

Die Wirkung von MTX auf Sonic Hedgehog assoziierte Medulloblastome

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors oder einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

vorgelegt von
Carolin Loose
aus Soltau

2023

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.06.2024

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Dr. Johannes T. Neumann

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Ulrich Schüller

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Das Medulloblastom	1
1.1.1 Klassifikation des Medulloblastoms	1
1.1.2 SHH-Medulloblastome	4
1.1.2.1 Der SHH-Signalweg	4
1.1.2.2 Entstehung von SHH-Medulloblastomen	5
1.1.3 Symptome und Diagnostik des Medulloblastoms	7
1.1.4 Therapie des Medulloblastoms	7
1.2 Mausmodelle in der Krebsforschung	9
1.2.1 Das Cre/loxP-Rekombinationssystem	9
1.2.2 Mausmodelle des SHH-Medulloblastoms	10
1.3 Methotrexat als Zytostatikum	11
1.3.1 Einsatz und Wirkmechanismus	11
1.3.2 Nebenwirkungen von MTX	14
1.3.3 Die Rolle von MTX in der Therapie des Medulloblastoms	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit	16
1.5 Versuchsplanung	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Materialien	18
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen	18
2.1.2 Reagenzien-Kits	19
2.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze	19
2.1.4 Medikamente	20
2.1.5 Zelllinien	21
2.1.6 Geräte	21
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Zellkulturarbeiten	23
2.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien	23
2.2.2 Tierexperimentelle Arbeiten	23
2.2.2.1 Mauslinien	23
2.2.2.2 Genotypisierung	23
2.2.3 Primärzellkultur	25
2.2.3.1 SHH-Protein-Herstellung	25

2.2.3.2 Körnerzellkultur	25
2.2.3.3 Tumorzellkultur	27
2.2.3 <i>In vitro</i> Experimente	28
2.2.3.1 Vorbereitung der Zellen	28
2.2.3.2 Behandlung der Zellen mit MTX, LDE225 und Vincristin	29
2.2.4 Viabilitätsbestimmungen	29
2.2.5 Immunhistochemie	30
2.2.5.1 Bromdesoxyuridin-Immunfärbungen	30
2.2.6 Molekularbiologische Methoden	31
2.2.6.1 RNA-Extraktion	31
2.2.6.2 cDNA-Synthese	31
2.2.6.3 qRT-PCR	32
2.2.7 Datenerhebung und -analyse	34
3. Ergebnisse	35
3.1 Effekt der MTX-Behandlung auf murine Körnerzellvorläufer	35
3.1.1 Zellviabilität unter MTX-Behandlung	35
3.1.2 Proliferation unter MTX-Behandlung	35
3.1.3 Genexpression von <i>Gli1</i> , <i>Tp53</i> und <i>Cdkn1a</i> unter MTX-Behandlung	37
3.2 Effekt der MTX-Behandlung auf primäre murine Medulloblastomzellen	37
3.2.1 Zellviabilität unter MTX-Behandlung	37
3.2.2 Proliferation unter MTX-Behandlung	38
3.2.3 Genexpression von <i>Gli1</i> , <i>Tp53</i> und <i>Cdkn1a</i> unter MTX-Behandlung	40
3.3 Effekt der MTX-Behandlung auf etablierte permanente Zelllinien	40
3.3.1 Zellviabilität unter MTX-Behandlung	40
3.3.2 Proliferation unter MTX-Behandlung	42
3.4 Kontrollexperimente mit LDE225	44
3.4.1 Effekt der LDE225-Behandlung auf murine Körnerzellvorläufer	44
3.4.2 Effekt der LDE225-Behandlung auf primäre murine Medulloblastomzellen	46
3.4.3 Effekt der LDE225-Behandlung auf etablierte permanente Zelllinien	48
3.5 Kontrollexperimente mit Vincristin	51
3.5.1 Effekt der Vincristin-Behandlung auf primäre murine Körnerzellvorläufer	51
3.5.2 Effekt der Vincristin-Behandlung auf primäre murine Medulloblastomzellen	52
3.4.3 Effekt der Vincristin-Behandlung auf etablierte permanente Zelllinien	52
3.6 Zusammenfassende Analysen	54
4. Diskussion	60
4.1 Überlebensvorteil bei SHH-Medulloblastomen durch MTX	61
4.2 Die Wirkung von MTX auf den SHH-Signalweg	62

4.3 DHFR-vermittelte und weitere Wirkmechanismen von MTX	65
4.4 Resistenzmechanismen gegenüber MTX.....	66
4.5 Toxizität und Nebenwirkungen von MTX.....	68
4.6 Einfluss der Expositionsdauer von MTX.....	68
5. Ausblick	70
6. Zusammenfassung.....	72
7. Abstract.....	73
8. Abkürzungsverzeichnis	74
9. Literaturverzeichnis	77
10. Abbildungsverzeichnis	86
11. Tabellenverzeichnis	87
12. Danksagung.....	88
13. Lebenslauf	89
14. Eidesstattliche Versicherung	90

1. EINLEITUNG

1.1 Das Medulloblastom

Die Inzidenz von Krebserkrankungen im Kindesalter ist in den vergangenen Jahrzehnten leicht gestiegen. Zu den häufigsten Neoplasien in der Altersgruppe von 0 - 14 Jahren gehören Leukämien, gefolgt von Hirntumoren (Steliarova-Foucher et al. 2017, Erdmann et al. 2020, Wang et al. 2021). Insgesamt konnte die Mortalitätsrate von pädiatrischen Krebserkrankungen in den letzten Dekaden reduziert werden. Bei den ZNS-Tumoren wurde dies allerdings nur in vergleichsweise geringem Ausmaß erreicht (Siegel et al. 2022). Dies hat dazu geführt, dass die pädiatrischen Hirntumoren unter den kindlichen Krebserkrankungen inzwischen die höchste Letalität aufweisen (Curtin et al. 2016). In der Gruppe der malignen Hirntumoren im Kindesalter ist das Medulloblastom die häufigste Tumorentität. Es wird in den ZNS-WHO-Grad 4 eingeordnet und entspricht damit dem Grad der höchsten Malignität (Louis et al. 2021). Histomorphologisch ist das Medulloblastom ein embryonaler Tumor, der aus verschiedenen neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen im Kleinhirn, Hirnstamm oder im 4. Ventrikel entsteht (Taylor et al. 2012, Northcott et al. 2019). Die Prognose hängt von klinischen Faktoren, der Subgruppe und Histopathologie sowie genetischen Alterationen ab (Ellison et al. 2011b). Trotz Fortschritten in der Therapie ist das 5-Jahres-Überleben vor allem in der Gruppe der Hochrisikopatienten weiterhin gering mit 21 - 39 % (Dhall et al. 2020, Mynarek et al. 2020b). Das Medulloblastom wächst lokal infiltrierend oder metastasiert per continuitatem in den Liquorraum. Häufig ist die Erkrankung bei Erstdiagnose bereits disseminiert (Wilne et al. 2007).

1.1.1 Klassifikation des Medulloblastoms

Medulloblastome gehören zu den primitiv neuroektodermalen Neoplasien und umfassen eine heterogene Gruppe embryonaler Hirntumoren. Die histologische Klassifikation differenziert zwischen klassischen, desmoplastisch/nodulären, extensiv nodulären, großzelligen und anaplastischen Medulloblastomen (Abbildung 1). Die beiden letzteren werden häufig als großzellig anaplastische Medulloblastome zusammengefasst (Louis et al. 2021). Die Aussagekraft des histologischen Phänotyps ist allerdings hinsichtlich Erkrankungsalter, Therapie

und Prognose begrenzt, sodass sich inzwischen ein weiteres Klassifikationssystem etabliert hat: Auf der Basis von globalen Genexpressionsprofilen konnten vier Subgruppen identifiziert werden, die sich molekularbiologisch klar voneinander unterscheiden und in Wingless Int-1 (WNT), Sonic Hedgehog (SHH)-, Gruppe 3- und Gruppe 4-Medulloblastome unterteilt werden (Taylor et al. 2012, Cavalli et al. 2017). Die WNT- und SHH-Subtypen sind durch die pathologische Überaktivierung des namensgebenden Signalwegs charakterisiert. WNT-Medulloblastome zeichnen sich unter den vier Subgruppen durch die beste Langzeitprognose aus (Ellison et al. 2011a, Northcott et al. 2019). Sie zählen histologisch fast ausschließlich zu den klassischen Medulloblastomen und zeigen als molekulares Merkmal eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin (Taylor et al. 2012). Ihr Ursprungsort liegt im Gegensatz zu den anderen Subgruppen außerhalb des Cerebellums in der unteren rhombischen Lippe des Rhombencephalons (Gibson et al. 2010). Die SHH-Subgruppe weist zumeist eine desmoplastisch/noduläre Histologie und bis auf Ausnahme der Patienten mit Niedrigrisiko-Konstellation eine schlechtere Prognose als die WNT-Medulloblastome auf (Northcott et al. 2019, Gajjar et al. 2021). Diese Tumoren gehen auf zerebelläre Körnerzellvorläufer in der oberen rhombischen Lippe zurück (Schüller et al. 2008). Die zwei verbleibenden Subgruppen Gruppe 3 und Gruppe 4 zeigen hingegen keine charakteristische Überaktivierung eines bestimmten Signalwegs und besitzen sowohl biologisch als auch klinisch überlappende Merkmale. Für beide Gruppen wird ein gemeinsamer Ursprungsort in der subventrikulären Zone der rhombischen Lippe angenommen, von dem sie sich divergent entwickeln (Smith et al. 2022, Hendrikse et al. 2022). Tumoren der Gruppe 3 sind durch eine hohe genetische Heterogenität charakterisiert. *MYC*-Genamplifikationen finden sich in etwa 15 - 17 % der Tumoren und sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Northcott et al. 2017, Cavalli et al. 2017, Gajjar et al. 2021). Allgemein fallen Gruppe 3-Medulloblastome durch die höchste Letalität aller vier Subgruppen mit einer hohen Metastasierungsrate auf (Northcott et al. 2011b). Gruppe 4-Medulloblastome sind bisher am wenigsten genau charakterisiert, obwohl sie die häufigste Subgruppe unter den Medulloblastomen bilden (Taylor et al. 2012, Smith et al. 2022). Zuletzt wurden in diesen Neoplasien verschiedene somatische Mutationen von Genen beschrieben, die für Proteine des *core binding factor alpha* (CBFA)-Komplex codieren (Hendrikse et al. 2022). Die Langzeitprognose

von Tumoren der Gruppe 4 entspricht mit einem 5-Jahres-Überleben von 67 - 83 % etwa der der SHH-Subgruppe (Northcott et al. 2019).








Subgruppe		WNT	SHH	Gruppe 3	Gruppe 4
Klinische Charakteristika	Anteil	10 %	30 %	25 %	35 %
	Diagnosealter				
	Geschlechterverteilung	♂ : ♀	♂ : ♀	♂♂ : ♀	♂♂ : ♀
	Histologie	Klassisch Großzellig/ anaplastisch (selten)	Klassisch Desmoplastisch nodulär Großzellig/ anaplastisch Extensiv nodulär	Klassisch Großzellig/ anaplastisch	Klassisch Großzellig/ anaplastisch
	Metastasierung bei Diagnose	5 - 10 %	15 - 20 %	40 - 45 %	35 - 40 %
	Prognose	Sehr gut	SKK gut, sonst intermediär	Schlecht	Intermediär
Molekulare Charakteristika	Diskutierte Ursprungszelle	Vorläuferzellen in der unteren rhombischen Lippe	Zerebelläre Körnerzellvorläufer	Subventrikuläre Zone der rhombischen Lippe	Subventrikuläre Zone der rhombischen Lippe
	Genetische Alterationen	CTNNB1 DDX3X SMARCA4	PTCH/SMO/SUFU TP53 TERT GLI2 MYCN Amplifikation	MYC Amplifikation SMARCA4 OTX2	CDK6 Amplifikation MYCN Amplifikation OTX2
	Konstitutive Genexpression	WNT-Signalweg MYC	SHH-Signalweg MYCN	Photorezeptoren/ GABAerge Signalwege MYC	Glutamaterge Signalwege MYCN

Abbildung 1: Die vier Subgruppen und ihre klinischen sowie molekularen Charakteristika.

WNT-, SHH-, Gruppe 3- und Gruppe 4-Medulloblastome unterscheiden sich hinsichtlich Diagnosealter, Metastasierung bei Diagnosezeitpunkt, Histologie und Prognose. Dargestellt sind außerdem die vermuteten Ursprungszellen, genetische Veränderungen und Gene mit hochregulierter Expression. Abgewandelt nach (Taylor et al., 2012, Cavalli et al., 2017, Northcott et al., 2017) und ergänzt durch (Gajjar et al. 2021, Hendrikse et al. 2022, Smith et al. 2022).

Altersgruppen (Jahre):  = 0 - 4,  = 4 - 16,  ≥ 16. SKK = Säuglinge und Kleinkinder.

Die vier Subgruppen stellen sich mitunter klinisch und molekular heterogen dar und konnten in den letzten Jahren auf Basis von Genom-, Transkriptom- und Methylomanalysen weiter differenziert werden (Cavalli et al. 2017, Capper et al. 2018). Innerhalb der SHH-Medulloblastome sind beispielsweise mindestens vier Subtypen identifiziert, die therapeutische und prognostische Konsequenzen nach sich ziehen (Skowron et al. 2021, Tonn et al. 2023).

1.1.2 SHH-Medulloblastome

1.1.2.1 Der SHH-Signalweg

Der SHH-Signalweg spielt als hoch konservierter Signalweg insbesondere im Rahmen der Embryogenese sowie der postnatalen Entwicklung eine wesentliche Rolle. Das *Hedgehog*-Gen wurde erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben (Nüsslein-Volhard and Wieschaus 1980). In Säugetieren sind bisher die drei Homologe *sonic hedgehog*, *indian hedgehog* und *desert hedgehog* bekannt (Echelard et al. 1993). Im inaktiven Zustand des Signalwegs interagiert der Transmembranrezeptor *Patched* (PTCH1) mit dem G-Protein-gekoppelten-Rezeptor *Smoothened* (SMO) und inhibiert die Aktivierung der Signalkaskade. Durch die Bindung des Liganden *Hedgehog* (Hh) an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors PTCH1 wird die Inhibition von SMO aufgehoben und der Signalweg aktiviert (Abbildung 2). Es kommt zur Translokation von SMO in das primäre Zilium der Zelle, wo es die Dissoziation der Proteinkinase *suppressor of fused* (SUFU) von den Transkriptionsfaktoren der Gliom-assoziierten onkogenen (GLI-)Transkriptionsfaktoren induziert (Huangfu and Anderson 2006, Wang et al. 2009). Infolgedessen wird über die GLI-Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener Zielgene reguliert. GLI1 und GLI2 fungieren hierbei überwiegend als Transkriptionsaktivatoren, wohingegen GLI3 die Transkription supprimiert (Aza-Blanc et al. 1997, Bai et al. 2002). Die Zielgene des SHH-Signalwegs sind beispielsweise *GLI1*, *PTCH1*, *PTCH2* und *MYCN*. Sie spielen in der Zelle eine wichtige Rolle im Rahmen der Proliferation, dem Eintritt in den Zellzyklus sowie der Differenzierung (Oliver et al. 2003, Liu et al. 2012, Cohen et al. 2015).

