al., 1999) eigene Untersuchungen). NGF ist als Ligand des p75^{NTR} vielfach beschrieben (Chao et al., 1986; Johnson und Taniuchi, 1987) und wird in Medulloblastomen beider Varianten exprimiert (Washiyama et al., 1996). Proliferationsversuche mit NGF zeigen für die Zelllinie D283MED gleichbleibende Zellteilungsraten (Muragaki et al., 1997). Ein dominant negativer Effekt im Sinne eines Antagonisten des nativen p75^{NTR} (Khawaja et al., 2004) kommt den beiden verwandten deletären p75^{NTR}-Konstrukten aufgrund der fehlenden eigenen Rezeptorexpression in unserem Zellsystem nicht zu.

Über die intrazellulären Protein-Bindungsfaktoren NRAGE (Salehi et al., 2002) und SC1 (Chittka et al., 2004) sind p75^{NTR}-abhängige Störungen des Zellzyklus beschrieben. In unserer durchflusszytometrischen Analyse präsentierte sich die Population pHH3-positiver, mitotischer Zellen in allen mit unterschiedlichen p75^{NTR}-Konstrukten transfizierten Zelllinien konstant. Auch die selektive Stimulation mit NGF führte zu keiner signifikanten Veränderung der pHH3-positiven Population. Ein direkter Einfluss der überexprimierten p75^{NTR}-Varianten auf die proliferative Aktivität ist somit unwahrscheinlich. Beschriebene wachstumsfördernde Effekte des p75^{NTR} über den PI3K / AKT Signalweg (Roux et al., 2001) oder NF-(kappa)B (Carter et al., 1996) lassen sich in unserem Zellsystem ebenfalls ausschließen. Einschränkend muss die zeitlich sehr begrenzte Expression von pPH3 in frühmitotischen Zellen berücksichtigt werden (Goto et al., 1999). Damit lässt sich nur ein kleiner Teil der sich in Teilung befindenden Zellen abbilden, so dass diskrete Veränderungen einer solchen Analyse entgehen können.

Als weiterer biologisch relevanter Effekt käme eine Verschiebung in der Zellzyklusverteilung der transfizierten Zellen in Betracht. Effekte des p75^{NTR} auf zellzyklusregulierende Proteine sind vereinzelt beschrieben und zeigen einen möglichen Wiedereintritt postmitotischer Zellen in den Zellzyklus nach NGF-Stimulation (Frade, 2000). In den von uns durchgeführten Untersuchungen stellte sich die Verteilung der Zellen auf die drei Zellzyklen, auch unter selektiver NGF-Inkubation, in allen analysierten Zelllinien annähernd gleichartig dar. Die einzige Signifikanz ergab sich bei der Zelllinie D283- Δ ICD; hier erhöhte sich der Anteil der S-Phase nach der NGF-Inkubation von 11,9 % auf 13,7 %. Mögliche Erklärung böte hier die Signalgebung über die Trk-Rezeptoren, insbesondere TrkA, die mitogene Effekte vermitteln (Huang und Reichardt, 2003). Zwar müsste vor diesem Hintergrund zumindest die Zelllinie D283-Ctrl eine ähnliche Reaktion zeigen, doch ließe sich die isolierte Reaktion der Linie D283- Δ ICD mit einer Sensibilisierung der Trk-Rezeptoren durch die trunkierte p75^{NTR}-Variante erklären. Trunkierte p75^{NTR}-Konstrukte besitzen eine deutlich höhere Affinität zu den Trk-Rezeptoren als das vollständige p75^{NTR}-Protein und verstärken dessen Signalgebung (Hempstead et al., 1991). Insgesamt sind die Schwankungen im DNA-Histogramm allerdings zu gering, um eine eindeutige Aussage hinsichtlich möglicher Mechanismen treffen zu können. Apoptose als Ziel der p75^{NTR}-vermittelten Signalgebung ist in unterschiedlichen zellulären Kontexten beschrieben; Überexpression sowie NGF-abhängige Aktivierung des p75^{NTR} sind dafür voraussetzend (Rabizadeh et al., 1993; Roux und Barker, 2002).

Ohne exogene NGF-Stimulation zeigten die vier untersuchten Zelllinien nur diskrete Unterschiede hinsichtlich der Fraktionen apoptotischer Zellen. Die aufgrund der beschriebenen endogenen NGF-Expression erwartete p75^{NTR}-Wirkung im Sinne eines höheren Anteils cPARP-positiver Zellen bestätigte sich zumindest in der D283-FL Linie nicht. Hier stellt sich die Fragen nach dem Ausmaß der NGF-Produktion der Zellen, bzw. ob die NGF-Konzentration im Medium für eine autokrine Stimulation hinreichend ist.

Interessante Ergebnisse ergaben sich nach der Inkubation mit rekombinantem NGF. Für die D283-Ctrl fanden wir bei fehlender Expression des Rezeptors erwartungsgemäß keine p75^{NTR}-abhängigen spezifischen Effekte. Ein theoretischer zytoprotektiver Effekt im Sinne einer verringerten Apoptoserate aufgrund der NGF-abhängigen Stimulation der zelleigenen TrA-Rezeptoren zeigte sich ebenfalls nicht.

Mögliche Ursache könnte die Durchführung der Zellversuche unter 1 %-serumenthaltenen Medium-Bedingungen sein. Relevante NGF Konzentrationen im verwendeten Medium könnten so auch die nicht mit zusätzlich rekombinantem NGF inkubierten Zellen beeinflusst haben. Eine Maskierung der NGF-Wirkung durch Liganden im Serum käme ebenso in Frage.