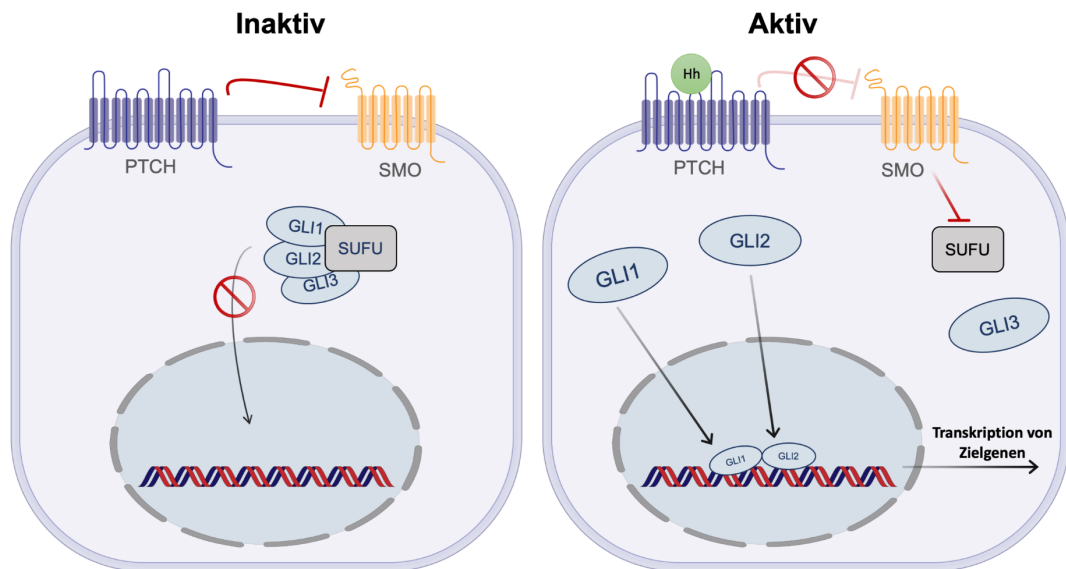


Abbildung 2: Der Sonic Hedgehog-Signalweg im inaktiven und aktiven Zustand.

Im inaktiven Zustand wird der Rezeptor *Smoothened* (SMO) durch *Patched* (PTCH) gehemmt und es findet keine Genexpression statt. Unter Präsenz des Proteins *Hedgehog* (Hh) kommt es zur Disinhibition von SMO. Infolgedessen können die Transkriptionsfaktoren GLI1 und GLI2 in den Zellkern translozieren und die Transkription von Zielgenen initiieren. GLI – Gliom-assoziierte Onkogen-Familie, Hh – *Hedgehog*, PTCH – *Patched*, SMO – *smoothened*, SUFU – *suppressor of fused*.

Aufgrund der wesentlichen Funktion des SHH-Signalwegs in der Embryonalentwicklung können Pathologien an dieser Stelle erhebliche Auswirkungen haben. So können aberrante Repressionen zu schweren Entwicklungsstörungen wie der Holoprosenzephalie, der häufigsten Fehlbildung des Gehirns, führen (Nanni et al. 1999, Ming et al. 2002). Eine Überaktivierung des SHH-Signalwegs spielt in der Karzinogenese verschiedenster Tumorentitäten eine Rolle und wurde unter anderem in Basalzellkarzinomen, Medulloblastomen, kleinzelligen Lungenkarzinomen und Mammakarzinomen identifiziert (Johnson et al. 1996, Raffel et al. 1997, Pasca di Magliano and Hebrok 2003, Park et al. 2011).

1.1.2.2 Entstehung von SHH-Medulloblastomen

Medulloblastome sind embryonale Tumoren, weshalb ihre Entstehung unmittelbar mit der Kleinhirnentwicklung zusammenhängt, die sich in der Maus von Embryonaltag (E) 9 bis etwa zum Postnataltag (P) 20 vollzieht (Borghesani

et al. 2002, Leto et al. 2016). Für SHH-Medulloblastome konnten zerebelläre Körnerzellvorläufer als Ursprungszellen identifiziert werden (Schüller et al. 2008). Diese entstehen während der Ontogenese in der rhombischen Lippe, welche eine der beiden Keimzonen des Kleinhirns darstellt (Wingate 2001). Von dort wandern sie ab E13 tangential aus und bilden bis in die frühe postnatale Phase durch klonale Expansion die äußere Körnerzellschicht (Hatten et al. 1997, Consalez et al. 2020). Die Körnerzellvorläufer werden dort wesentlich durch das Mitogen Sonic Hedgehog zur Proliferation angeregt, welches von Purkinjezellen sezerniert wird (Wechsler-Reya and Scott 1999). Die Entwicklungsperiode der Körnerzellvorläufer in der äußeren Körnerzellschicht (E13 - P15) kann anhand verschiedener differenziell exprimierter Marker in die Phasen der Neurogenese, Beginn der Differenzierung, Migration und der Bildung synaptischer Verbindungen gegliedert werden (Hatten et al. 1997, Leto et al. 2016). Postmitotische Körnerzellvorläufer wandern schließlich radial entlang der Bergmann Gliazellen in das Innere des Cerebellums, um dort die innere Körnerzellschicht zu bilden (Wechsler-Reya and Scott 1999, Lewis et al. 2004).

Der SHH-Signalweg ist ein wesentlicher Mediator für die Proliferation von Körnerzellvorläufern, und Mutationen in involvierten Genen können zur Entstehung von SHH-Medulloblastomen führen. Somatische Mutationen in den Genen *PTCH1*, *SMO* oder *SUFU* können durch eine ligandenunabhängige Aktivierung des Signalwegs für die Entwicklung sporadischer Medulloblastome verantwortlich sein (Hahn et al. 1999, Northcott et al. 2011a). Eine heterozygote Keimbahnmutation im Rezeptor *PTCH1* manifestiert sich im Gorlin-Syndrom (Farndon et al. 1992, Hahn et al. 1996). Betroffene Patienten zeichnen sich unter anderem durch eine höhere Inzidenz von Medulloblastomen aus (Evans et al. 1991). Keimbahnmutationen, die das negativ regulierende Protein *SUFU* verändern, sind ebenfalls mit einer Prädisposition für Medulloblastome assoziiert (Taylor et al. 2002). Weiterhin können veränderte Zielgene des SHH-Signalwegs Grundlage für die Tumorentstehung sein. So wurden Amplifikationen in den Genen *GLI1* und *MYCN* als ursächlich für eine konstitutive Aktivierung des Signalwegs identifiziert (Roussel and Robinson 2013, Kool et al. 2014, Northcott et al. 2017).

1.1.3 Symptome und Diagnostik des Medulloblastoms

Früh auftretende klinische Symptome des Medulloblastoms sind oft unspezifisch und zumeist auf einen erhöhten intrakraniellen Druck zurückzuführen. Häufig umfassen sie Kopfschmerzen, Übelkeit, morgendliches Erbrechen sowie geringe Belastbarkeit. Bei jungen Patienten kann es aufgrund einer Beeinträchtigung der zerebrospinalen Liquorzirkulation zu der Entwicklung eines Hydrozephalus kommen. Im Verlauf treten durch die Lokalisation des Tumors im Bereich des Cerebellums spezifischere Symptome auf, darunter Ataxie, Sehstörungen sowie die Beeinträchtigung motorischer und koordinativer Fähigkeiten (Wilne et al. 2007). Sind zum Diagnosezeitpunkt bereits spinale Metastasen vorhanden, können sich die betroffenen Kinder mit Rückenschmerzen und Gangstörungen vorstellen. Die Symptomatik des Medulloblastoms ist progredient und führt teilweise schon nach Wochen bis Monaten zu einer raschen Reduktion des Zustands des Patienten (Wilne et al. 2007, Northcott et al. 2019). In der Diagnostik spielt die Bildgebung mittels kranialer und spinaler Magnetresonanztomographie (MRT) eine wichtige Rolle, um die Lokalisation, Größe und Ausdehnung des Tumors beurteilen zu können. Da auch andere pädiatrische Hirntumoren wie pilozytische Astrozytome, Ependymome und AT/RTs (atypische teratoide/rhabdoide Tumoren) häufig in der hinteren Schädelgrube lokalisiert sind, sind für eine Absicherung der Diagnose histopathologische sowie molekulare Analysen essenziell (Louis et al. 2021). Hierfür wird operativ entferntes Tumorgewebe immunhistochemisch und molekularbiologisch untersucht, was auch die Einordnung in die verschiedenen Subgruppen ermöglicht. Als Goldstandard für die molekulare Untersuchung ist mittlerweile die DNA-Methylierungsanalyse etabliert (Hovestadt et al. 2013, Schwalbe et al. 2013, Capper et al. 2018). Ergänzend zu den bildgebenden Staging-Untersuchungen erfolgt routinemäßig die zytologische Untersuchung von Liquorproben (Rutkowski 2018, Northcott et al. 2019).

1.1.4 Therapie des Medulloblastoms

Generell bestehen die etablierten Therapieoptionen des Medulloblastoms aus operativer Entfernung, Radiotherapie und systemischer Chemotherapie (Gerber et al. 2014, Rutkowski 2018). Primär wird eine totale Resektion angestrebt, insofern die Lokalisation des Tumors dies zulässt. Durch das infiltrative

Wachstum und die Nähe zum Ventrikelsystem ist eine radikale Operation jedoch in einigen Fällen nicht möglich (Rutkowski 2018). Die anschließende Therapie hängt vom Alter des Kindes, der Tumorbiologie und individuellen Faktoren ab. Eine Bestrahlung wird bei Kindern ab dem Alter von drei bis fünf Jahren angewandt. Hierbei muss individuell zwischen den Erfolgsaussichten und den zu erwartenden kognitiven und psychomotorischen Störungen in der frühkindlichen Entwicklung abgewogen werden (Rutkowski et al. 2009, Ottensmeier et al. 2020). Die nationalen Leitlinien sehen bei dem Großteil der Patienten eine Chemotherapie vor, welche als Induktions- oder Erhaltungstherapie durchgeführt wird. Zur Verfügung stehen Zytostatika aus der Gruppe der Platinderivate (Cisplatin, Carboplatin), Mitosehemmstoffe (Vincristin), Topoisomerasehemmstoffe (Etoposid), Alkylantien (Cyclophosphamid, Lomustin) und Antimetabolite (Methotrexat) (Mynarek et al. 2020a). Die Behandlung mit Zytostatika und die aggressive Strahlentherapie weisen nicht unerhebliche Langzeitfolgen und Sekundäreffekte auf. Dazu zählen neurokognitive und neuroendokrine Dysfunktionen, Wachstumsstörungen, Infertilität und ein erhöhtes Risiko für Zweitmalignome (Kiltie et al. 1997, Padovani et al. 2012, Northcott et al. 2019).

Im Zuge der Klassifikation in die vier molekularbiologischen Subgruppen ergaben sich auch neue medikamentöse Therapieansätze. Die direkten SHH-Signalweginhibitoren *Sonidegib* (LDE225) und *Vismodegib* (GDC-0449) sind derzeit Bestandteil präklinischer (Kresbach et al. 2023, Romer et al. 2004, Kool et al. 2014) und klinischer Forschung (Low and de Sauvage 2010, Robinson et al. 2015). Der Wirkmechanismus dieser Substanzen basiert auf einer allosterischen Bindung an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor SMO, die zu einer Inhibition der Aktivierung von nachfolgenden Komponenten des SHH-Signalwegs führt (Kool et al. 2014). Tumoren mit SHH-Überaktivierung sprechen zwar gut auf die Substanzen an, jedoch wurden präklinisch und in präpubertären Patienten irreversible vorzeitige Verschlüsse der epiphysären Wachstumsfugen beobachtet (Kimura et al. 2008, Robinson et al. 2017, Kieran et al. 2017). Aus diesem Grund bilden die SMO-Inhibitoren bis dato noch keine adäquate Alternative zu konventionellen Therapieoptionen.

1.2 Mausmodelle in der Krebsforschung

In der Forschung ist die Maus unter den Säugetieren der am häufigsten verwendete Modellorganismus (Vandamme 2014). Eine schon seit den 1920er Jahren etablierte und vielfach eingesetzte Mauslinie ist die C57Bl/6J-Linie. Sie dient als Wildtyp sowie als genetischer Hintergrund für transgene Veränderungen des Genoms (Beck et al. 2000). Genetisch veränderte Tiere können in der Krebsforschung dazu dienen, den Einfluss bestimmter Gene und Proteine in verschiedenen Tumoren zu untersuchen. Dies geschieht durch die Zucht von Tieren, denen das betreffende Gen auf einem oder beiden Allelen fehlt, was als *Knockout* bezeichnet wird. Analog hierzu ist auch die Überexpression von Onkogenen möglich, welche in Tumoren amplifiziert vorliegen (Bedell et al. 1997).

1.2.1 Das Cre/loxP-Rekombinationssystem

Mittels konventioneller Knockouts in transgenen Tieren konnte in den letzten Dekaden ein großer Informationsgewinn erzielt werden. Diese Modelle besitzen jedoch Limitationen. Spielt das Zielgen zum Beispiel eine entscheidende Rolle in der embryonalen Entwicklung, ist ein homozygoter Knockout in vielen Fällen letal. Das Cre/loxP-Rekombinationssystem ermöglicht eine Elimination des Gens in spezifischen Geweben oder zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten (Branda and Dymecki 2004). Die Cre-Rekombinase gehört zu den Topoisomerasen und katalysiert die Spaltung der DNA zwischen zwei spezifischen Erkennungssequenzen (loxP-Sequenzen) sowie die anschließende Rekombination der Abschnitte (Meinke et al. 2016). Die beiden loxP-Sequenzen flankieren das Gen und fungieren als Bindungsstelle der Cre-Rekombinase. Die Rekombination führt zur Entfernung des sich zwischen den Erkennungssequenzen befindlichen Gens. Eine Spezifität für bestimmte Gewebe kann durch die Kopplung der Cre-Rekombinase an Promotoren erreicht werden, welche nur in den gewünschten Geweben und ab einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt vorhanden sind. Infolgedessen wird die Cre-Rekombinase nur bei Aktivierung des Promotors exprimiert (Abbildung 3). Soll der Knockout zu einem bestimmten Zeitpunkt erfolgen, kann ein induzierbarer Promotor eingesetzt werden. Hierfür wurde die Cre-Rekombinase mit der Ligandenbindungsdomäne des Estrogenrezeptors fusioniert. Dieser Komplex

befindet sich unter normalen Umständen im Zytoplasma der Zelle. Bei Administration des synthetischen Estrogens Tamoxifen kommt es zur Aktivierung und Translokation des Komplexes in den Zellkern, wo die Cre-Rekombinase die Entfernung der DNA-Sequenz katalysiert (Kim et al. 2018).

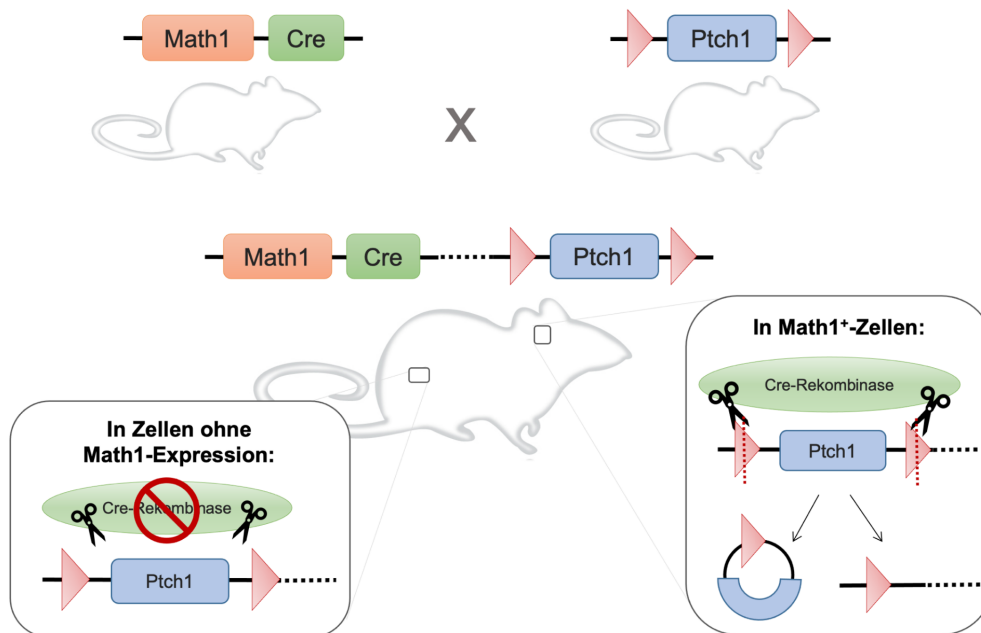


Abbildung 3: Das Cre/loxP-Rekombinationssystem am Beispiel von Mäusen des Genotyps *Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*.

Durch Verpaarung von Tieren mit einer an den *Math1*-Promotor gekoppelten Cre-Rekombinase mit Tieren, in denen das Gen *Ptch1* durch loxP-Sequenzen flankiert ist, besitzen einige Nachkommen der nächsten Generation den Genotyp *Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*. Die Cre-Rekombinase wird nur in Zellen exprimiert, in denen der *Math1*-Promotor aktiv ist (v.a. in der Genese von Körnerzellvorläufern). Es kommt zur Entfernung des Gens *Ptch1* zwischen den beiden loxP-Sequenzen und einer anschließenden Rekombination des DNA-Strangs. Es resultiert ein Knockout von *Ptch1*. In allen Zellen ohne *Math1*-Aktivität und folglich ohne Cre-Expression bleibt der DNA-Strang intakt und *Ptch1* kann exprimiert werden. Abgewandelt nach (Branda und Dymecki 2004).

1.2.2 Mausmodelle des SHH-Medulloblastoms

Um die Entstehung, Eigenschaften und mögliche Therapien von Medulloblastomen besser untersuchen zu können, existieren für diese Tumorerkrankung verschiedene Mausmodelle. Für SHH-Medulloblastome basieren die Modelle auf veränderten Genen des SHH-Signalwegs. Seit einigen Jahren etabliert ist der Knockout von *Ptch1* (Goodrich et al. 1997). Da der SHH-Signalweg in der Embryonalentwicklung essenziell ist, ist ein homozygoter

Verlust von *Ptch1* letal, und die Tiere versterben bereits im Embryonalalter. Ein heterozygoter Knockout (*Ptch1*^{+/-}) hingegen führt zu Tumoren, die eine große Ähnlichkeit zu humanen Medulloblastomen aufweisen (Yang et al. 2008, Pöschl et al. 2014). Ein weiteres Mausmodell basiert auf einer Mutation des für den Rezeptor *Smoothed* codierenden Gens. Diese verursacht ebenfalls eine konstitutive Aktivierung des SHH-Signalwegs, wodurch heterozygote Tiere zuverlässig Medulloblastome entwickeln (Mao et al. 2006).

Weiter optimiert wurden diese Mausmodelle durch den Einsatz des Cre/loxP-Systems. Auf diese Weise wird die Mutation an einen zelltypspezifischen Promotor geknüpft, wodurch nur bestimmte Zellpopulationen die veränderten Gene aufweisen. In Körnerzellvorläufern eignet sich hierfür der Transkriptionsfaktor *Math1*, der für dessen Genese in der äußeren Körnerzellschicht essenziell ist (Ben-Arie et al. 1997, Machold and Fishell 2005). Unter Verwendung des *Math1*-Promotors wird die Cre-Rekombinase ab E14 bis zu einem postnatalen Alter von 2 - 3 Wochen exprimiert, während in differenzierten Körnerzellen adulter Mäuse keine Cre-Expression mehr vorhanden ist (Yang et al. 2008). Durch die *Math1*-Cre vermittelte Rekombination von aktivierenden Komponenten des SHH-Signalwegs konnten Mausmodelle mit hundertprozentiger Tumorpenetranz generiert werden, die die humanen Tumoren in Histologie und Transkriptom widerspiegeln (Yang et al. 2008, Schüller et al. 2008, Pöschl et al. 2014).

1.3 Methotrexat als Zytostatikum

1.3.1 Einsatz und Wirkmechanismus

Der Folsäureantagonist Methotrexat (MTX) ist als Zytostatikum seit Mitte des 20. Jahrhunderts im Einsatz. Die strukturell fast identische Vorgängersubstanz Aminopterin wurde bereits 1948 im Rahmen der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie eingesetzt (Farber et al. 1948). Im Jahr 1956 wurde für Methotrexat in Mausstudien ein höherer therapeutischer Index gezeigt, woraufhin Aminopterin im klinischen Gebrauch durch MTX ersetzt wurde (Goldin 1968). Erste Therapieerfolge wurden bei Patientinnen mit Chorionkarzinom erzielt. Nach der Behandlung mit MTX wiesen sie im 5-Jahres-Follow-up keine Residuen mehr auf (Hertz et al. 1956, Hertz et al. 1961). Heutzutage kommt MTX in der

Behandlung von einigen Tumorerkrankungen zum Einsatz, unter anderem der akuten lymphatischen Leukämie, Non-Hodgkin-Lymphomen, Urothel- und Mammakarzinomen, Osteosarkomen und Medulloblastomen (Koźmiński et al. 2020). Neben der intravenösen und oralen Applikation kann MTX intrathekal verabreicht werden, worauf insbesondere bei der Behandlung von Leukämien und ZNS-Tumoren zurückgegriffen wird (Rutkowski et al. 2005, Horton and Steuber 2020, Mynarek et al. 2020a).

Fast ebenso lange wie der klinische Gebrauch ist auch der Wirkmechanismus von MTX bekannt: Die Substanz weist strukturell eine hohe Ähnlichkeit zu Folsäure auf und inhibiert über verschiedene Wege die *de novo* Synthese von Purin- und Pyrimidinnukleotiden. Zunächst gelangt MTX über den aktiven Transporter *reduced folate carrier 1* (RFC1) in die Zelle (Genestier et al. 2000, Koźmiński et al. 2020). Dort wird es mehrfach polyglutamiert, was die biologische Aktivität des Wirkstoffs erhöht. Polyglutamiertes MTX (PG-MTX) besitzt eine höhere Affinität zu den zu hemmenden Enzymen und eine längere Verweildauer in der Zelle (Baugh et al. 1973, Chabner et al. 1985). Den größten Teil der Wirkung entfaltet MTX über eine reversible Bindung an die Dihydrofolatreduktase (DHFR), welche die Umwandlung von Dihydrofolsäure in Tetrahydrofolsäure katalysiert. Tetrahydrofolsäure fungiert in vielen Stoffwechselwegen als wichtiger Kohlenstoffdonator. Bei Inhibition der DHFR durch MTX werden Prozesse beeinträchtigt, die von Tetrahydrofolsäure abhängig sind. Hierzu zählen die Synthese von Purinen und des Pyrimidinnukleotids desoxy-Thymidinmonophosphat (dTMP) (Genestier et al. 2000). Verstärkt wird dieser Effekt durch die ebenfalls PG-MTX-vermittelte Inhibition der Thymidilat-Synthase (Allegra et al. 1985). Es resultiert ein Mangel an Nukleotiden, welche im Zuge der DNA-Replikation zwingend benötigt werden. Insbesondere sich schnell teilende Zellen werden somit in ihrer Proliferation beeinträchtigt, was schlussendlich zu einer Apoptose der Zellen führt und die zytotoxische Wirkung von MTX erklärt (Genestier et al. 1998). Die Elimination von MTX erfolgt vor allem über die Familie der *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter, die in der Zelle als Efflux-Pumpen fungieren (Assaraf 2006).

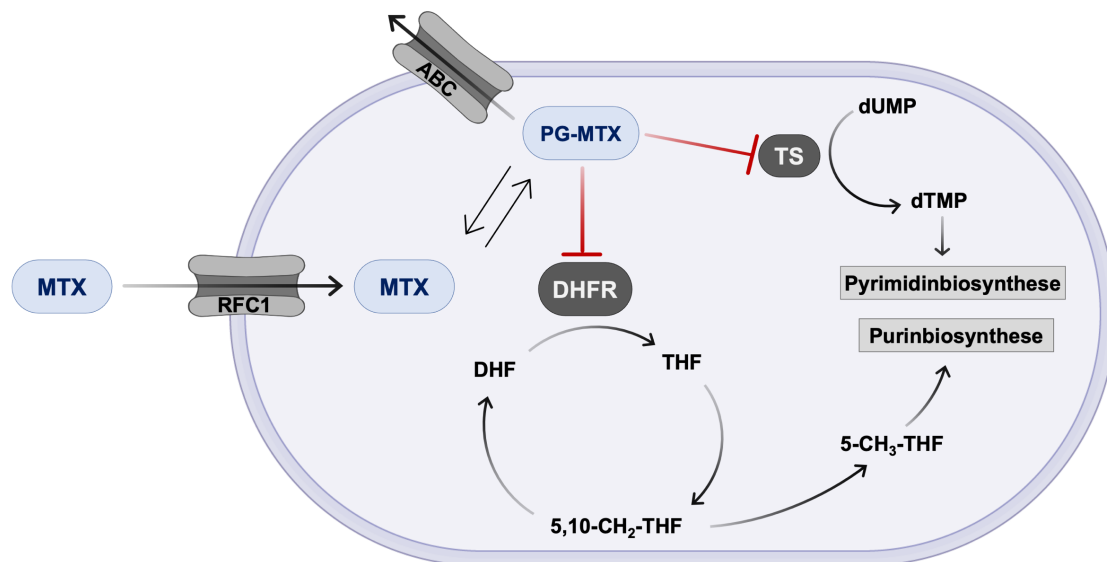


Abbildung 4: Die Wirkweise von MTX auf den Folsäure-Stoffwechsel.

MTX gelangt über den RFC1 in die Zelle und wird dort polyglutamiert. PG-MTX hemmt die Dihydrofolatreduktase. Infolgedessen kommt es zu einem Mangel an 5,10-Methylen-tetrahydrofolat, welches essenziell in der Purinbiosynthese ist. Durch weitere Hemmung der Thymidilat-Synthase steht weniger dTMP für die Pyrimidinbiosynthese bereit. 5-CH₃-THF – Methyl-tetrahydrofolat, 5,10-CH₂-THF – Methylen-tetrahydrofolat, ABC – ATP-binding cassette, DHF – Dihydrofolat, DHFR – Dihydrofolatreduktase, dUMP – Desoxyuridinmonophosphat, dTMP – Desoxythymidinmonophosphat, MTX – Methotrexat, PG-MTX – polyglutamiertes MTX, RFC1 – reduced folate carrier 1, THF – Tetrahydrofolat, TS – Thymidilat-Synthetase.

Darüber hinaus können zunehmend Erkenntnisse über nicht-DHFR-vermittelte Wirkungen von MTX gewonnen werden, welche einen Einfluss auf maligne Zellen haben. Einer dieser Aspekte ist die Stimulation der Zelldifferenzierung. In Plattenepithelkarzinomen und kolorektalen Karzinomen wurde beobachtet, dass es nach Gabe von MTX zur Hochregulation von Genen kommt, die für Differenzierungsmarker wie E-Cadherin codieren (Anand et al. 2009, Hirano et al. 2013). Die MTX-Behandlung von Osteosarkomzellen führt zu einer Mineralisation der Knochenmatrix, was ebenfalls als Marker osteogener Differenzierung beschrieben ist (Sramek et al. 2016). Als weiterer nicht-DHFR-vermittelter Wirkmechanismus von MTX wird eine Funktion als Histon-Deacetylase-Inhibitor diskutiert. Diese Substanzklasse wird bereits in der Therapie von Thymomen, Melanomen, verschiedenen soliden Tumoren sowie kutanen T-Zell-Lymphomen eingesetzt (West and Johnstone 2014). In Lungen- und Zervixkarzinomzellen konnte unter MTX eine Inhibition der Histon-Deacetylase und eine Induktion der Histon-Acetylierung beobachtet werden

(Yang et al. 2010). Weiterhin ist auch ein Anstieg der Acetylierung von p53 durch MTX bekannt, was zu einer höheren Akkumulation und Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins führt (Huang et al. 2011). Zusätzlich beeinflusst MTX vermutlich auch weitere Signalwege, welche an der Krebsentstehung beteiligt sind. Hierzu gehören eine Suppression des JAK/STAT-Signalwegs, eine Inhibierung der NF- κ B-Aktivität und eine höhere Phosphorylierung der Proteinkinase ERK1/2, was zu einer erhöhten Aktivität ebendieser führt (Spurlock et al. 2014, Nabai et al. 2015, Thomas et al. 2015).

1.3.2 Nebenwirkungen von MTX

MTX weist, wie alle Zytostatika, eine Vielzahl von Nebenwirkungen auf. Darunter finden sich zum einen bei Chemotherapeutika häufig beobachtete Symptome wie gastrointestinale Beschwerden, Alopezie, Fatigue, Fieber, Leukopenie, Nierenschädigungen und Anämie (Howard et al. 2016). Da MTX die Blut-Hirn-Schranke überwindet, kommt es darüber hinaus zu neurotoxischen Effekten. Eine schwere zentralnervöse Nebenwirkung ist die Leukenzephalopathie (Bhojwani et al. 2014). Sie kann akut, subakut und chronisch auftreten, wobei die akute Form meist transient ist. Typische Symptome umfassen Verwirrtheit, Kopfschmerzen, Sprachstörungen, Paresen, Ataxie und Krampfanfälle (Vezmar et al. 2003, Inaba et al. 2008). Häufig verläuft die Leukenzephalopathie subklinisch und ist lediglich in der zerebralen Bildgebung erkennbar. Das Ausmaß der Schädigung der weißen Substanz ist dosisabhängig. Bei Kindern mit Medulloblastom liegt die Prävalenz nach Abschluss der Therapie je nach Schweregrad bei 9,5 - 21,4 %. Die schwere Form ist mit der Kombination aus MTX und Radiotherapie assoziiert (Wägner et al. 2022). Bei etwa 25 % der betroffenen Patienten kommt es im Verlauf zu einer Remission, häufig sind die Substanzdefekte allerdings irreversibel (Reddick et al. 2005, Bhojwani et al. 2014).

1.3.3 Die Rolle von MTX in der Therapie des Medulloblastoms

Etwa 25 - 35 % der pädiatrischen Medulloblastome treten bei Kindern auf, die jünger als drei Jahre alt sind (Rutkowski et al. 2009). Die Behandlung dieser Patientengruppe findet zumeist in Rahmen von Studien statt. Die Chemotherapie

ist ein wesentliches Element der Therapie, um die Strahlentherapie und ihre Langzeitfolgen vermeiden oder hinauszögern zu können. Gleichzeitig muss der je nach Subgruppe schnell voranschreitenden und früh metastasierenden Erkrankung mit einer aggressiven Therapie entgegnet werden. Zu diesem Zweck wird insbesondere in nordamerikanischen klinischen Studien auf die Hochdosis-Chemotherapie zurückgegriffen. Diese Therapieprotokolle beinhalten häufig MTX (Mazewski et al. 2020, Dhall et al. 2020). In Deutschland, Österreich und der Schweiz erfolgt die Behandlung überwiegend gemäß den Leitlinien der Studienzentrale zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit einem Medulloblastom, Ependymom und Diversen aggressiven Hirntumoren (HIT-MED). Diese empfehlen zur Therapie des Medulloblastoms den intravenösen und intraventrikulären Einsatz von MTX (Mynarek et al. 2020a). Studienkollektive zeigen, dass im Zuge des Radiotherapie vermeidenden Ansatzes die Addition von intraventrikulärem MTX insbesondere in der SHH-Subgruppe zu einem besseren 5-Jahres-Überleben führt (Rutkowski et al. 2005, Pompe et al. 2015, Mynarek et al. 2020b). Weiterhin ist MTX auch in der Induktionstherapie der Gruppe 3- und Gruppe 4-Tumoren sowie bei vorhandenen Metastasen zum Diagnosezeitpunkt ein Bestandteil der Chemotherapie-Schemata (Mynarek et al. 2020a). Diese Aspekte verdeutlichen, dass MTX in der Therapie des Medulloblastoms und vor allem des SHH-Subtyps einen großen Stellenwert besitzt. Obwohl MTX schon seit einigen Jahren in den Therapieprotokollen inkludiert ist, werden die verabreichten Dosen und Intervalle weiterhin optimiert (Pompe et al. 2015, Mynarek et al. 2020b).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Methotrexat ist als Antimetabolit seit Jahrzehnten im Einsatz und fester Bestandteil in der Therapie von Medulloblastomen. Die grundlegenden Wirkmechanismen von MTX auf SHH-Medulloblastome sind allerdings bis heute nicht vollständig geklärt, und es existieren zunehmende Hinweise auf die Involvierung verschiedenster Signalwege. In den HIT-MED-Studienkollektiven konnte beobachtet werden, dass die intraventrikuläre Behandlung mit MTX bei Kindern mit SHH-Medulloblastomen einen deutlichen Überlebensvorteil mit sich bringt (Rutkowski et al. 2005, Pompe et al. 2015, Mynarek et al. 2020b). Dies wirft die Hypothese einer über den SHH-Signalweg vermittelten Wirkung von MTX auf. In diesem Kontext dient eine Aufklärung der Wirkweise von MTX, um diejenigen Patienten mit Medulloblastomen zu identifizieren, die von der Behandlung profitieren werden. Darüber hinaus kann mit einer besseren Kenntnis der Wirkweise die verabreichte Dosis und die Therapiedauer optimiert werden. Dies ist bei pädiatrischen Patienten von entscheidender Bedeutung, da die die Behandlung mit MTX mitunter schwere Nebenwirkungen aufweist. Insgesamt soll diese Arbeit mithilfe von *in vitro* Experimenten zum weiteren Verständnis der grundlegenden biologischen Prozesse im Zusammenhang von MTX und SHH-Medulloblastomen beitragen. Die gewonnenen Ergebnisse können genutzt werden, um im nächsten Schritt weitere *in vitro*- und *in vivo*-Studien zur Therapie von Medulloblastomen zu konzipieren und zu optimieren.