Während eine Reaktion der Zelllinie D283-Ctrl ausblieb, vergrößerte sich die Population cPARP-positiver Zellen in der Zelllinie D283-FL von ~2,5 % auf 11 %; ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate. In der Zelllinie D283- Δ DD erhöhte sich der Anteil cPARP-positiver Zellen nach der Stimulation durch NGF von ~2,5 % auf ~7,5 %; ebenfalls eine signifikante Apoptoseinduktion, die in ihrem Ausmaß aber die Erhöhung der Zelllinie D283-FL nicht erreicht. Beide Rezeptorvarianten (p75^{NTR}-FL und p75^{NTR}- Δ DD) tragen demnach in unserem Zellsystem zur Erhöhung der Apoptoserate bei, wobei der DD offenbar eine wesentliche wenn auch nicht erschöpfende Rolle zukommt. Zusätzlich konnten wir die Abhängigkeit dieses Prozesses von der Gegenwart eines neurotrophen Liganden des p75^{NTR} zeigen. Für die zelluläre Induktion von Apoptose durch den p75^{NTR} besonders relevant ist die Anbindung an den JNK-Signalweg (Casaccia-Bonofil et al., 1996). Die genaue Schnittstelle zwischen dem Rezeptor und dem JNK-Signalweg ist nicht bekannt, es scheinen verschiedene Bindungsstellen beteiligt zu sein. Strukturtypische intrazelluläre Elemente des p75^{NTR}-Rezeptors sind die intrazelluläre DD (Liepinsh et al., 1997) und die hochkonservierte juxtamembranäre Region (JM) mit ihren zahlreichen Protein-Bindungsmotiven (Large et al., 1989). Eine proapoptotische Funktion ist für beide Domänen nachgewiesen: an der striatalen Zelllinie ST14A lässt sich die Abhängigkeit der p75^{NTR}-vermittelten Apoptoseinduktion vom Vorhandensein der DD nachweisen (Wang et al., 2001), andererseits beschreiben Coulson et al. (2000) proapoptotische Effekte an trunkierten, DD-defizienten p75^{NTR}-Rezeptoren in sensorischen Nervenzellen. In unserem *in-vitro*-System können wir erstmals eine funktionelle Relevanz beider Rezeptordomänen (JM und DD) in MB-Zellen zeigen.

Verschiedene Interaktionspartner der entwicklungs geschichtlich hochkonservierten JM sind beschrieben (Large et al., 1989). In Verbindung mit der Induktion von Apoptose durch den JNK-Signalweg werden vorrangig folgende putative Bindungsproteine diskutiert: NRIF (Casademunt et al., 1999), NRAGE (Salehi et al., 2002), TRAF4 (Krajewska et al., 1998) und TRAF6 (Khursigara et al., 1999). Besonders NRIF scheint in der Auslösung von Zelltod eine wichtige Stellung

einzunehmen (Linggi et al., 2005). NRIF wird in einem Komplex mit dem ligandenabhängig durch α - und γ -Sekretase freigesetzten $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptorteil in den Kern transferiert (Frade, 2005; Kanning et al., 2003; Kenchappa et al., 2006). Weitere Voraussetzung für diesen proapoptotischen Prozess ist die TRAF6-abhängige Ubiquitinierung von NRIF (Geetha et al., 2005). Da die Bindungsstellen sowohl von TRAF6 als auch von NRIF in unserem $p75^{\text{NTR}}$ - Δ DD Konstrukt noch vorhanden sind, lässt sich die von uns beobachtete „reduzierte“ Apoptoseinduktion in den D283- $p75^{\text{NTR}}$ - Δ DD Zellen so hinreichend erklären.

Die in Relation zur Linie D283- Δ DD in D283-FL Zellen höhere PARP-positive Population deutet auf die zusätzliche Bedeutung der DD in der Induktion von Apoptose hin. Entgegen den typischen Bindungs- und Struktureigenschaften der DD in anderen Rezeptoren der TNFR-Familie scheint die DD des $p75^{\text{NTR}}$ verändert (Kong et al., 1999; Liepinsh et al., 1997). Als Apoptose-induzierender Bindungspartner der DD des $p75^{\text{NTR}}$ ist NADE beschrieben (Mukai et al., 2000; Mukai et al., 2002).

Die Linie D283- Δ ICD zeigte keine signifikante Induktion der Apoptose als Reaktion auf die NGF-Inkubation. Eine $p75^{\text{NTR}}$ -abhängige Reaktion scheint damit zumindest einen Teil des intrazellulären Rezeptoranteils vorauszusetzen. Mögliche isolierte Effekte eines trunkierten $p75^{\text{NTR}}$ -Konstrukts sind nicht beschrieben. Hantzopoulos et al. (1994) beschreiben allerdings eine gesteigerte Affinität eines derart trunkierten $p75^{\text{NTR}}$ -Konstrukts zu den Trk-Rezeptoren und damit einhergehend einen positiv regulativen Einfluss auf die antiapoptotische Trk-Aktivität; diesen Effekt können wir in unseren Untersuchungen nicht nachvollziehen (Hantzopoulos et al., 1994). Die Zelllinie D283- Δ ICD zeigte keine Verminderung der Apoptose nach NGF-Inkubation, so dass zytoprotektive Effekte aufgrund einer gesteigerten Trk-Aktivität in unserem Zellsystem keine relevante Rolle zu spielen scheinen. Eine Diskussion der Analyseergebnisse hinsichtlich einer potentiellen Rolle des $p75^{\text{NTR}}$ als dominant negativer Antagonist alternativer NGF-Rezeptorbindungen wie der TrkA-Aktivierung erscheint so ebenfalls nicht relevant. Die Versuche mit den trunkierten Konstrukten bestätigen die Spezifität der gefundenen $p75^{\text{NTR}}$ -FL-Effekte.

Die Markierung apoptotischer Zellen durch die nukleäre Färbung von cPARP stellt ein etabliertes Modell zur quantitativen Darstellung von Apoptose dar, erlaubt jedoch keine direkte Beurteilung der Zellen. Ein weiterer Unterschied im Gegensatz zur morphologischen Beurteilung besteht in dem Zeitpunkt, zu dem die apoptotischen

Zellen erfasst werden. Während die cPARP-Färbung Zellen der frühen Apoptose anfärbt, werden mittels morphologischer Charakteristika Zellen der fortgeschrittenen Apoptose bestimmt. Die Ergebnisse der DAPI-Färbung präsentierten sich in ihrer Tendenz den Ergebnissen der Durchflusszytometrie gleichgerichtet. Eine Induktion der Apoptose nach der Inkubation mit NGF zeigte sich auch mit dieser Methodik in der Zelllinie D283-FL deutlich und in der Linie D283- Δ DD geringer. In beiden Zelllinien stieg die Apoptoserate signifikant. Abweichend von den Ergebnissen der Durchflusszytometrie zeigten sich lediglich die Apoptoseraten zwischen den unterschiedlichen Zelllinien ohne exogene NGF-Stimulation. Schon vor diesem Hintergrund zeigten die Linien D283-FL und D283- Δ DD im Gegensatz zu den Linien D283-Ctrl und D283- Δ ICD eine erhöhte Apoptoserate, ein Hinweis auf eine vorangegangene endogene Stimulation der p75^{NTR}-Proteine.