1.5 Versuchsplanung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie MTX auf zerebelläre Körnerzellvorläufer und Medulloblastomzellen *in vitro* wirkt und ob dieser Effekt möglicherweise über den Sonic Hedgehog-Signalweg vermittelt ist.

Den methodischen Schwerpunkt der Arbeit bilden Primärkulturen von zerebellären Körnerzellvorläufern und Medulloblastomzellen der Maus. Die primären Körnerzellvorläufer werden aus C57/B16-Wildtyp-Mäusen isoliert. Für die Generierung der Tumorzellen (im Folgenden auch als „primäre Medulloblastomzellen“ bezeichnet) kommt ein bereits etabliertes Mausmodell des Genotyps *Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}* zum Einsatz. Diese Tiere weisen einen homozygoten Verlust beider *Ptch1*-Allele in zerebellären Körnerzellvorläufern

auf, was zu einer konstitutiven Aktivierung des SHH-Signalwegs in den Ursprungszellen des SHH-Medulloblastoms führt. Es kommt im postnatalen Alter von wenigen Tagen mit vollständiger Penetranz zur Entwicklung von Medulloblastomen (Schüller et al. 2008, Yang et al. 2008). Diese Tumoren besitzen histologisch, genetisch und transkriptionell eine hohe Ähnlichkeit zu den entsprechenden humanen SHH-Medulloblastomen (Pöschl et al. 2014).

Primäre Körnerzellvorläufer und Medulloblastomzellen werden mit verschiedenen MTX-Konzentrationen behandelt, bevor Viabilitätsassays durchgeführt werden und ihre Proliferation durch immunzytochemische Färbungen analysiert wird. Die Aktivität des SHH-Signalwegs wird mittels Genexpressionsanalysen gemessen. Diese schließen auch den p53/p21-Signalweg ein.

Die Versuche zur Messung von Viabilität und Proliferation sollen analog an verschiedenen Zelllinien durchgeführt werden, was zur weiteren Einordnung der Ergebnisse dient. Hierzu kommen zum einen die drei Medulloblastomlinien Daoy, UW473 und SJMM4 und zum anderen die Neuroblastomlinie SH-SY5Y sowie NIH-3T3-Zellen zum Einsatz.

Um eine Involvierung des SHH-Signalwegs besser beurteilen zu können, soll die Reaktion der primären Zellen und Zelllinien auf weitere Substanzen getestet werden: Der direkte SHH-Signalweginhibitor LDE225 ist klinisch unter dem Namen *Sonidegib* im Einsatz und inhibiert SHH-Medulloblastomzellen über eine Hemmung von *Smoothed* (Pan et al. 2010). Das Zytostatikum Vincristin ist neben MTX in der Therapie von Medulloblastomen fast aller Subtypen und Altersgruppen vorgesehen (Mynarek et al. 2020a). Die Experimente mit Vincristin sollen dazu dienen, den Effekt eines weiteren Chemotherapeutikums auf die untersuchten Zellen zu zeigen. In Zusammenschau sollen die Ergebnisse der drei verwendeten Substanzen einen besseren Rückschluss darauf ermöglichen, ob die Wirkung von MTX auf SHH-Medulloblastome primär auf der bekannten DHFR-Inhibition basiert oder ob darüber hinaus eine spezifische Hemmung des SHH-Signalwegs eine Rolle spielt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien wurden bei Merck, Carl Roth und Sigma Aldrich erworben. Zur Ansetzung aller Puffer und Lösungen wurde ddH₂O genutzt.

Tabelle 1: Auflistung aller Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Chemikalien, Reagenzien und Lösungen	Hersteller
4'6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich
Agarose	Gibco/Life Technologies
Borax Puffer	Sigma-Aldrich
Chloroform	Merck Millipore
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck Millipore
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Formaldehyd (4 %, gepufferte Lösung)	Chemsolute/Th. Geyer GmbH
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Gibco/Life Technologies
Isopropanol	Chemsolute/Th. Geyer GmbH
Kaliumchlorid (KCl)	Thermo Scientific
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Promega
Methanol	Carl Roth GmbH
Polyvinylalkohol (Mowiol)	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH
Natriumaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate - SDS)	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH
Normales Ziegen Serum (normal goat serum - NGS)	Merck Millipore
Phosphate-buffered saline (PBS, 10x)	Biochrom/Merck
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Carl Roth GmbH
RQ1 RNase-freie DNase	Promega
Salzsäure (Hydrochlorid acid - HCl, 25 %)	Merck Millipore
Sonic Hedgehog Protein	Eigene Herstellung
Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer (50x)	PanReac Applichem

Tris (1 M)	Carl Roth GmbH
Triton X100	Sigma-Aldrich
TRIzol Reagenz	Life Technologies
Trypanblaue Lösung 0,4 %	Gibco/Life Technologies
Trypsin Inhibitor	Carl Roth GmbH

2.1.2 Reagenzien-Kits

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Kits

Reagenzien-Kit	Hersteller	Anwendung
CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay	Promega	Viabilitätsassay
miScript II RT Kit	Qiagen	cDNA-Synthese
NiDA 200 packed columns Kit	Macherey-Nagel	Protein-Purifikation
Protino Ni-IDA 2000	Macherey-Nagel	Protein-Purifikation
SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit	Meridian Bioscience	qRT-PCR
Vivaspin™ 6 Zentrifugalkonzentratoren	Sartorius	Protein-Konzentration

2.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 3: Verwendete Zellkulturmedien und -zusätze

Zellkulturmedien und Zusätze	Hersteller
Accutase™ Zelldissoziationsreagenz	Gibco/Life Technologies
B27 Supplement	Gibco/Life Technologies
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
DNase I aus boviner Pankreas	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12	Gibco/Life Technologies
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 GlutaMAX	Gibco/Life Technologies
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Gibco/Life Technologies
Fetales bovines Serum (FBS)	Gibco/Life Technologies
HEPES Puffer	Gibco/Life Technologies
L-Glutamin	Gibco/Life Technologies

MEM Nicht essenzielle Aminosäuren-Lösung (100×)	Sigma-Aldrich
N2 Supplement	Gibco/Life Technologies
Penicillin-Streptomycin	Gibco/Life Technologies
Rekombinantes humanes EGF	PeptoTech
Rekombinantes humanes FGF	PeptoTech
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	Gibco/Life Technologies
Trypsin (0,05 % Trypsin EDTA)	Gibco/Life Technologies

2.1.4 Medikamente

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden verschiedene Medikamente verwendet, welche in Tabelle 4 aufgeführt sind.

Tabelle 4: Verwendete Medikamente, ihre Wirkstoffklasse und Hersteller

Substanz	Wirkstoffklasse	Hersteller
Methotrexat Hydrat	Zytostatikum: Folsäure-Antagonist	Abcam
NVP-LDE225 (<i>Sonidegib</i>)	Direkter SHH-Signalweginhibitor	Selleck Chemicals
Vincristin Sulfat	Zytostatikum: Mitosehemmstoff	Selleck Chemicals

2.1.5 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Zelllinien eingesetzt. In Tabelle 5 sind ihre Charakteristika, Herkunft sowie die zur Kultivierung verwendeten Medien aufgelistet.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Charakteristika	Kulturmedium	Herkunft	Literatur
Daoy	Humane Medulloblastom-Zelllinie (desmoplastisch)	RPMI + 10 % FBS + 1 % P/S	Tumor eines vierjährigen Jungen; Scott Pomeroy, Harvard Medical School	Jacobsen et al. 1985
NIH-3T3	Murine Fibroblasten-Zelllinie	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S	Fibroblasten von Mausembryonen; AG Liebner, Edinger Institut Frankfurt	Todaro et al. 1963
SH-SY5Y	Humane Neuroblastom-Zelllinie	RPMI + 10 % FBS + 1 % P/S	Sublinie aus der Neuroepithelom-Zelllinie SK-N-SH (aus dem Knochentumor eines vierjährigen Jungen)	Biedler et al. 1978
SJMM4	Murine Medulloblastom-Zelllinie	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S	Tumor einer drei Monate alten Maus: <i>Ptch1</i> ^{+/-} <i>Tp53</i> WT; Tom Curran, The Children's Mercy Hospital, Kansas City	Li et al. 2003
UW473	Humane Medulloblastom-Zelllinie (klassisch)	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S	Tumor eines fünfjährigen Jungen; Michael Bobola	Bobola et al. 2005

2.1.6 Geräte

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose Gelelektrophoresekammer (Compact XS/S)	Biometra
Heraeus Multifuge 3 S-R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Heraeus Pico17 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Infinite M200 plate reader	Tecan
Leica DM IL LED Mikroskop	Leica

Leica M165 FC Mikroskop	Leica
LightCycler 480 System	Roche
MilliQ-Anlage (Synthesis A10)	Millipore
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Neubauer Zählkammer	Carl Roth
Nikon Eclipse Ti2 Mikroskop	Nikon
PCR-Thermocycler (T3 Thermocycler)	Biometra
Pipetus	Hirschmann
Sterilbank Heraeus HERAsafe	Thermo Fisher Scientific
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex Mixer SA8	Stuart
Waage (Sartorius extend)	Sartorius
Wasserbad	Lauda
Zellinkubator Heraeus HERAcell 240	Thermo Fisher Scientific

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Drigalskispatel	Hartenstein
Eppendorf Röhrchen: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Thermo Fisher Scientific
Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific
MicroAmp optische 96-Well qPCR Platten	Applied Biosystems
Nunclon Petrischale 10x35 mm	Thermo Fisher Scientific
PCR-Gefäße Deckel	Thermo Fisher Scientific
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Zellkulturflaschen Adhärent/Suspension: T25, T75, T175	Sarstedt
Zellkulturplatten Adhärent/Suspension: 6-, 12-, 24-, 96-Well-Format	Sarstedt
Zellsieb 40 µm	Corning Life Sciences

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturarbeiten

2.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Zellkulturinkubator in entsprechendem Medium (siehe Tabelle 5). Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an der Zellkulturbank durchgeführt. Um die Zellen zu passagieren, wurden sie zunächst mit PBS gewaschen und bei Adhärenz anschließend mittels 0,05 % Trypsin/EDTA gelöst. Durch Zugabe von Kulturmedium (inklusive FCS) wurde die Trypsin-Reaktion gestoppt. Nach Zentrifugation bei 300xg für 5 Minuten wurden die Zellen je nach Linie in einem Verhältnis zwischen 1:5 bis 1:30 in frischem Medium ausgesät. Zellzählungen wurden unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärbung der Zellen mit Trypanblau durchgeführt.

2.2.2 Tierexperimentelle Arbeiten

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden von der Hamburger Tierschutzbehörde genehmigt (Referenz N099/2019) und nach nationalen Standards durchgeführt. Die Tiere wurden bei einem konstanten Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden gehalten. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Jungtiere bis zum Alter von 13 Tagen wurden durch Dekapitation getötet.

2.2.2.1 Mauslinien

Für diese Arbeit wurden Wildtyp-Tiere der Linie C57/B16 verwendet. Weiterhin kamen transgene Maus-Modelle des Genotyps *Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}* zum Einsatz. Diese Tiere entwickeln mit vollständiger Penetranz im Alter von wenigen Tagen Medulloblastome (Schüller et al. 2008, Yang et al. 2008).

2.2.2.2 Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurde den Jungtieren früh postnatal eine Gewebeprobe von der Schwanzspitze entnommen. Das Gewebe wurde mit 500 µl Lysepuffer, bestehend aus 200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS

und 200 µg/ml Proteinase K in ddH₂O, versetzt und mindestens 2 Stunden bei 56 °C und 1200 rpm verdaut. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten zentrifugiert (4 °C, 14000 rpm) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß mit 500 µl Isopropanol überführt. Hierbei kommt es zum Ausfallen der genomischen DNA, welche erneut bei 4°C und 14000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde anschließend in TE-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 1 mM EDTA in ddH₂O) gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

Die Genotypen der Mäuse wurden anhand der genomischen DNA bestimmt. Hierfür wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) spezifische Regionen des Genoms amplifiziert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die PCR wurde nach dem in Tabelle 9 aufgeführten Programm durchgeführt.

Tabelle 8: Primer für die Genotypisierung

Primer	Sequenz (5' → 3')
Cre Fw	TCCGGGCTGCCACGACCAA
Cre Rv	GGCGCGGCAACACCATTTT
Ptch Fw	TTCATTGAACCTTGGGGAAC
Ptch Rv	AGTGCGTGACACAGATCAGC

Tabelle 9: PCR-Programm für die Genotypisierung

Reaktionsabschnitt	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	1	95	120
Denaturierung	35	95	30
Primerhybridisierung		60/65	30
Elongation		72	60
Finale Elongation	1	72	120
Stop		4	∞

Im Anschluss wurde eine Gelelektrophorese unter Verwendung eines 2 %-Agarose-Gels bei 150 mA für 30 Minuten durchgeführt, um die Fragmentgrößen der PCR-Produkte zu analysieren.

2.2.3 Primärzellkultur

2.2.3.1 SHH-Protein-Herstellung

Für die Herstellung des für die Primärzellkultur benötigten SHH-Proteins wurden SHH exprimierende kompetente Bakterien (BL21/pEXP-DEST-LRC4) über Nacht in LB (Lysogeny broth)-Amp (Ampicillin) Medium bei 37 °C angezogen. Die Vorkultur wurde anschließend im Verhältnis 1:20 in LB-Amp-Medium bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,4 - 0,6 bei 37 °C inkubiert. Die Expression von SHH wurde durch die Zugabe von 1M Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (Endkonzentration 1 mM in LB-Amp-Medium) induziert. Nach einer 2-stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen pelletiert und durch 2,5-minütige Sonifizierung homogenisiert. Das SHH-Protein wurde durch die Verwendung der Protino Ni TED 2000 oder NiIDA 200 Kits (Macherey Nagel) aufbereitet und mittels Vivaspin™6-Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert. Die Quantifikation der aufbereiteten Proteine erfolgte durch den Bicinchoninsäure-Assay (Smith et al. 1985) und die qualitative Analyse des finalen Lysats per SDS-PAGE (Laemmli et al. 1970). Das SHH-Protein besitzt hierbei eine Größe von etwa 30 kDA. Die Lagerung erfolgte in SHH-Puffer (5mM Na_2HPO_4 , 150mM NaCl in ddH₂O) mit 0,5 mM Dithiothreitol bei -80 °C.

2.2.3.2 Körnerzellkultur

Für die Kultivierung von Körnerzellvorläufern wurden *C57/Bl6* Wildtyp-Mäuse im postnatalen Alter von 5 - 8 Tagen dekapitiert und das gesamte Hirn unter sterilen Bedingungen präpariert. Die Präparate wurden während der gesamten Prozedur auf Eis gelagert. Unter einem Stereomikroskop wurden die Meningen und sichtbare Gefäße weitestgehend entfernt und das Cerebellum vom Großhirn getrennt. Das Kleinhirngewebe wurde zerkleinert und anschließend in HBSS-Puffer (Hank's buffered saline solution, mit 6 g/l D-Glukose, 1x) bei 70xg für 5 Minuten zentrifugiert. Im folgenden Schritt wurde der Überstand entfernt und das Pellet in Lysepuffer (1,8 ml Trypsin/EDTA und 200 μ l DNase (10x)) für

10 Minuten bei 37 °C inkubiert und währenddessen einige Male manuell invertiert. Durch Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) in Körnerzellmedium (s. Tabelle 10) wurde das Trypsin anschließend inhibiert. Nach einer Wartezeit von 30 - 60 Sekunden setzte sich unverdautes Gewebe am Boden ab und die Zellsuspension konnte in ein neues Gefäß übertragen und bei 200xg für 5 Minuten zentrifugiert werden. Nach Abnahme des Überstands und erneutem Waschen in HBSS (200xg, 5 Minuten) wurde das Pellet in Medium inkl. FCS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein 40 µm Zellsieb pipettiert und in Körnerzellmedium inkl. FCS in einer Dichte von 1500 - 2000 Zellen/µl auf poly-L-Ornithin (15 µg/ml in PBS) beschichtete 24-Well-Platten ausgesät. Nach einer Ruhephase von 6 - 12 Stunden wurde das Medium abgenommen und durch Körnerzellmedium ohne FCS ersetzt, welches SHH-Protein (3 µg/ml) enthielt. SHH induziert die Proliferation von Körnerzellvorläufern, während andere Zellen den Zellzyklus verlassen, sodass eine homogene Körnerzellkultur entsteht.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Körnerzellmediums

Körnerzellmedium
DMEM-F12
+ 1 % Penicillin/Streptomycin
+ 1 % N2 Supplement
+ 1 % L-Glutamin
+ 1,25 % 2M KCl (Finale Konzentration.: 25 mM)

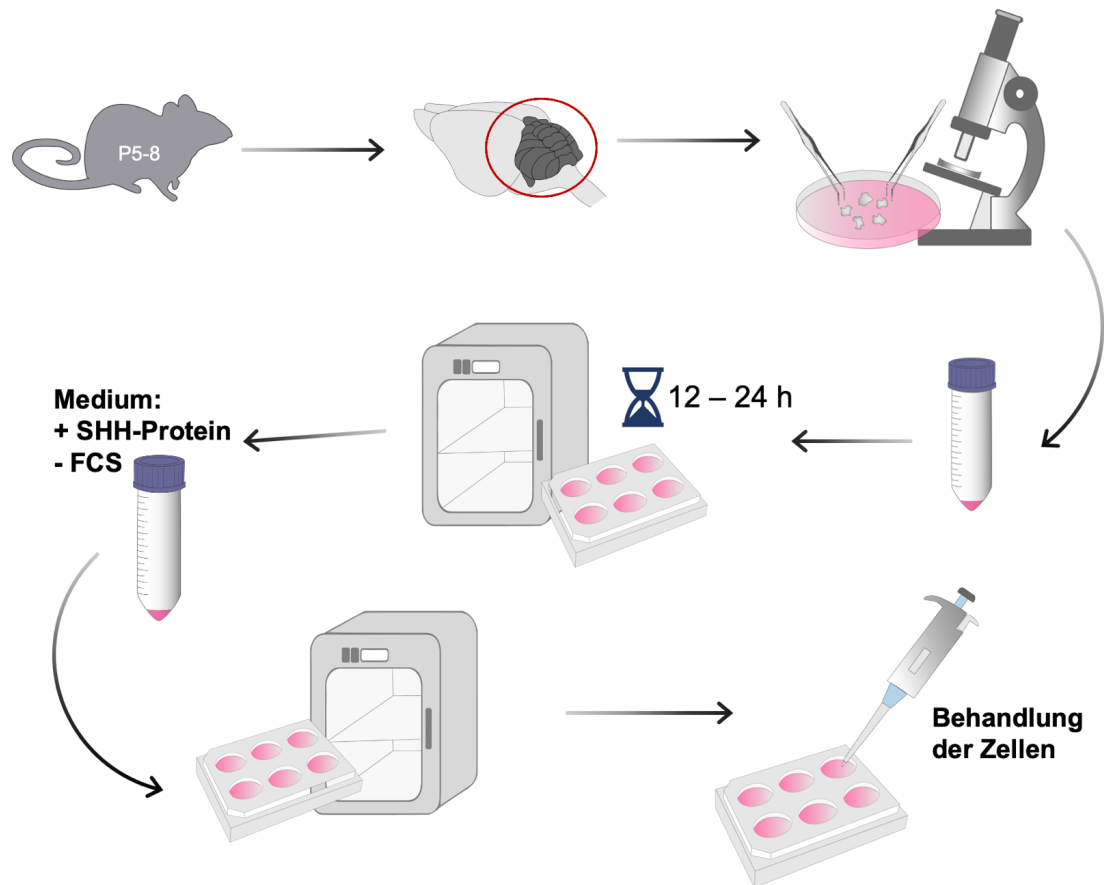


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Isolation von Körnerzellvorläufern.

Verwendet wurden Cerebella von Mäusen im Alter von P5-8. Das Kleinhirngewebe wurde mechanisch zerkleinert, zu einer Zellsuspension aufbereitet und ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 12 - 24 Stunden fand ein Mediumwechsel mit Zugabe von SHH-Protein und Entfernung von FCS statt. Die Zellen wurden erneut für einige Stunden inkubiert und anschließend behandelt. h = Stunden, FCS = fetales Kälberserum, SHH-Protein = Sonic Hedgehog-Protein.

2.2.3.3 Tumorzellkultur

Für die Tumorzellkulturen wurden Mäuse mit homozygotem Knockout von *Ptch1* (*Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*) im postnatalen Alter von 8 - 12 Tagen eingesetzt. Diese wiesen zumeist einen bereits makroskopisch sichtbaren Tumor im Bereich des Kleinhirns auf. Die Präparation und das weitere Vorgehen erfolgte angelehnt an die in Kapitel 2.2.3.1 beschriebene Prozedur. Nach der Präparation des Tumors wurde dieser mechanisch zerkleinert und bei 70xg für 5 Minuten in HBSS zentrifugiert. Zur Dissoziation der Zellen wurde Accutase™ Zelldissoziationsreagenz eingesetzt und für 15 Minuten auf den Zellen belassen. Nach 5 und 10 Minuten wurde die Zellsuspension jeweils vorsichtig resuspendiert. Die weiteren Schritte erfolgten analog zur Körnerzellkultur. Am

Ende der Prozedur wurden die Zellen in einer Dichte von 500 Zellen pro μl in 24- oder 96-Well-Suspensionsplatten ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das verwendete Medium besaß die in Tabelle 11 beschriebene Zusammensetzung. Auf die Zugabe von SHH-Protein wurde verzichtet, da die Tumorzellen durch den *Ptch1*-Knockout ohnehin einen konstitutiv aktivierten Sonic Hedgehog-Signalweg besitzen. Die Tumorzellen wachsen in Sphären und lassen sich über einen Zeitraum von etwa drei Wochen in Kultur halten. Die Wachstumsfaktoren EGF und FGF wurden alle zwei Tage erneut supplementiert.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Tumorzellmediums

Tumorzellmedium
DMEM-F12 Glutamax
+ 1 % Penicillin/Streptomycin
+ 2 % B27 Supplement
+ 1 % MEM (Nicht essentielle Aminosäuren)
+ EGF (Finale Konzentration.: 20 ng/ml)
+ FGF (Finale Konzentration 10 ng/ml)

2.2.3 *In vitro* Experimente

2.2.3.1 Vorbereitung der Zellen

Um das Ansprechen von primären Körnerzellvorläufern, primären Medulloblastomzellen sowie fünf verschiedener Zelllinien auf die Medikamente MTX, LDE225 und Vincristin zu testen, wurden *in vitro* Experimente durchgeführt. Hierfür wurden die Körnerzellvorläufer und die Medulloblastomzellen direkt nach Isolation in einer Dichte von 8×10^5 bzw. 5×10^5 Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät und nach 24-stündiger Inkubationszeit bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie 95 % Luftfeuchtigkeit mit den zu testenden Substanzen behandelt. Die Körnerzellvorläufer erhielten zuvor einen Mediumwechsel mit Zugabe des SHH-Proteins (3 $\mu\text{g/ml}$). Die Zelllinien wurden in einer Dichte von 5×10^3 Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät und ebenfalls für 24 Stunden inkubiert.

2.2.3.2 Behandlung der Zellen mit MTX, LDE225 und Vincristin

Im nächsten Schritt wurden die Primärzellen und Zelllinien mit den Zytostatika MTX und Vincristin sowie mit dem direkten SHH-Signalweginhibitor LDE225 behandelt. Das MTX wurde zunächst in 1 M NaOH gelöst und mit ddH₂O zu einer Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mM MTX verdünnt. Diese wurde bei -20 °C gelagert. Für die Behandlung der Zellen erfolgte die weitere Verdünnung der Stammlösung in Zehnerpotenzen mit entsprechendem Kulturmedium. Die Endkonzentration auf den Zellen betrug zwischen 1 nM und 1 mM. Der Signalweginhibitor LDE225 wurde in 1 % DMSO zu einer 20 mM Stammlösung gelöst, bei -20 °C gelagert und bei Verwendung in Kulturmedium verdünnt. Das Zytostatikum Vincristin wurde in ddH₂O gelöst, in einer Stammkonzentration von 20 mM bei -20 °C gelagert und ebenfalls in Kulturmedium weiter verdünnt. Nach 24-stündiger Inkubationszeit bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie 95 % Luftfeuchtigkeit wurden die zu testenden Substanzen MTX, LDE225 und Vincristin in das Medium appliziert und bis zum jeweiligen Endzeitpunkt der Experimente auf den Zellen belassen. Die jeweiligen Kontrollen enthielten entsprechende Konzentrationen von NaOH und DMSO.

2.2.4 Viabilitätsbestimmungen

Als Maß für die Zellviabilität wurde der ATP-Umsatz der Zelllinien und Primärzellen gemessen. Dies erfolgte mittels des CellTiterGlo[®]-Assays, der auf einer Luciferase-Reaktion basiert: Hierbei wird Luciferin zu Oxyluciferin umgewandelt, wodurch messbare Lumineszenz entsteht. Für diese Reaktion wird ATP benötigt, welches von metabolisch aktiven Zellen gebildet wird und demzufolge können nur ebendiese das lumineszente Signal generieren. Für den Assay wurden die Zellen im 96-Well-Format kultiviert und je Well 100 µl CellTiterGlo[®]-Reagenz hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 2 Minuten geschüttelt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lumineszenz wurde in einem Mikroplatten-Reader (Infinite M200 plate reader, Tecan) gemessen und verhält sich direkt proportional zur Anzahl der vitalen Zellen in einer Zellkultur. Eine weitere Verwendung der Zellen nach Durchführung des Assays war nicht möglich, da für die Freisetzung des ATP eine Lyse erforderlich ist. Die relative Zellviabilität für jeden Zelltyp wurde als Viabilität im Verhältnis zu den nur mit dem jeweiligen Lösungsmedium behandelten Zellen

determiniert. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) ist definiert als diejenige Konzentration, bei der 50 % des maximalen Effekts der Substanz auf die Viabilität beobachtet wurden.

2.2.5 Immunhistochemie

2.2.5.1 Bromdesoxyuridin-Immunfärbungen

Zur Markierung proliferierender Zellen in einer Zellkultur wurden Bromdesoxyuridin (BrdU)-Immunfärbungen durchgeführt. Das Thymidin-Analogon BrdU wird in proliferierenden Zellen während der S-Phase in die neu synthetisierte DNA inkorporiert und kann anschließend fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. Die hierfür verwendeten Antikörper sind in Tabelle 12 aufgeführt. Zunächst wurden die Zellen auf Deckgläsern in 24-Well-Platten ausgesät und am Fixierungszeitpunkt nach Zugabe des BrdU für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und durch 10-minütige Behandlung mit 4 % Formalin fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die 5-minütige Permeabilisierung mit PBS-Triton 0,3 % (PBS-T). Vor Beginn der weiteren Färbeschritte war zum Nachweis von BrdU eine Denaturierung der DNA durch eine Behandlung mit 4 N HCl für 10 Minuten erforderlich. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten in Borax-Puffer neutralisiert. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation mit 10 % normalem Ziegen-Serum in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgte die Zugabe des Primärantikörpers, welcher zuvor im Verhältnis 1:100 in Blockierungslösung verdünnt wurde, über Nacht bei 4 °C. Die Zellen wurden im Folgenden 3-fach mit PBS-T gewaschen und für mindestens eine Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde DAPI (5 mg/ml Stammlösung) im Verhältnis 1:1000 hinzugegeben. Der Sekundärantikörper sowie DAPI wurden in PBS-T inkl. 3 % normalem Ziegen-Serum gelöst. Abschließend wurden die Zellen 2-fach mit PBS gewaschen und die Deckgläser mittels Mowiol auf Objektträgern fixiert. Die Auswertung erfolgte am Nikon Ti2 Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der Software *NIS elements* unter Verwendung der automatischen Zählfunktion.

Tabelle 12: Für die Immunfärbung verwendete Antikörper, ihre Herkunft und Verdünnung

	Antikörper	Herkunft	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Primär-antikörper	anti-BrdU	Maus	1 : 100	Invitrogen	B35128
Sekundär-antikörper	alpha-mouse Alexa Fluor 555	Ziege	1 : 500	Cell Signaling Technology	CST4409

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurde die Trizol-Methode nach Chomczyński angewandt (Chomczynski 1993). Die Zellen wurden in Trizol homogenisiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde Trichlormethan hinzugefügt, erneut 3 Minuten inkubiert und die Phasen durch Zentrifugation (14000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C) separiert. Die obere Phase mit der enthaltenen RNA wurde mit demselben Volumen Isopropanol homogenisiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation (14000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C) wurde die RNA ausgefällt, das Pellet nachfolgend mit 75 % Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert (8000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C). Das Pellet wurde nach Entfernung des Überstands bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die Konzentration der RNA wurde mittels eines Spektrophotometers (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die extrahierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.6.2 cDNA-Synthese

Zunächst wurden alle RNA-Proben eines DNase-Verdau unter Verwendung der *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega) unterzogen, um eine Verunreinigung mit DNA zu vermeiden. Hierfür wurde die RNA mit dem Reaktions-Puffer (400 mM Tris-HCl [pH 8,0 bei 25 °C], 100 mM MgSO₄, 10 mM CaCl₂), 1 u/µg RNA DNase und nukleasefreiem Wasser für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Stop-Lösung (20 mM EGTA [pH 8,0 bei 25 °C]) hinzugegeben und für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Die verbliebene

RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt und mithilfe des miScript II RT Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Die Lagerung der cDNA-Proben erfolgte bei -20 °C.

2.2.6.3 qRT-PCR

Die Expression der Zielgene in den Proben wurde durch relative Quantifizierung mittels qRT-PCR bestimmt. Hierfür wurde das LightCycler 480-System (Roche) mit dem SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung des Ansatzes:

Tabelle 13: Zusammensetzung des qRT-PCR-Ansatzes

Komponente	Menge	Endkonzentration
SybrGreen	5 µl	1 X
Primer Fw	0,4 µl	400 nM
Primer Rv	0,4 µl	400 nM
Ggf. MgCl ₂	0,26 µl	
DEPC-Wasser	Σ 7 µl	

Zur Normalisierung der Messergebnisse fungierte GAPDH als *Housekeeping*-Gen und als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit DNase-freiem Wasser anstelle von cDNA verwendet. Die verwendeten Primer wurden von Metabion bezogen und mit einer Konzentration von 10 pmol/µl in ddH₂O gelöst. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Primer für die qRT-PCR

Primer	Sequenz (5' → 3')
Gapdh Fw	GAGAAACCTGCCAAGTATG
Gapdh Rv	GGAGTTGCTGTTGAAGTC
p53 Fw	GTATTTACCCCTCAAGATCC
p53 Rv	TGGGCATCCTTTAACTCTA
Cdkn1a Fw	CTTGCACTCTGGTGTCTG
Cdkn1a Rv	CTTGGAGTGATAGAAATCTGTCA
mGli1 Fw	CGCCCCGACGGAGGTCTCTT
mGli1 Rv	GCTGGCCGTCCCAACTGCTT

Für eine qRT-PCR-Reaktion wurden 100 ng cDNA eingesetzt. Hierfür wurden die cDNA-Proben jeweils unter Verwendung von DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 33,3 ng/µl verdünnt. Pro Reaktionsansatz wurden anschließend 7 µl des qRT-PCR-Ansatzes (Tabelle 13) und 3 µl der verdünnten cDNA-Probe pipettiert. Die qRT-PCR wurde nach folgendem Schema in Triplikaten durchgeführt:

Tabelle 15: LightCycler-Programm der qRT-PCR

Reaktionsabschnitt	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	1	95	120
Denaturierung	40	95	5
Primerhybridisierung		62	10
Elongation		72	15
Stop		4	∞

Auf den qRT-PCR-Prozess folgte eine Schmelzkurvenanalyse von 60 - 95 °C, um doppelsträngige DNA der spezifischen PCR-Produkte von unspezifisch entstehenden Primerdimeren zu unterscheiden. Die Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse fand mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode statt (Livak and Schmittgen 2001). Hierfür wurden die *threshold cycle*-Werte der Zielgene *p53*, *Cdkn1a* und *Gli1* jeweils folgendermaßen auf das *Housekeeping*-Gen *Gapdh* normalisiert: $\Delta\text{Ct} = 2^{-(\text{Ct}(\text{Probe})-\text{Ct}(\text{Housekeeper}))}$. Um einen Unterschied in der Genexpression zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu detektieren, wurde anschließend $\Delta\Delta\text{Ct}$ nach der Formel $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{behandelt}) - \Delta\text{Ct}(\text{unbehandelt})$ berechnet.