Neben der Expression von p75^{NTR} in desmoplastischen Tumoren ist das Vorhandensein der Liganden des p75^{NTR}, den Neurotrophenen, in Medulloblastomen vielfach beschrieben (Washiyama et al., 1996) und ermöglicht somit eine Übertragung des Zellmodells auf die *in-vivo*-Tumorbiologie desmoplastischer Medulloblastome. Eine Bedeutung in der Realisierung proapoptotischer Wirkung scheint dabei sowohl der intrazellulären JM als auch der DD zuzukommen. Eine Zunahme der Apoptoserate einer Zellpopulation führt bei gleichbleibender Zellteilungsrate konsekutiv zu einem gedrosselten Zellwachstum.

So erscheint der p75^{NTR} vor dem Hintergrund der funktionellen Untersuchungen als protektiver Faktor der desmoplastischen Variante; die bessere Prognose solcher Tumoren lässt sich damit auf zellulärer Ebene nachvollziehen. Pizem et al. (2005) zeigen eine Assoziation der DMB mit einer erhöhten Apoptoserate. Die Relevanz der Apoptoserate als prognostischer Marker wird zur Zeit noch unterschiedlich diskutiert (Korshunov et al., 2002; Ohta et al., 2006). Auch in anderen Malignomen, u.a. akuten lymphatischen B-Zell-Leukämien des Kindes (Troeger et al., 2007) und Pankreskarzinomen (Dang et al., 2006) wird Expression des p75^{NTR} mit einer besseren Prognose assoziiert.

Ursachen des divergenten p75^{NTR}-Expressionsstatus in klassischen und desmoplastischen Tumoren konnten wir auf genetischer Ebene nicht identifizieren. Allerdings konnte ein Zusammenhang mit der variantenspezifischen Aktivität der Hedgehogkaskade in DMB nachvollzogen werden. Somit eröffnet sich die Möglichkeiten einer gezielten Induktion und Aktivierung des p75^{NTR} in

Medulloblastomen *in vivo*. Vielversprechend erscheint die gezielte Induktion von p75^{NTR} Expression in klassischen Tumoren. Khwaja et al. (Khwaja et al., 2004) beschreiben einen Mechanismus der p75^{NTR}-Induktion mit subsequenter Apoptoseinduktion durch Wirkstoffe aus der Klasse der nichtsteroidalen Antiphlogistika in einer von einem Urothelkarzinom abgeleiteten Zelllinie. In ersten Versuchen konnten wir diesen Mechanismus auch an Medulloblastomzelllinien nachvollziehen und sehen hier einen erfolgversprechenden Ansatzpunkt für die Identifizierung neuartiger Therapiestrategien des Medulloblastoms.

6 Zusammenfassung

Das Medulloblastom ist das häufigste cerebrale Malignom der Kindheit. Die Mehrheit dieser Tumoren lässt sich histologisch einer klassischen oder desmoplastischen Variante zuordnen. Unterschiede zwischen beiden Varianten bestehen sowohl in der molekularen Pathogenese als auch hinsichtlich der Prognose. Für Patienten mit desmoplastischen Medulloblastomen sind signifikant höhere Überlebensraten beschrieben; zudem weisen solche Tumoren eine variantenspezifische Expression des p75^{NTR}-Oberflächenrezeptors auf, dem in verschiedenen Tumorgeweben wachstumshemmende Effekte zugeschrieben werden.

In einer Mikrosatellitenanalyse an 58 Tumoren konnten wir Hinweise auf Allel-Verluste des chromosomalen Lokus des p75^{NTR}-Gens in 10 von 58 Tumoren (17 %) finden. Diese Veränderungen verteilten sich dabei nahezu in gleichen Anteilen auf beide Varianten. Vergleichende Analysen der p75^{NTR}-mRNA Expression zeigten eine selektive Expression des p75^{NTR} in desmoplastischen Tumoren, jedoch keine Korrelation zum Allelstatus. In einem Kollektiv von 73 Tumoren fanden sich in einer anschließenden Mutationsanalyse des p75^{NTR}-Gens bis auf die Sequenzänderung c.441G>A;V106M in einem klassischen MB keine Hinweise auf somatische Sequenzalterationen; eine Ursache für die divergente Expression des Rezeptors konnten wir auf genetischer Ebene somit ausschließen.

Auch auf epigenetischer Ebene fanden sich in einer Analyse des CpG-Methylierungsstatus der 5' Region des p75^{NTR}-Gens in 6 Tumoren keine variantenspezifischen Veränderungen.

Mit der Frage, ob die p75^{NTR}-Expression desmoplastischer Tumoren im Zusammenhang mit der Aktivität der in diesen Tumoren aktivierten Sonic-Hedgehog /

Patched-Kaskade steht, wurden murine Körnerzellprogenitoren, für deren Wachstum die Hedgehog-Signalgebung essentiell ist, untersucht. Anhand dieses *in-vitro*-Modells konnten wir p75^{NTR} als transkriptionelles Zielgen des Shh / Patched Signalweges identifizieren. An murinen Medulloblastomen ptc-hemidefizienter Mäuse konnten wir diese Ergebnisse bestätigen. In funktionellen Studien in humanen MB-Zellen wurden die vollständige p75^{NTR}-kodierende Sequenz sowie zwei unterschiedliche deletäre Konstrukte des Rezeptors in einem induzierbaren Vektorsystem überexprimiert. In durchflusszytometrischen Experimenten in diesem Zellmodell fand sich eine deutlich erhöhte Apoptoserate der p75^{NTR}-überexprimierenden Zellen als Antwort auf die Stimulation durch den Rezeptorliganden NGF. Anhand von Untersuchungen trunkierter p75^{NTR}-Varianten konnte gezeigt werden, dass sowohl der juxtamembranäre Bereich als auch die Todesdomäne des Rezeptors für die Apoptoseinduktion von Relevanz sind. Durch zellmorphologische Studien ließen sich diese Ergebnisse bestätigen.

Die funktionellen Untersuchungen deuten eine wichtige Rolle von p75^{NTR} in desmoplastischen Medulloblastomen an, welche mit der besseren Prognose solcher Tumoren in Einklang steht. Innovative Konzepte, die auf einer Induktion des p75^{NTR} auch in klassischen MB basieren, erscheinen somit erfolgversprechend für zukünftige Therapieansätze.