2.2.7 Datenerhebung und -analyse

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Microsoft Excel Version 16.43, SPSS Statistics Version 28.0.1.1 sowie GraphPad Prism Version 8. Es wurden Mittelwerte der Replikate gebildet und abhängig vom experimentellen Design eine univariate Varianzanalyse oder ein ungepaarter t-Test angewandt. Im Fall von multiplen Testungen wurde nach Bonferroni korrigiert. IC_{50} -Werte wurden unter Verwendung von GraphPad Prism berechnet. Es wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ gewählt und in den Abbildungen folgendermaßen dargestellt: n.s. = nicht signifikant; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,1$; *** = $p \leq 0,001$. In den Abbildungen sind die Standardfehler (SEM) gezeigt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Effekt der MTX-Behandlung auf murine Körnerzellvorläufer

3.1.1 Zellviabilität unter MTX-Behandlung

Um den Einfluss einer MTX-Behandlung auf die Viabilität zu testen, wurden murine Körnerzellvorläufer über Zeiträume von 24, 72 und 144 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des Zytostatikums behandelt (Abbildung 6). Zu keinem der Zeitpunkte war ein signifikanter Effekt der MTX-Behandlung zu beobachten. Nach 24 Stunden Behandlungsdauer lag die Viabilität unter allen getesteten Konzentrationen im Bereich der unbehandelten Kontrollen. An den Messzeitpunkten 72 Stunden und 144 Stunden reduzierte sich der Metabolismus der murinen Körnerzellvorläufer bei Konzentrationen von 1 μ M lediglich auf 97 % respektive 95 % und unter 1 mM MTX auf 86 % respektive 83 %.

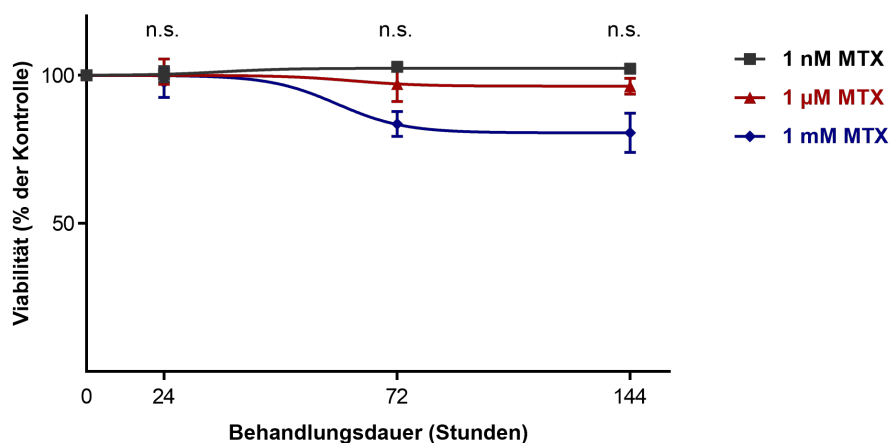


Abbildung 6: Viabilität von Körnerzellvorläufern unter MTX-Behandlung.

Die Viabilität von Körnerzellvorläufern sank weder nach 24, 72 oder 144 Stunden signifikant unter MTX-Konzentrationen von 1 nM - 1 mM. Auf der X-Achse sind die verschiedenen MTX-Konzentrationen im Verhältnis zur Viabilität auf der Y-Achse aufgetragen. Die Messwerte wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die Kontrollen normalisiert; eine Viabilität von 100 % entspricht dem Wert der mit NaOH behandelten Kontrollen. n.s. = nicht signifikant.

3.1.2 Proliferation unter MTX-Behandlung

Murine Körnerzellvorläufer wurden über einen Zeitraum von 144 Stunden mit verschiedenen MTX-Konzentrationen behandelt, anschließend fixiert und einer BrdU-Färbung unterzogen. Im Zusammenhang mit der Gesamtzellzahl sollten die BrdU-gefärbten Zellen Aufschluss über die Proliferation unter Einfluss von MTX geben. In Abbildung 7(a) sind die Gesamtzellzahl (DAPI) sowie die Anzahl

der proliferierenden Zellen (BrdU⁺) in Abhängigkeit der eingesetzten MTX-Konzentrationen dargestellt. Hier ist ersichtlich, dass die Gesamtzellzahl unter MTX-Einfluss weitestgehend unverändert bleibt. Die Proliferation der Zellen sinkt unter der höchsten MTX-Konzentration von 1 mM auf 71 %, wobei dieser Effekt nicht signifikant ist ($p=0,72$). Weder die Größe der Zellpopulation noch die Zahl der proliferierenden Zellen wird somit durch MTX signifikant beeinflusst.

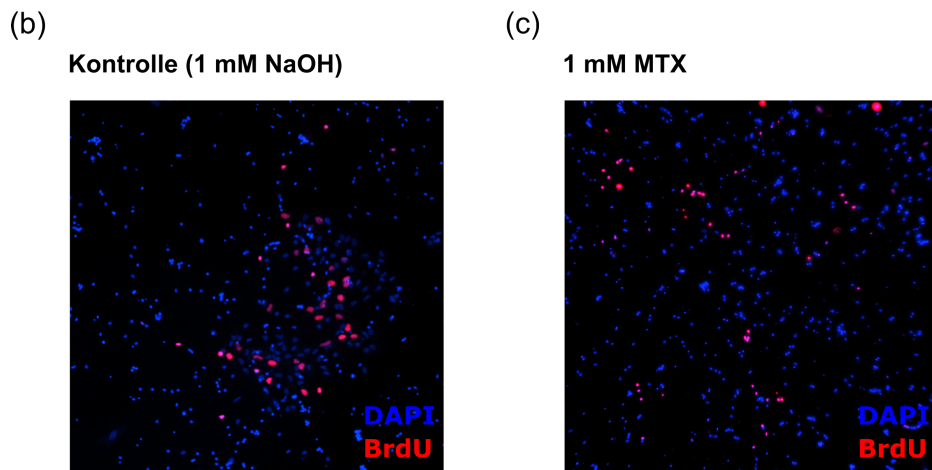
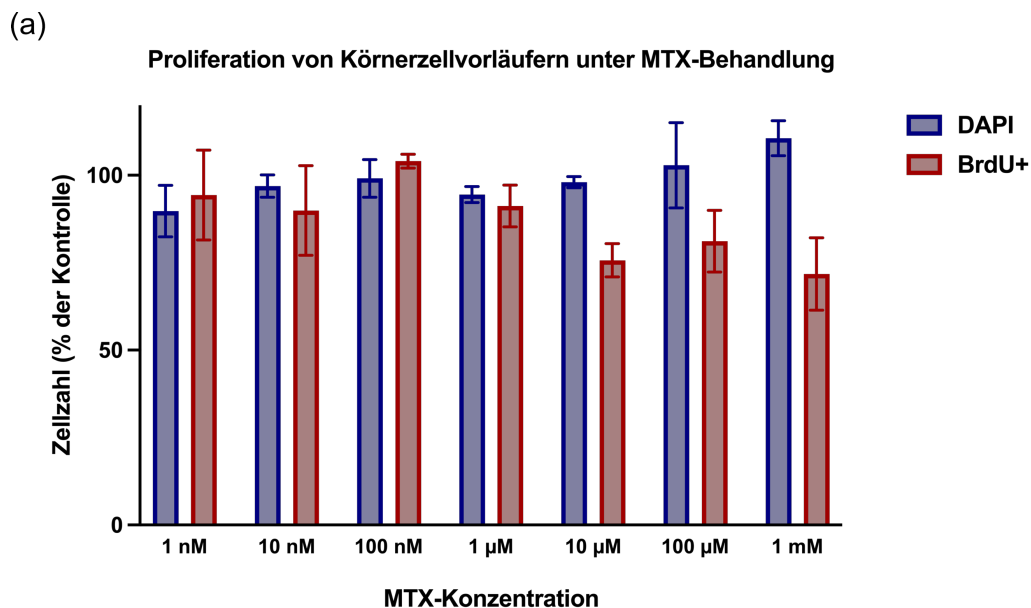


Abbildung 7: Proliferation von Körnerzellvorläufern unter MTX-Behandlung.

(a) Eine Behandlung mit MTX zeigte weder einen Einfluss auf die Gesamtzellzahl (DAPI) noch auf die Anzahl der proliferierenden Zellen (BrdU⁺) in einer Population von Körnerzellvorläufern. Die gezählten Zellzahlen wurden auf die NaOH-behandelten Kontrollen normalisiert. (b-c) Vergleich der Kontrolle (1 mM NaOH) mit der höchsten eingesetzten MTX-Konzentration. Die Zahl der DAPI gefärbten Zellen (blau) war unter MTX-Behandlung vergleichbar, die BrdU⁺ (rot) Zellen waren nur leicht reduziert.

3.1.3 Genexpression von *Gli1*, *Tp53* und *Cdkn1a* unter MTX-Behandlung

Um die Wirkung von MTX auf Körnerzellvorläufer auf molekularer Ebene weiter zu untersuchen, wurden Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR durchgeführt (Abbildung 8). Zur Beurteilung der Aktivität des SHH-Signalwegs diente die Messung der mRNA-Level des Zielgens *Gli1*. Nach 144 Stunden Behandlung mit 1 μ M MTX war die Expression von *Gli1* signifikant um das etwa 4-fache erniedrigt ($p=0,0169$). Um weitere potenzielle Angriffspunkte von MTX zu betrachten, wurden außerdem die mRNA-Level der Gene *Tp53* und *Cdkn1a* bestimmt. In Abbildung 8 ist ersichtlich, dass sich in Körnerzellvorläufern die Expression von *Tp53* unter MTX-Behandlung nicht signifikant von der Kontrolle unterscheidet. Die Expression von *Cdkn1a* ist leicht, aber nicht signifikant, erhöht ($p=0,3882$).

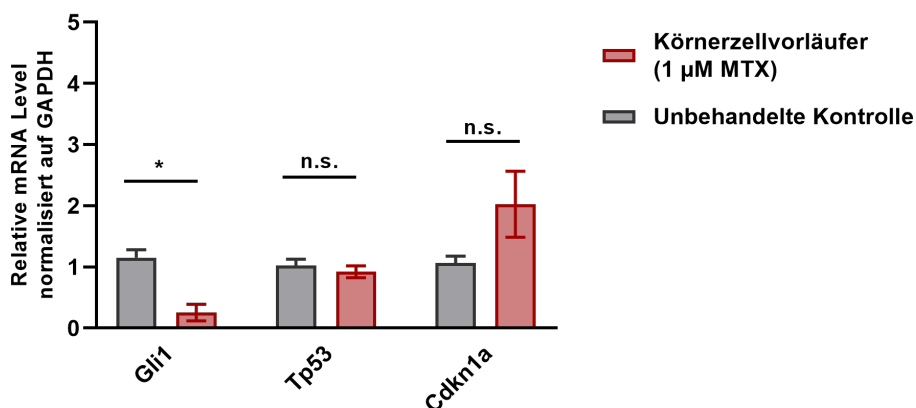


Abbildung 8: Genexpression in Körnerzellvorläufern unter MTX-Behandlung.

Eine Behandlung von Körnerzellvorläufern mit 1 μ M MTX hatte einen signifikanten Einfluss auf die Expression des Transkriptionsfaktors *Gli1*. Die Expression von *Tp53* sowie *Cdkn1a* war nicht signifikant verändert. n.s.= nicht signifikant, * $p \leq 0,05$.

3.2 Effekt der MTX-Behandlung auf primäre murine Medulloblastomzellen

3.2.1 Zellviabilität unter MTX-Behandlung

Murine Medulloblastomzellen des Genotyps *Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}* wurden mit MTX-Konzentrationen im Bereich von 1 nM - 1 mM behandelt (Abbildung 9). Nach 72 Stunden sowie nach 144 Stunden wurden Viabilitätsmessungen durchgeführt. Während nach 72-stündiger Behandlung für keine der Konzentrationen ein signifikanter Effekt messbar war, konnte nach 144 Stunden ein deutlicher Abfall der Viabilität auf 26 % der Werte der NaOH behandelten Kontrollen beobachtet werden ($p < 0,001$). Dieser Effekt war ab

MTX-Konzentrationen von 100 nM messbar. Der IC_{50} -Wert liegt nach 144 Stunden MTX-Behandlung bei 26 nM. Somit hat die Expositionsdauer von MTX einen entscheidenden Effekt auf den ATP-abhängigen Zellmetabolismus von primären Medulloblastomzellen.

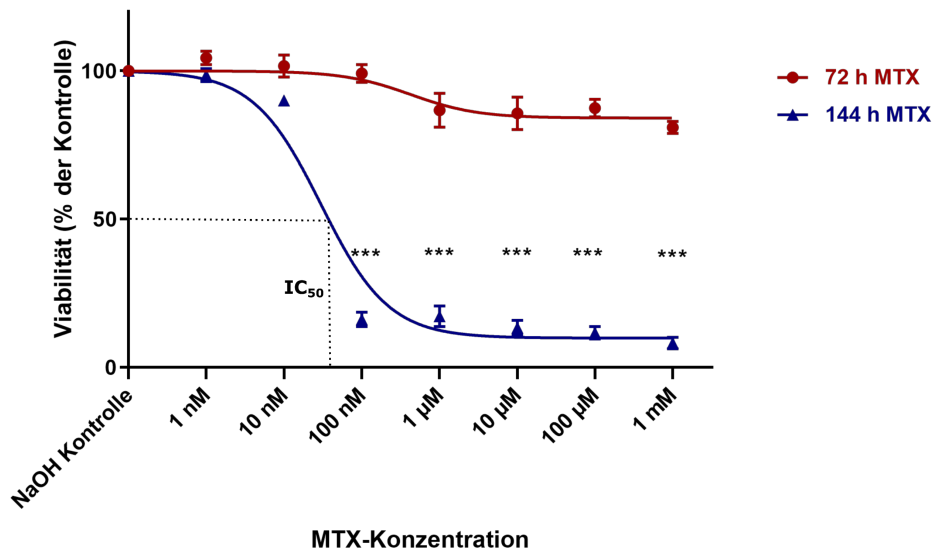


Abbildung 9: Viabilität von primären murinen Medulloblastomzellen unter MTX-Behandlung.

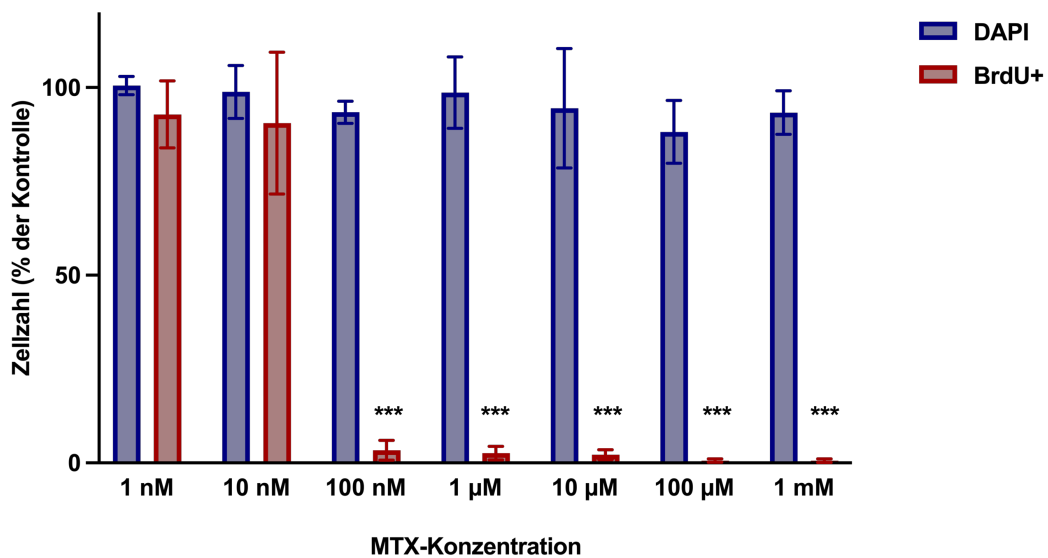
Unter Exposition von MTX reduzierte sich bei primären Medulloblastomzellen die Viabilität nach 144 Stunden signifikant ab einer Konzentration von 100 nM, während nach 72 Stunden Behandlung noch kein Effekt auftrat. Die Messwerte wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die Kontrollen normalisiert; eine Viabilität von 100 % entspricht dem Wert der mit NaOH behandelten Kontrollen. h = Stunden. *** $p \leq 0,001$.