7 Literaturverzeichnis

- Abujiang P, Mori TJ, Takahashi T, Tanaka F, Kasyu I, Hitomi S, Hiai H. Loss of heterozygosity (LOH) at 17q and 14q in human lung cancers. *Oncogene* 1998; 17: 3029-3033
- Adesina AM, Nalbantoglu J, Cavenee WK. p53 gene mutation and mdm2 gene amplification are uncommon in medulloblastoma. *Cancer Res* 1994; 54: 5649-5651
- Albrecht S, von Deimling A, Pietsch T, Giangaspero F, Brandner S, Kleihues P, Wiestler OD. Microsatellite analysis of loss of heterozygosity on chromosomes 9q, 11p and 17p in medulloblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994; 20: 74-81
- Aldosari N, Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH. Characterization of chromosome 17 abnormalities in medulloblastomas. *Acta Neuropathol* 2000; 99: 345-351
- Arseni C, Ciurea AV. Statistical survey of 276 cases of medulloblastoma (1935--1978). *Acta Neurochir (Wien)* 1981; 57: 159-162
- Badiali M, Pession A, Basso G, Andreini L, Rigobello L, Galassi E, Giangaspero F. N-myc and c-myc oncogenes amplification in medulloblastomas. Evidence of particularly aggressive behavior of a tumor with c-myc amplification. *Tumori* 1991; 77: 118-121
- Baldwin AN, Bitler CM, Welcher AA, Shooter EM. Studies on the structure and binding properties of the cysteine-rich domain of rat low affinity nerve growth factor receptor (p75NGFR). *J Biol Chem* 1992; 267: 8352-8359
- Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Belliveau DJ, Aloyz R, Kohn J, Causing CG, Miller FD. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol* 1998; 140: 911-923
- Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 1994; 25: 1386-1403
- Barker PA, Barbee G, Misko TP, Shooter EM. The low affinity neurotrophin receptor, p75LNTR, is palmitoylated by thioester formation through cysteine 279. *J Biol Chem* 1994; 269: 30645-30650
- Barker PA, Shooter EM. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* 1994; 13: 203-215
- Batra SK, Rasheed BK, Bigner SH, Bigner DD. Oncogenes and anti-oncogenes in human central nervous system tumors. *Lab Invest* 1994; 71: 621-637
- Benedetti M, Levi A, Chao MV. Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 7859-7863
- Benitez J, Osorio A, Barroso A, Arranz E, Diaz-Guillen MA, Robledo M, Rodriguez de Cordoba S, Heine-Suner D. A region of allelic imbalance in 1q31-32 in primary breast cancer coincides with a recombination hot spot. *Cancer Res* 1997; 57: 4217-4220
- Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 2000; 14: 2919-2937

- Bickerstaff ER, Connolly RC, Woolf AL. Cerebellar medulloblastoma occurring in brothers. *Acta Neuropathol (Berl)* 1967; 8: 104-107
- Biegel JA, Burk CD, Barr FG, Emanuel BS. Evidence for a 17p tumor related locus distinct from p53 in pediatric primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 1992; 52: 3391-3395
- Bigner SH, Friedman HS, Vogelstein B, Oakes WJ, Bigner DD. Amplification of the c-myc gene in human medulloblastoma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 1990; 50: 2347-2350
- Bigner SH, Mark J, Friedman HS, Biegel JA, Bigner DD. Structural chromosomal abnormalities in human medulloblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 30: 91-101
- Bishop DF, Henderson AS, Astrin KH. Human delta-aminolevulinate synthase: assignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid-specific gene to the X chromosome. *Genomics* 1990; 7: 207-214
- Blin N, Stephenson EC, Stafford DW. Isolation and some properties of a mammalian ribosomal DNA. *Chromosoma* 1976; 58: 41-50
- Bock C, Reither S, Mikeska T, Paulsen M, Walter J, Lengauer T. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* 2005; 21: 4067-4068
- Bothwell M. Keeping track of neurotrophin receptors. *Cell* 1991; 65: 915-918
- Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 2001; 20: 6482-6491
- Buck CR, Martinez HJ, Black IB, Chao MV. Developmentally regulated expression of the nerve growth factor receptor gene in the periphery and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 3060-3063
- Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 137-144
- Burger PC, Grahmann FC, Bliedle A, Kleihues P. Differentiation in the medulloblastoma. A histological and immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 1987; 73: 115-123
- Bühren J, Christoph AH, Buslei R, Albrecht S, Wiestler OD, Pietsch T. Expression of the neurotrophin receptor p75NTR in medulloblastomas is correlated with distinct histological and clinical features: evidence for a medulloblastoma subtype derived from the external granule cell layer. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 229-240
- Carter AR, Berry EM, Segal RA. Regional expression of p75NTR contributes to neurotrophin regulation of cerebellar patterning. *Mol Cell Neurosci* 2003; 22: 1-13
- Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaei R, Baeuerle PA, Barde YA. Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 1996; 272: 542-545
- Casaccia-Bonnet P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 1996; 383: 716-719

Casademunt E, Carter BD, Benzel I, Frade JM, Dechant G, Barde YA. The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *Embo J* 1999; 18: 6050-6061

Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 299-309

Chao MV, Bothwell MA, Ross AH, Koprowski H, Lanahan AA, Buck CR, Sehgal A. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* 1986; 232: 518-521

Chapman BS, Kuntz ID. Modeled structure of the 75-kDa neurotrophin receptor. *Protein Sci* 1995; 4: 1696-1707

Chiappa SA, Chin LS, Zurawel RH, Raffel C. Neurotrophins and Trk receptors in primitive neuroectodermal tumor cell lines. *Neurosurgery* 1999; 45: 1148-1154; discussion 1154-1145

Chittka A, Arevalo JC, Rodriguez-Guzman M, Perez P, Chao MV, Sendtner M. The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J Cell Biol* 2004; 164: 985-996

Cogen PH, McDonald JD. Tumor suppressor genes and medulloblastoma. *J Neurooncol* 1996; 29: 103-112

Coulson EJ, Reid K, Baca M, Shipham KA, Hulett SM, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J Biol Chem* 2000; 275: 30537-30545

Cropp CS, Champeme MH, Lidereau R, Callahan R. Identification of three regions on chromosome 17q in primary human breast carcinomas which are frequently deleted. *Cancer Res* 1993; 53: 5617-5619

Cutcliffe C, Kersey D, Huang CC, Zeng Y, Walterhouse D, Perlman EJ. Clear cell sarcoma of the kidney: up-regulation of neural markers with activation of the sonic hedgehog and Akt pathways. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7986-7994

Dahmane N, Ruiz i Altaba A. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 1999; 126: 3089-3100

Dahmane N, Sanchez P, Gitton Y, Palma V, Sun T, Beyna M, Weiner H, Ruiz i Altaba A. The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* 2001; 128: 5201-5212

Dang C, Zhang Y, Ma Q, Shimahara Y. Expression of nerve growth factor receptors is correlated with progression and prognosis of human pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 850-858

Dean M. Polarity, proliferation and the hedgehog pathway. *Nat Genet* 1996; 14: 245-247

Dechant G, Barde YA. Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 413-418

Dimaras H, Coburn B, Pajovic S, Gallie BL. Loss of p75 neurotrophin receptor expression accompanies malignant progression to human and murine retinoblastoma. *Mol Carcinog* 2006; 45: 333-343

- Dostaler SM, Ross GM, Myers SM, Weaver DF, Ananthanarayanan V, Riopelle RJ. Characterization of a distinctive motif of the low molecular weight neurotrophin receptor that modulates NGF-mediated neurite growth. *Eur J Neurosci* 1996; 8: 870-879
- Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, Hempstead BL. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem* 2001; 276: 32687-32695
- Farinas I, Wilkinson GA, Backus C, Reichardt LF, Patapoutian A. Characterization of neurotrophin and Trk receptor functions in developing sensory ganglia: direct NT-3 activation of TrkB neurons in vivo. *Neuron* 1998; 21: 325-334
- Farwell J, Flannery JT. Cancer in relatives of children with central-nervous-system neoplasms. *N Engl J Med* 1984; 311: 749-753
- Farwell JR, Dohrmann GJ, Flannery JT. Medulloblastoma in childhood: an epidemiological study. *J Neurosurg* 1984; 61: 657-664
- Frade JM. NRAGE and the cycling side of the neurotrophin receptor p75. *Trends Neurosci* 2000; 23: 591-592
- Frade JM. Nuclear translocation of the p75 neurotrophin receptor cytoplasmic domain in response to neurotrophin binding. *J Neurosci* 2005; 25: 1407-1411
- Frade JM. Unscheduled re-entry into the cell cycle induced by NGF precedes cell death in nascent retinal neurones. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 7): 1139-1148
- Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 1996; 383: 166-168
- Friedman HS, Burger PC, Bigner SH, Trojanowski JQ, Wikstrand CJ, Halperin EC, Bigner DD. Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 Med. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985; 44: 592-605
- Frühwald MC, O'Dorisio MS, Dai Z, Tanner SM, Balster DA, Gao X, Wright FA, Plass C. Aberrant promoter methylation of previously unidentified target genes is a common abnormality in medulloblastomas--implications for tumor biology and potential clinical utility. *Oncogene* 2001; 20: 5033-5042
- Geetha T, Jiang J, Wooten MW. Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* 2005; 20: 301-312
- Geetha T, Kenchappa RS, Wooten MW, Carter BD. TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *Embo J* 2005; 24: 3859-3868
- Giangaspero F, Chieco P, Ceccarelli C, Lisignoli G, Pozzuoli R, Gambacorta M, Rossi G, Burger PC. "Desmoplastic" versus "classic" medulloblastoma: comparison of DNA content, histopathology and differentiation. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1991; 418: 207-214
- Giordana MT, Schiffer P, Lanotte M, Girardi P, Chio A. Epidemiology of adult medulloblastoma. *Int J Cancer* 1999; 80: 689-692
- Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 1997; 277: 1109-1113

Goodrich LV, Scott MP. Hedgehog and patched in neural development and disease. *Neuron* 1998; 21: 1243-1257

Goto H, Tomono Y, Ajiro K, Kosako H, Fujita M, Sakurai M, Okawa K, Iwamatsu A, Okigaki T, Takahashi T, Inagaki M. Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem* 1999; 274: 25543-25549

Griffin CA, Hawkins AL, Packer RJ, Rorke LB, Emanuel BS. Chromosome abnormalities in pediatric brain tumors. *Cancer Res* 1988; 48: 175-180

Grob PM, Ross AH, Koprowski H, Bothwell M. Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* 1985; 260: 8044-8049

Hagag N, Haleboua S, Viola M. Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to ras p21. *Nature* 1986; 319: 680-682

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B, Bale AE. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996; 85: 841-851

Hamada H, Kakunaga T. Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature* 1982; 298: 396-398

Hamanoue M, Middleton G, Wyatt S, Jaffray E, Hay RT, Davies AM. p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* 1999; 14: 28-40

Hantzopoulos PA, Suri C, Glass DJ, Goldfarb MP, Yancopoulos GD. The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron* 1994; 13: 187-201

Harrington AW, Kim JY, Yoon SO. Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci* 2002; 22: 156-166

Hartmann W, Koch A, Brune H, Waha A, Schuller U, Dani I, Denkhau D, Langmann W, Bode U, Wiestler OD, Schilling K, Pietsch T. Insulin-like growth factor II is involved in the proliferation control of medulloblastoma and its cerebellar precursor cells. *Am J Pathol* 2005; 166: 1153-1162

Haslam RH, Lamborn KR, Becker LE, Israel MA. Tumor cell apoptosis present at diagnosis may predict treatment outcome for patients with medulloblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998; 20: 520-527

Hayashi K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl* 1992; 9: 73-79

He XM, Wikstrand CJ, Friedman HS, Bigner SH, Pleasure S, Trojanowski JQ, Bigner DD. Differentiation characteristics of newly established medulloblastoma cell lines (D384 Med, D425 Med, and D458 Med) and their transplantable xenografts. *Lab Invest* 1991; 64: 833-843

- Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV. High-affinity NGF binding requires coexpression of the *trk* proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 1991; 350: 678-683
- Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 1997; 106: 348-360
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-9826
- Heuer JG, von Bartheld CS, Kinoshita Y, Evers PC, Bothwell M. Alternating phases of FGF receptor and NGF receptor expression in the developing chicken nervous system. *Neuron* 1990; 5: 283-296
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 677-736
- Huang EJ, Reichardt LF. *Trk* receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003; 72: 609-642
- Huang H, Mahler-Araujo BM, Sankila A, Chimelli L, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am J Pathol* 2000; 156: 433-437
- Hubbard JL, Scheithauer BW, Kispert DB, Carpenter SM, Wick MR, Laws ER, Jr. Adult cerebellar medulloblastomas: the pathological, radiographic, and clinical disease spectrum. *J Neurosurg* 1989; 70: 536-544
- Hung KL, Wu CM, Huang JS, How SW. Familial medulloblastoma in siblings: report in one family and review of the literature. *Surg Neurol* 1990; 33: 341-346
- Irie S, Hachiya T, Rabizadeh S, Maruyama W, Mukai J, Li Y, Reed JC, Bredesen DE, Sato TA. Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 1999; 460: 191-198
- Ito S, Hoshino T, Prados MD, Edwards MS. Cell kinetics of medulloblastomas. *Cancer* 1992; 70: 671-678
- Jacobsen LB, Calvin SA, Colvin KE, Wright M. FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods* 2004; 33: 104-112
- Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimitriou JM. Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985; 44: 472-485
- Johnson EM, Jr., Taniuchi M. Nerve growth factor (NGF) receptors in the central nervous system. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 4189-4195
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-428
- Kanning KC, Hudson M, Amieux PS, Wiley JC, Bothwell M, Schecterson LC. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci* 2003; 23: 5425-5436

Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 381-391

Katsetos CD, Burger PC. Medulloblastoma. *Semin Diagn Pathol* 1994; 11: 85-97

Katsetos CD, Herman MM, Frankfurter A, Gass P, Collins VP, Walker CC, Rosemberg S, Barnard RO, Rubinstein LJ. Cerebellar desmoplastic medulloblastomas. A further immunohistochemical characterization of the reticulin-free pale islands. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 1019-1029

Katsetos CD, Herman MM, Krishna L, Vender JR, Vinore SA, Agamanolis DP, Schiffer D, Burger PC, Urich H. Calbindin-D28k in subsets of medulloblastomas and in the human medulloblastoma cell line D283 Med. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119: 734-743

Kenchappa RS, Zampieri N, Chao MV, Barker PA, Teng HK, Hempstead BL, Carter BD. Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* 2006; 50: 219-232

Kenney AM, Rowitch DH. Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9055-9067

Khursigara G, Orlinick JR, Chao MV. Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem* 1999; 274: 2597-2600

Khwaja F, Allen J, Lynch J, Andrews P, Djakiew D. Ibuprofen inhibits survival of bladder cancer cells by induced expression of the p75NTR tumor suppressor protein. *Cancer Res* 2004; 64: 6207-6213

Kinzler KW, Vogelstein B. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 634-642

Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 820-823

Koch A, Tonn J, Kraus JA, Sørensen N, Albrecht NS, Wiestler OD, Pietsch T. Molecular analysis of the lissencephaly gene 1 (LIS-1) in medulloblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996; 22: 233-242

Kong H, Kim AH, Orlinick JR, Chao MV. A comparison of the cytoplasmic domains of the Fas receptor and the p75 neurotrophin receptor. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1133-1142

Korshunov A, Savostikova M, Ozerov S. Immunohistochemical markers for prognosis of average-risk pediatric medulloblastomas. The effect of apoptotic index, TrkC, and c-myc expression. *J Neurooncol* 2002; 58: 271-279

Krajewska M, Krajewski S, Zapata JM, Van Arsdale T, Gascoyne RD, Berern K, McFadden D, Shabaik A, Hugh J, Reynolds A, Clevenger CV, Reed JC. TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am J Pathol* 1998; 152: 1549-1561

Kruttgen A, Schneider I, Weis J. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Brain Pathol* 2006; 16: 304-310

Kuijten RR, Strom SS, Rorke LB, Boesel CP, Buckley JD, Meadows AT, Bunin GR. Family history of cancer and seizures in young children with brain tumors: a report from the

- Childrens Cancer Group (United States and Canada). *Cancer Causes Control* 1993; 4: 455-464
- Lacombe D, Chateil JF, Fontan D, Battin J. Medulloblastoma in the nevoid basal-cell carcinoma syndrome: case reports and review of the literature. *Genet Couns* 1990; 1: 273-277
- Large TH, Weskamp G, Helder JC, Radeke MJ, Misko TP, Shooter EM, Reichardt LF. Structure and developmental expression of the nerve growth factor receptor in the chicken central nervous system. *Neuron* 1989; 2: 1123-1134
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001; 294: 1945-1948
- Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 1996; 19: 289-317
- Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *Embo J* 1997; 16: 4999-5005
- Linggi MS, Burke TL, Williams BB, Harrington A, Kraemer R, Hempstead BL, Yoon SO, Carter BD. Neurotrophin receptor interacting factor (NRIF) is an essential mediator of apoptotic signaling by the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* 2005; 280: 13801-13808
- Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV, Hempstead BL. High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J Biol Chem* 1994; 269: 6884-6891
- Makkerh JP, Ceni C, Auld DS, Vaillancourt F, Dorval G, Barker PA. p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO Rep* 2005; 6: 936-941
- Malheiros SM, Franco CM, Stavale JN, Santos AJ, Borges LR, Pelaez MP, Ferraz FA, Gabbai AA. Medulloblastoma in adults: a series from Brazil. *J Neurooncol* 2002; 60: 247-253
- Martin-Zanca D, Oskam R, Mitra G, Copeland T, Barbacid M. Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 24-33
- McDonald JD, Daneshvar L, Willert JR, Matsumura K, Waldman F, Cogen PH. Physical mapping of chromosome 17p13.3 in the region of a putative tumor suppressor gene important in medulloblastoma. *Genomics* 1994; 23: 229-232
- Mertz KD, Weisheit G, Schilling K, Luers GH. Electroporation of primary neural cultures: a simple method for directed gene transfer in vitro. *Histochem Cell Biol* 2002; 118: 501-506
- Michaud J, Brody LC, Steel G, Fontaine G, Martin LS, Valle D, Mitchell G. Strand-separating conformational polymorphism analysis: efficacy of detection of point mutations in the human ornithine delta-aminotransferase gene. *Genomics* 1992; 13: 389-394
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71
- Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Deimling A, Poustka A. DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet* 1997; 17: 32-39

Mukai J, Hachiya T, Shoji-Hoshino S, Kimura MT, Nadano D, Suvanto P, Hanaoka T, Li Y, Irie S, Greene LA, Sato TA. NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem* 2000; 275: 17566-17570

Mukai J, Shoji S, Kimura MT, Okubo S, Sano H, Suvanto P, Li Y, Irie S, Sato TA. Structure-function analysis of NADE: identification of regions that mediate nerve growth factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 13973-13982

Muragaki Y, Chou TT, Kaplan DR, Trojanowski JQ, Lee VM. Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express TrkA receptors. *J Neurosci* 1997; 17: 530-542

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365

No D, Yao TP, Evans RM. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 3346-3351

Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM. p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 2005; 15: 49-57

Ohgaki H, Eibl RH, Schwab M, Reichel MB, Mariani L, Gehring M, Petersen I, Holl T, Wiestler OD, Kleihues P. Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. *Mol Carcinog* 1993; 8: 74-80

Ohta T, Watanabe T, Katayama Y, Kurihara J, Yoshino A, Nishimoto H, Kishimoto H. TrkA expression is associated with an elevated level of apoptosis in classic medulloblastomas. *Neuropathology* 2006; 26: 170-177

Olson JM, Breslow NE, Barce J. Cancer in twins of Wilms tumor patients. *Am J Med Genet* 1993; 47: 91-94

Onda K, Davis RL, Edwards MS. Comparison of bromodeoxyuridine uptake and MIB 1 immunoreactivity in medulloblastomas determined with single and double immunohistochemical staining methods. *J Neurooncol* 1996; 29: 129-136