3.2.2 Proliferation unter MTX-Behandlung

Populationen von primären Medulloblastomzellen des Genotyps *Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}* wurden über einen Zeitraum von 144 Stunden mit MTX behandelt und einer BrdU-Immunfärbung unterzogen. Hier zeigten diese eine signifikante Reduktion der Proliferation. Die Anzahl der BrdU⁺ Zellen war unter einer Konzentration von 100 nM MTX um 97 % geringer als in den unbehandelten Kontrollen ($p < 0,001$) (Abbildung 10a). Die Gesamtzellzahl blieb hingegen auch bei hohen MTX-Konzentrationen unverändert. Somit ist anzunehmen, dass MTX die Tumorzellpopulation in deren Proliferation inhibiert und dabei allerdings nicht in der Größe reduziert. Dies resultiert in einer reduzierten Proliferationsrate von 15 - 20 % auf ca. 1 % (Abbildung 10b).

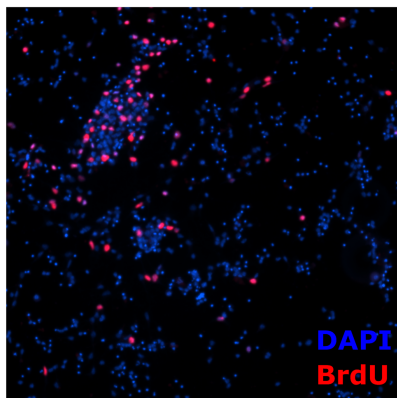
(a)

Proliferation von primären Medulloblastomzellen unter MTX-Behandlung



(b)

10 nM MTX



(c)

100 nM MTX

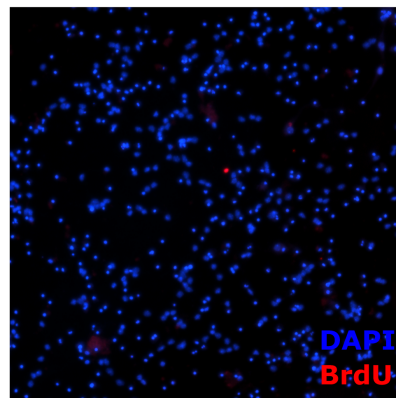


Abbildung 10: Proliferation von primären murinen Medulloblastomzellen unter MTX-Behandlung.

(a) Eine Behandlung von primären Medulloblastomzellen mit MTX hatte keinen Einfluss auf die Gesamtzellzahl (DAPI), reduzierte aber signifikant die Anzahl der proliferierenden Zellen (BrdU⁺) ab einer MTX-Konzentration von 100 nM. Die gezählten Zellzahlen wurden auf die NaOH-behandelten Kontrollen normalisiert. *** $p \leq 0,001$. (b-c) Unter MTX-Behandlung reduzierte sich die Zahl der BrdU⁺ (rot) Zellkerne, jedoch nicht die der DAPI gefärbten Zellkerne (blau). Die Proliferationsrate sank von 15-20 % auf etwa 1 %.

3.2.3 Genexpression von *Gli1*, *Tp53* und *Cdkn1a* unter MTX-Behandlung

Analog zu den in Abbildung 8 dargestellten Experimenten wurden die primären Medulloblastomzellen hinsichtlich der Expression der Gene *Gli1*, *Tp53* und *Cdkn1a* untersucht (Abbildung 11). Die Zellen wurden zuvor über einen Zeitraum von 144 Stunden mit einer MTX-Konzentration von 1 μ M behandelt. In den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen ist ersichtlich, dass die mRNA-Level von *Gli1* in den MTX-behandelten Zellen signifikant auf 0,02 reduziert sind ($p < 0,001$). Die Expression von *Tp53* unterschied sich nicht signifikant von den Kontrollen, während die mRNA-Level von *Cdkn1a* in den behandelten primären Medulloblastomzellen signifikant um das 4-fache gestiegen sind ($p < 0,001$).

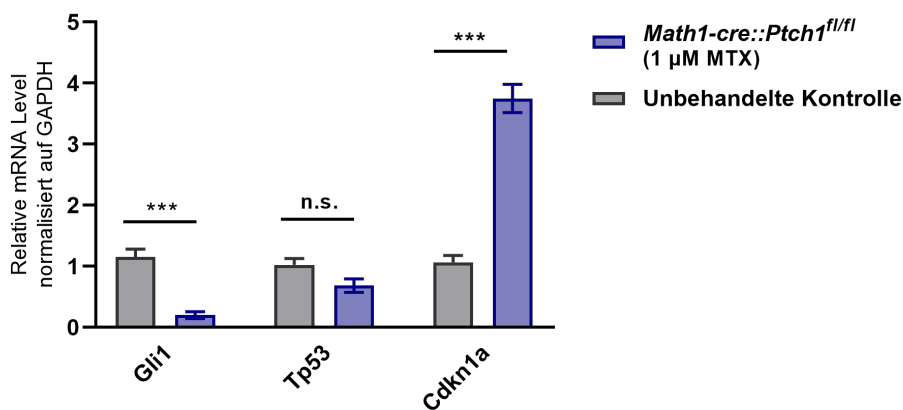


Abbildung 11: Genexpression in primären murinen Medulloblastomzellen unter MTX-Behandlung.

Eine 144-stündige Behandlung von primären Medulloblastomzellen mit 1 μ M MTX reduzierte signifikant die Expression des Transkriptionsfaktors *Gli1* und erhöhte signifikant die Expression von *Cdkn1a*, während sich die Expression von *Tp53* nicht signifikant änderte. n.s. nicht signifikant, *** $p \leq 0,001$.

3.3 Effekt der MTX-Behandlung auf etablierte permanente Zelllinien

3.3.1 Zellviabilität unter MTX-Behandlung

Die etablierten permanenten Zelllinien Daoy, UW473, SJMM4, NIH-3T3 und SH-SY5Y (Tabelle 5) wurden über einen Zeitraum von 144 Stunden mit MTX-Konzentrationen zwischen 1 nM und 1 mM behandelt. Alle fünf Linien reagierten mit einer signifikanten Reduktion der Viabilität (Abbildung 12). Am stärksten ausgeprägt zeigte sich dies in UW473-Zellen, in denen der ATP-abhängige Metabolismus unter 100 nM MTX bei etwa 11,7 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen lag ($p < 0,001$). In ähnlichem Ausmaß reduzierte sich die Viabilität der

NIH-3T3-Zellen auf 12,6 % ($p < 0,001$) und die der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y auf 15,8 % ($p < 0,001$). Neben den UW473-Zellen wurden zwei weitere Medulloblastomzelllinien untersucht: Die Viabilität der Daoy-Zellen lag unter einer MTX-Konzentration von 100 nM bei etwa 22,9 % ($p < 0,001$). Lediglich die SJMM4-Zellen reagierten erst ab einer Konzentration von 1 μM mit einer signifikanten Reduktion der Viabilität auf 47,6 % ($p < 0,001$). Die durchschnittlichen IC_{50} -Werte betragen 37 nM für die Zelllinie UW473, 78 nM für die NIH-3T3-Zellen, 47 nM für SH-SY5Y-Zellen und 53 nM für die Zelllinie Daoy. Der höchste ermittelte IC_{50} -Wert lag bei 451 nM in SJMM4-Zellen. Unter einer weiteren Erhöhung der MTX-Dosis ist die Viabilität in allen Zelllinien nur geringfügig gesunken und ab einer Konzentration von 1 μM auf einem ähnlichen Level stagniert, etwa 27 % im Falle der SJMM4-Zellen und 6 - 16 % in den weiteren untersuchten Zelllinien.

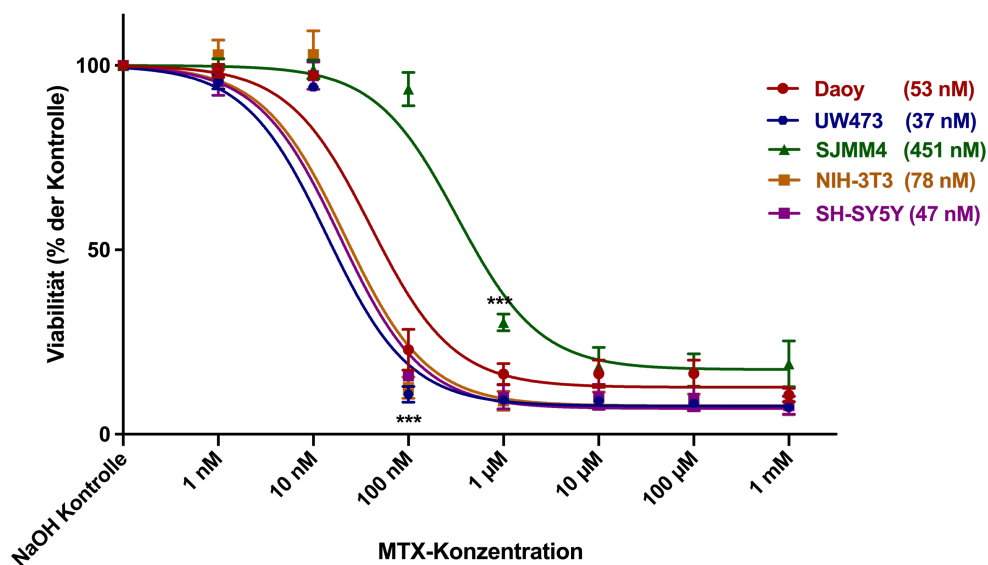


Abbildung 12: Viabilität von etablierten permanenten Zelllinien unter MTX-Behandlung.

Die Zellviabilität unter MTX-Behandlung sankt bei Daoy-, UW473, NIH-3T3- und SH-SY5Y-Zellen signifikant ab einer MTX-Konzentration von 100 nM und bei SJMM4-Zellen ab einer MTX-Konzentration von 1 μM . IC_{50} -Werte in Klammern. *** $p \leq 0,001$.

3.3.2 Proliferation unter MTX-Behandlung

Die Zelllinien Daoy, UW473, SJMM4, NIH-3T3 und SH SY5Y wurden nach 144-stündiger Behandlung mit MTX einer BrdU-Immunfärbung unterzogen. Hierbei war in allen Zelllinien sowohl eine Abnahme der Gesamtzellzahl als auch der proliferierenden Zellen sichtbar. Die Abbildung 13(a-e) zeigt das Verhältnis der behandelten Zellen zu den unbehandelten Kontrollen. Die Zellkerne und somit die gesamte Anzahl der Zellen wurden in den Experimenten mit DAPI gefärbt und die proliferierenden Zellen sind durch BrdU markiert. SH-SY5Y-Zellen und NIH-3T3-Zellen reagierten ab einer MTX-Konzentration von 100 nM mit einer Abnahme der Gesamtzellzahl auf 5,2 % ($p < 0,001$) respektive 9,6 % ($p < 0,001$). Die Anzahl der proliferierenden Zellen reduzierten sich signifikant auf 8,4 % ($p < 0,001$) in den SY5Y-Zellen und auf 3,4 % ($p < 0,001$) im Falle der NIH-3T3-Zellen. In Daoy-Zellen sank nach 144 Stunden MTX-Behandlung die Gesamtzellzahl auf 20,8 % ($p = 0,018$) und die Zahl der proliferierenden Zellen auf 19,9 % ($p < 0,001$) im Verhältnis zu unbehandelten Daoy-Zellen. UW473-Zellen reagierten bei einer MTX-Dosis von 100 nM ebenfalls mit einer signifikanten Reduktion der Zellzahl (21,9 %, $p = 0,005$) und der BrdU⁺ Zellen (29,4 % $p = 0,029$), wobei sich beide Werte mit steigenden MTX-Konzentrationen weiter verringerten. In SJMM4-Zellen kam es unter 100 nM MTX bereits zu einer weniger starken, aber signifikanten Reduktion der Gesamtzellzahl auf 44 % ($p = 0,042$), die sich unter 1 μ M MTX weiter auf 3,2 % ($p < 0,001$) reduzierte. Die Zahl der proliferierenden Zellen sank ab 1 μ M MTX signifikant auf 6,7 % ($p < 0,001$) verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

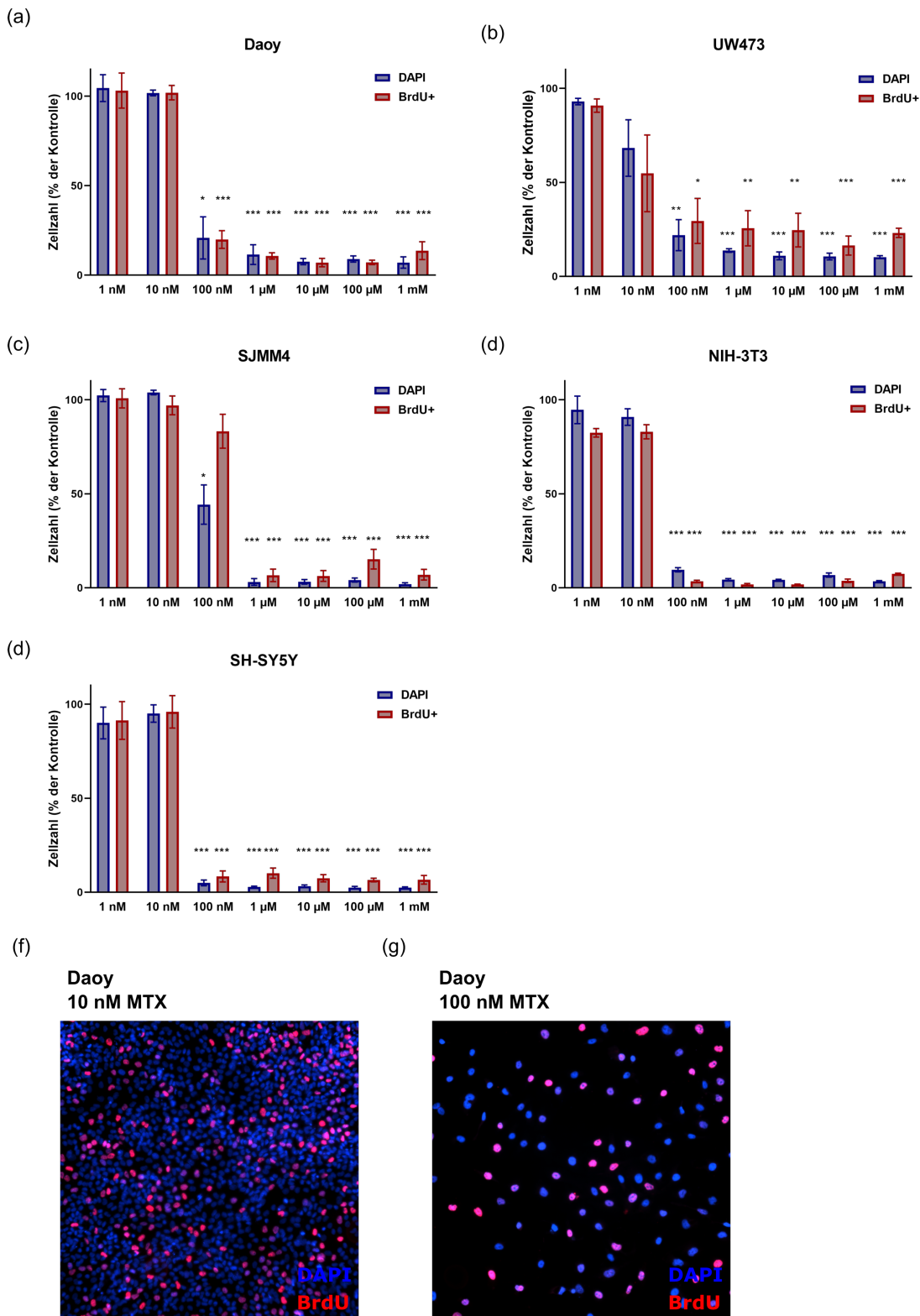


Abbildung 13: Proliferation von etablierten permanenten Zelllinien unter MTX-Behandlung.