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2766-2770

Packer RJ. Childhood medulloblastoma: progress and future challenges. *Brain Dev* 1999; 21: 75-81

Packer RJ, Sutton LN, Elterman R, Lange B, Goldwein J, Nicholson HS, Mulne L, Boyett J, D'Angio G, Wechsler-Jentsch K, et al. Outcome for children with medulloblastoma treated with radiation and cisplatin, CCNU, and vincristine chemotherapy. *J Neurosurg* 1994; 81: 690-698

Papandreou C, Bogenrieder T, Loganzo F, Chao MV, Nanus DM, Albino AP. Mutation and expression of the low affinity neurotrophin receptor in human malignant melanoma. *Melanoma Res* 1996; 6: 373-378

Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis. *Faseb J* 1996; 10: 587-597

Pietsch T, Scharmann T, Fonatsch C, Schmidt D, Ockler R, Freihoff D, Albrecht S, Wiestler OD, Zeltzer P, Riehm H. Characterization of five new cell lines derived from human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 1994; 54: 3278-3287

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

Pizem J, Cor A, Zadavec Zaletel L, Popovic M. Prognostic significance of apoptosis in medulloblastoma. *Neurosci Lett* 2005; 381: 69-73

Pleasure SJ, Reddy UR, Venkatakrishnan G, Roy AK, Chen J, Ross AH, Trojanowski JQ, Pleasure DE, Lee VM. Introduction of nerve growth factor (NGF) receptors into a medulloblastoma cell line results in expression of high- and low-affinity NGF receptors but not NGF-mediated differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 8496-8500

Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturla LM, Angelo M, McLaughlin ME, Kim JY, Goumnerova LC, Black PM, Lau C, Allen JC, Zagzag D, Olson JM, Curran T, Wetmore C, Biegel JA, Poggio T, Mukherjee S, Rifkin R, Califano A, Stolovitzky G, Louis DN, Mesirov JP, Lander ES, Golub TR. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 2002; 415: 436-442

Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, Bredesen DE. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 1993; 261: 345-348

Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW, James CD. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res* 1997; 57: 842-845

Rainov NG, Lubbe J, Renshaw J, Pritchard-Jones K, Luthy AR, Aguzzi A. Association of Wilms' tumor with primary brain tumor in siblings. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 214-223

Rasheed BK, Stenzel TT, McLendon RE, Parsons R, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res* 1997; 57: 4187-4190

Reardon DA, Michalkiewicz E, Boyett JM, Sublett JE, Entekin RE, Ragsdale ST, Valentine MB, Behm FG, Li H, Heideman RL, Kun LE, Shapiro DN, Look AT. Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1997; 57: 4042-4047

Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 1997; 4: 311-323

Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1545-1564

Reifenberger J, Wolter M, Weber RG, Megahed M, Ruzicka T, Lichter P, Reifenberger G. Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 1998; 58: 1798-1803

Roberts RO, Lynch CF, Jones MP, Hart MN. Medulloblastoma: a population-based study of 532 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991; 50: 134-144

- Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 1990; 4: 487-492
- Rood BR, Zhang H, Weitman DM, Cogen PH. Hypermethylation of HIC-1 and 17p allelic loss in medulloblastoma. *Cancer Res* 2002; 62: 3794-3797
- Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 2002; 67: 203-233
- Roux PP, Bhakar AL, Kennedy TE, Barker PA. The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 23097-23104
- Ruiz i Altaba A. Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development* 1998; 125: 2203-2212
- Ruiz IAA, Palma V, Dahmane N. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 24-33
- Rutkowski S, Bode U, Deinlein F, Ottensmeier H, Warmuth-Metz M, Soerensen N, Graf N, Emser A, Pietsch T, Wolff JE, Kortmann RD, Kuehl J. Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone. *N Engl J Med* 2005; 352: 978-986
- Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 6230-6234
- Salehi AH, Xanthoudakis S, Barker PA. NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 48043-48050
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 5463-5467
- Savov A, Angelicheva D, Jordanova A, Eigel A, Kalaydjieva L. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 6741-6742
- Scheurlen WG, Schwabe GC, Joos S, Mollenhauer J, Sörensen N, Kühl J. Molecular analysis of childhood primitive neuroectodermal tumors defines markers associated with poor outcome. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2478-2485
- Scheurlen WG, Seranski P, Mincheva A, Kühl J, Sörensen N, Krauss J, Lichter P, Poustka A, Wilgenbus KK. High-resolution deletion mapping of chromosome arm 17p in childhood primitive neuroectodermal tumors reveals a common chromosomal disruption within the Smith-Magenis region, an unstable region in chromosome band 17p11.2. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 18: 50-58
- Schiffer D, Cavalla P, Chio A, Giordana MT, Marino S, Mauro A, Migheli A. Tumor cell proliferation and apoptosis in medulloblastoma. *Acta Neuropathol (Berl)* 1994; 87: 362-370
- Schiffer D, Cavalla P, Migheli A, Chio A, Giordana MT, Marino S, Attanasio A. Apoptosis and cell proliferation in human neuroepithelial tumors. *Neurosci Lett* 1995; 195: 81-84
- Schofield D, West DC, Anthony DC, Marshal R, Sklar J. Correlation of loss of heterozygosity at chromosome 9q with histological subtype in medulloblastomas. *Am J Pathol* 1995; 146: 472-480

Schutz BR, Scheurlen W, Krauss J, du Manoir S, Joos S, Bentz M, Lichter P. Mapping of chromosomal gains and losses in primitive neuroectodermal tumors by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 16: 196-203

Segal RA, Goumnerova LC, Kwon YK, Stiles CD, Pomeroy SL. Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 12867-12871

Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Chretien M, Murphy RA. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett* 1996; 379: 247-250

Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993; 16: 325-332

Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994; 76: 959-962

Stevens MC, Cameron AH, Muir KR, Parkes SE, Reid H, Whitwell H. Descriptive epidemiology of primary central nervous system tumours in children: a population-based study. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1991; 3: 323-329

Sure U, Berghorn WJ, Bertalanffy H, Wakabayashi T, Yoshida J, Sugita K, Seeger W. Staging, scoring and grading of medulloblastoma. A postoperative prognosis predicting system based on the cases of a single institute. *Acta Neurochir (Wien)* 1995; 132: 59-65

Tabassum A, Khwaja F, Djakiew D. The p75(NTR) tumor suppressor induces caspase-mediated apoptosis in bladder tumor cells. *Int J Cancer* 2003; 105: 47-52

Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire JA, Rutka JT, Hogg D. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 2002; 31: 306-310

Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, Chintagumpala M, Adesina A, Ashley DM, Kellie SJ, Taylor MD, Curran T, Gajjar A, Gilbertson RJ. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1924-1931

Tomlinson FH, Jenkins RB, Scheithauer BW, Keelan PA, Ritland S, Parisi JE, Cunningham J, Olsen KD. Aggressive medulloblastoma with high-level N-myc amplification. *Mayo Clin Proc* 1994; 69: 359-365

Troeger A, Gudowius S, Escherich G, den Boer ML, Glouchkova L, Ackermann B, Meisel R, Laws HJ, Groeger M, Wessalowski R, Willers R, Harbott J, Pieters R, Goebel U, Janka-Schaub GE, Hanenberg H, Dilloo D. High nerve growth factor receptor (p75NTR) expression is a favourable prognostic factor in paediatric B cell precursor-acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2007; 139: 450-457

Turcot J, Despres JP, St Pierre F. Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases. *Dis Colon Rectum* 1959; 2: 465-468

- Vaillant AR, Mazzoni I, Tudan C, Boudreau M, Kaplan DR, Miller FD. Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival. *J Cell Biol* 1999; 146: 955-966
- Vandenberg SR, Herman MM, Rubinstein LJ. Embryonal central neuroepithelial tumors: current concepts and future challenges. *Cancer Metastasis Rev* 1987; 5: 343-365
- Verdi JM, Birren SJ, Ibanez CF, Persson H, Kaplan DR, Benedetti M, Chao MV, Anderson DJ. p75^{LNGFR} regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron* 1994; 12: 733-745
- Vorechovsky I, Tingby O, Hartman M, Stromberg B, Nister M, Collins VP, Toftgard R. Somatic mutations in the human homologue of *Drosophila* patched in primitive neuroectodermal tumours. *Oncogene* 1997; 15: 361-366
- Waha A, Koch A, Hartmann W, Milde U, Felsberg J, Hübner A, Mikeska T, Goodyer CG, Sörensen N, Lindberg I, Wiestler OD, Pietsch T, Waha A. SGNE1/7B2 is epigenetically altered and transcriptionally downregulated in human medulloblastomas. *Oncogene* 2007; 26: 5662-5668
- Waha A, Waha A, Koch A, Meyer-Puttlitz B, Weggen S, Sörensen N, Tonn JC, Albrecht S, Goodyer CG, Berthold F, Wiestler OD, Pietsch T. Epigenetic silencing of the HIC-1 gene in human medulloblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 1192-1201
- Waha A, Watzka M, Koch A, Pietsch T, Przkora R, Peters N, Wiestler OD, von Deimling A. A rapid and sensitive protocol for competitive reverse transcriptase (cRT) PCR analysis of cellular genes. *Brain Pathol* 1998; 8: 13-18
- Wang X, Bauer JH, Li Y, Shao Z, Zetoune FS, Cattaneo E, Vincenz C. Characterization of a p75^{NTR} apoptotic signaling pathway using a novel cellular model. *J Biol Chem* 2001; 276: 33812-33820
- Washiyama K, Muragaki Y, Rorke LB, Lee VM, Feinstein SC, Radeke MJ, Blumberg D, Kaplan DR, Trojanowski JQ. Neurotrophin and neurotrophin receptor proteins in medulloblastomas and other primitive neuroectodermal tumors of the pediatric central nervous system. *Am J Pathol* 1996; 148: 929-940
- Wechsler-Reya RJ, Scott MP. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 1999; 22: 103-114
- Wolter M, Reifenberger J, Sommer C, Ruzicka T, Reifenberger G. Mutations in the human homologue of the *Drosophila* segment polarity gene patched (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 1997; 57: 2581-2585
- Yamashita Y, Handa H, Toyama M. Medulloblastoma in two brothers. *Surg Neurol* 1975; 4: 225-227
- Yan H, Chao MV. Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J Biol Chem* 1991; 266: 12099-12104
- Yan Q, Johnson EM, Jr. An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. *J Neurosci* 1988; 8: 3481-3498
- Yoon JW, Kita Y, Frank DJ, Majewski RR, Konicek BA, Nobrega MA, Jacob H, Walterhouse D, Iannaccone P. Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements

in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *J Biol Chem* 2002; 277: 5548-5555

Yoon SO, Casaccia-Bonnel P, Carter B, Chao MV. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* 1998; 18: 3273-3281

Zhao Q, Kho A, Kenney AM, Yuk Di DI, Kohane I, Rowitch DH. Identification of genes expressed with temporal-spatial restriction to developing cerebellar neuron precursors by a functional genomic approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 5704-5709

Zurawel RH, Chiappa SA, Allen C, Raffel C. Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations. *Cancer Res* 1998; 58: 896-899

8 Danksagung

Zu großer Dankbarkeit verpflichtet fühle ich mich Herrn Prof. Dr. Thorsten Pietsch, der mir dieses hochinteressante Dissertationsthema überließ und damit nicht nur mein Interesse an neuroonkologischen Fragestellungen hervorrief, sondern auch meinem wissenschaftlichen Arbeiten viel Vertrauen entgegenbrachte.

Für hoch engagierte und stets geduldige Betreuung sowie eine ärztliche Vorbildfunktion möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Wolfgang Hartmann in freundschaftlicher Verbundenheit herzlichst bedanken.

Die Zusammenarbeit am Institut für Neuropathologie ist geprägt von vielen kompetenten, hilfsbereiten und sympathischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern. Dorothea Denkhaus, Denise Ehrentraut, Jennifer Hammes, Anika Hübner, Androniki Karathanassi, Hans Ulrich Klatt, PD Dr. Arend Koch, Bianca Liebrecht, Dr. Thomas Mikeska, Ulrike Milde, Anja zur Mühlen, Ortrud Schmidt, Dr. Valentina Vladimirova, Bärbel Wagner, Dr. Anke Waha und PD Dr. Andreas Waha möchte ich in diesem Zusammenhang für die unzähligen Hilfestellungen danken.

Wertvolle Hilfe bei der Erarbeitung der FACS-Messungen erhielt ich durch die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Elmar Endl am Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie der Universität Bonn.

Nur in einer erfolgreichen institutsübergreifenden Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Karl Schilling (Institut für Zellbiologie und Anatomie der Universität Bonn) konnte die Grundlage für die funktionelle Untersuchung an murinen Zellen und Geweben realisiert werden.

Der Aventis Foundation danke ich für ihre großzügige Unterstützung dieser Dissertation durch meine Aufnahme in ihr Stipendiatenprogramm.