(a-e) Unter MTX-Behandlung reduzierte sich in Daoy-, UW473, SJMM4-, NIH-3T3- und SH-SY5Y-Zellen sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Anzahl der proliferierenden Zellen (BrdU⁺) ab einer MTX-Konzentration von 100 nM respektive 1 μM (SJMM4) signifikant. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Konzentrationen an MTX dargestellt. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$. (f-g) Dargestellt ist die Proliferation von Daoy-Zellen unter 10 nM MTX und 100 nM MTX. Blau gefärbte Zellkerne = DAPI, rot gefärbte Zellkerne = BrdU⁺.

3.4 Kontrollexperimente mit LDE225

3.4.1 Effekt der LDE225-Behandlung auf murine Körnerzellvorläufer

Die potenzielle Veränderung einer SHH-Signalwegaktivität sollte in murinen Körnerzellvorläufern mittels des direkten SHH-Signalweginhibitors LDE225 untersucht werden. Die primären Zellen wurden für 144 Stunden mit LDE225 behandelt und anschließend Viabilitätsmessungen unterzogen, die auf dem ATP-abhängigen Metabolismus der Zellen basieren (Abbildung 14). Bei einer Dosis von 1 μM war die Reduktion der Viabilität auf einen Wert von 66,6 % im Vergleich zu unbehandelten Körnerzellvorläufern signifikant ($p=0,025$). Unter weiterer Konzentrationserhöhung auf 10 μM LDE225 fiel der ATP-abhängige Metabolismus auf unter 30 % ($p=0,0012$). Dies deutet darauf hin, dass die SHH-Signalwegaktivität in Körnerzellvorläufern durch LDE225 deutlich gesenkt werden kann.

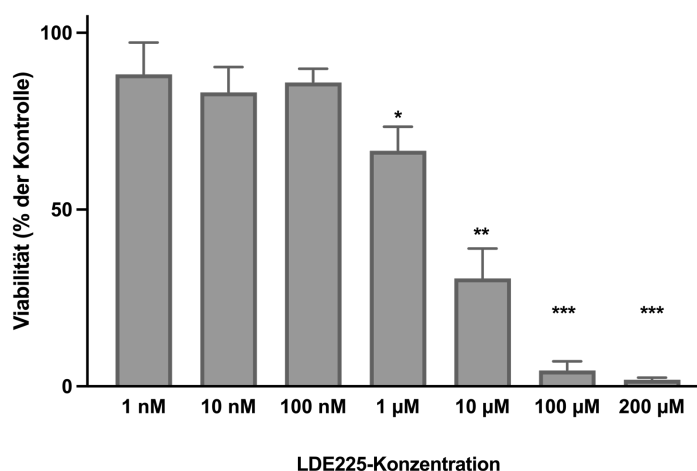


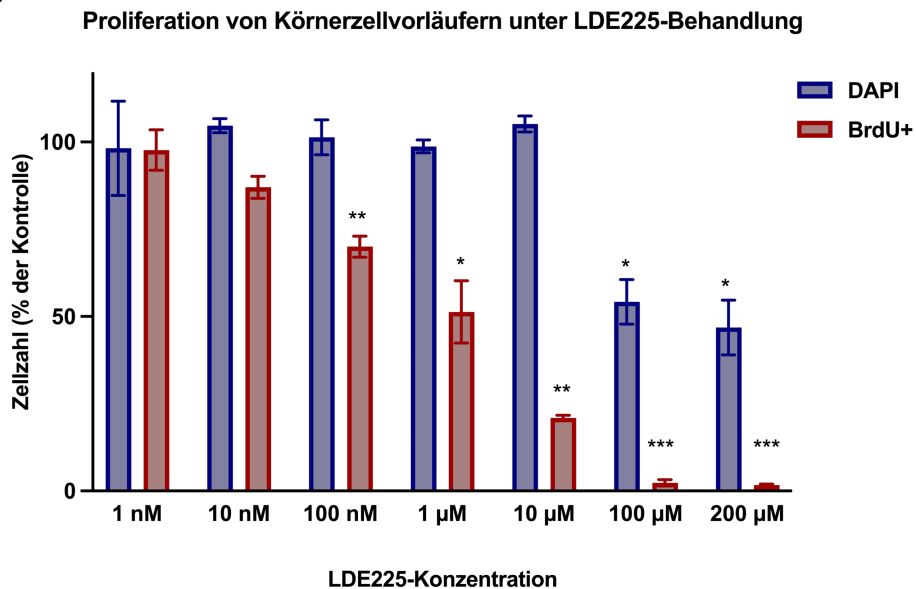
Abbildung 14: Viabilität von Körnerzellvorläufern unter LDE-Behandlung.

Körnerzellvorläufer, in denen der SHH-Signalweg aktiv ist, reagierten ab einer Konzentration von 1 μM signifikant auf den direkten Signalweginhibitor LDE225 mit einer Reduktion der Viabilität auf 66 %. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$.

Der Effekt von LDE225 auf die Proliferation von Körnerzellvorläufern ist in Abbildung 15 dargestellt. Mit Erhöhung der LDE225-Konzentration sank die Anzahl der proliferierenden Zellen (BrdU^+) in einer Population von Körnerzellvorläufern. Bei einer Konzentration von 100 nM entsprach die Anzahl der proliferierenden Zellen 70,1 % ($p=0,004$) der Werte der unbehandelten Kontrolle. Je höher die LDE225-Dosis, desto weiter reduzierte sich die Proliferation; unter 10 μM LDE225 lag diese bei 20,9 % ($p<0,001$). Der IC_{50} -Wert

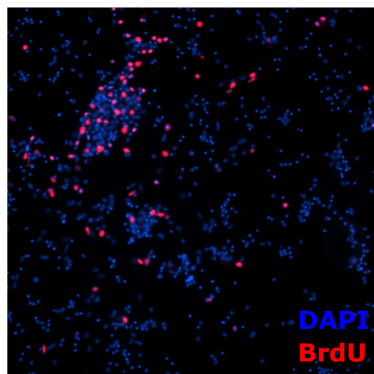
betrug 2,5 μM . Die Gesamtzellzahl (DAPI) nahm unter LDE225-Behandlung weniger stark ab. Bei Konzentrationen von 100 μM und 200 μM war diese signifikant auf 54,2 % ($p=0,014$) und 46,8 % ($p=0,017$) reduziert. Durch eine stärkere Abnahme der BrdU⁺-Zellen im Verhältnis zu den DAPI gefärbten Zellen verringert sich auch die Proliferationsrate (Abbildung 15b-c).

(a)



(b)

Kontrolle (DMSO)



(c)

1 μM LDE225

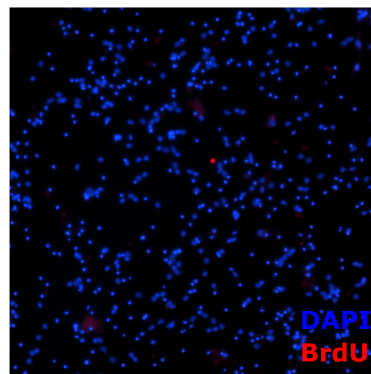


Abbildung 15: Proliferation von Körnerzellvorläufern unter LDE225-Behandlung.

(a) Eine Behandlung von Körnerzellvorläufern mit LDE225 reduzierte signifikant die Gesamtzellzahl (DAPI) bzw. die Anzahl der proliferierenden Zellen (BrdU⁺) ab einer LDE225-Konzentration von 1 μM respektive 100 μM . * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$. (b-c) Dargestellt ist die Proliferation von Körnerzellvorläufern unter 1 μM LDE und der entsprechenden DMSO-Kontrolle. Blau gefärbte Zellkerne = DAPI, rot gefärbte Zellkerne = BrdU⁺.

3.4.2 Effekt der LDE225-Behandlung auf primäre murine Medulloblastomzellen

In primären murinen Medulloblastomzellen des Genotyps *Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*, die sich durch eine Überaktivierung des SHH-Signalwegs auszeichnen, sollte der Einfluss auf dessen Aktivität durch den direkten Signalweginhibitor LDE225 untersucht werden. Die Medulloblastomzellen wurden über einen Zeitraum von 144 Stunden mit LDE225 in Konzentrationen zwischen 1 nM und 200 µM behandelt (Abbildung 16). Erwartungsgemäß zeigten diese im anschließenden Viabilitätsassay eine signifikante Reaktion: Die Viabilität war ab einer LDE225-Konzentration von 100 nM signifikant auf 75,5 % reduziert ($p=0,019$), sank mit steigender Konzentration weiter und war unter 10 µM LDE225 um etwa 73 % niedriger als in den unbehandelten Kontrollen ($p<0,001$). Bei weiterer Erhöhung der LDE225-Konzentration auf 100 µM reduzierte sich der ATP-abhängige Metabolismus auf 4,6 %. Der IC_{50} -Wert betrug in diesen Experimenten 1,5 µM.

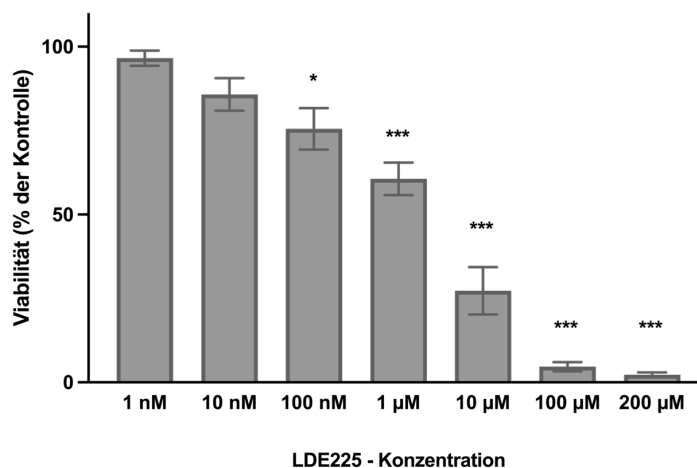


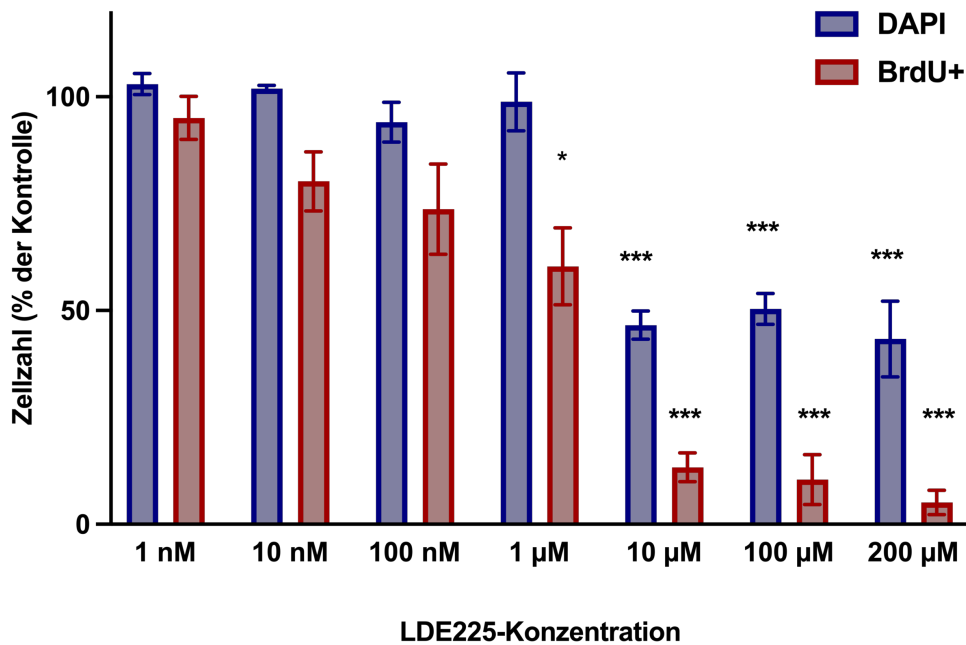
Abbildung 16: Viabilität von primären murinen Medulloblastomzellen unter LDE225-Behandlung.

In primären Medulloblastomzellen, in denen der SHH-Signalweg überaktiviert ist, nahm die Viabilität unter Behandlung mit dem direkten Signalweginhibitor LDE225 signifikant ab einer Konzentration von 100 nM ab. * $p \leq 0,05$ *** $p \leq 0,001$.

Die Behandlung mit LDE225 zeigte ebenfalls signifikante Einflüsse auf die Gesamtzellzahl und die Proliferation in einer Population von Medulloblastomzellen (Abbildung 17a). Ab einer LDE225-Konzentration von 10 µM kam es zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtzellzahl (DAPI) um 53 % ($p<0,001$). Noch deutlicher ausgeprägt war die Abnahme der proliferierenden Zellen (BrdU⁺) um 86 % ($p<0,001$) im Vergleich zu den

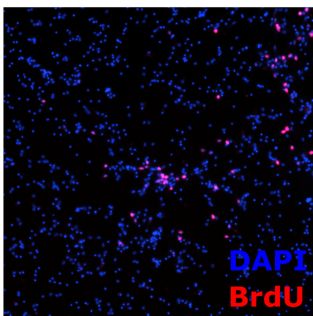
unbehandelten Medulloblastomzellen. Der IC_{50} -Wert betrug in diesem Fall $1,4 \mu\text{M}$. Durch einen stärkeren Verlust der BrdU^+ Zellen im Verhältnis zu den DAPI gefärbten Zellen reduziert sich die Proliferationsrate im Rahmen der LDE225-Behandlung, was in Abbildung 17(b-d) ersichtlich ist.

(a)



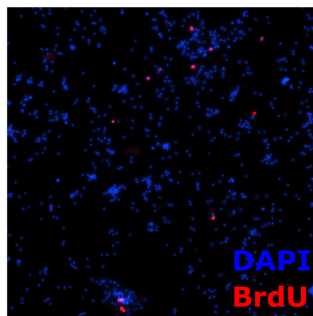
(b)

Kontrolle (DMSO)



(c)

1 µM LDE



(d)

10 µM LDE

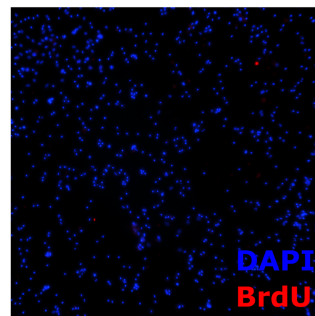


Abbildung 17: Proliferation von primären murinen Medulloblastomzellen unter LDE225-Behandlung.

(a) Eine Behandlung von primären Medulloblastomzellen mit LDE225 reduzierte ab einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ signifikant die Anzahl der proliferierenden Zellen (BrdU^+) sowie ab $10 \mu\text{M}$ die Gesamtzellzahl (DAPI). * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ (b-d) Dargestellt ist die Proliferation von Körnerzellvorläufern unter der DMSO-Kontrolle, $1 \mu\text{M}$ LDE225 und $10 \mu\text{M}$ LDE225. Blau gefärbte Zellkerne = DAPI, rot gefärbte Zellkerne = BrdU^+ .

3.4.3 Effekt der LDE225-Behandlung auf etablierte permanente Zelllinien

Um den Einfluss von LDE225 auf Zellen zu untersuchen, in denen der SHH-Signalweg im Gegensatz zu den zuvor betrachteten primären Zellen nicht konstitutiv überaktiv ist, wurden die Viabilitäts- und Proliferationsexperimente analog an weiteren Zelllinien durchgeführt. Bei Behandlung der permanenten Medulloblastomlinien Daoy, UW473 und SJMM4, der Neuroblastomlinie SH-SY5Y sowie der Fibroblastenlinie NIH-3T3 mit dem direkten Signalweginhibitor LDE225 änderte sich die Viabilität bis zu einer Konzentration von 10 µM jeweils nicht signifikant. Bei weiterer Konzentrationserhöhung auf 100 µM bzw. 200 µM reduzierte sich die Viabilität in allen Zelllinien signifikant auf 0,5 - 3 % ($p < 0,001$).

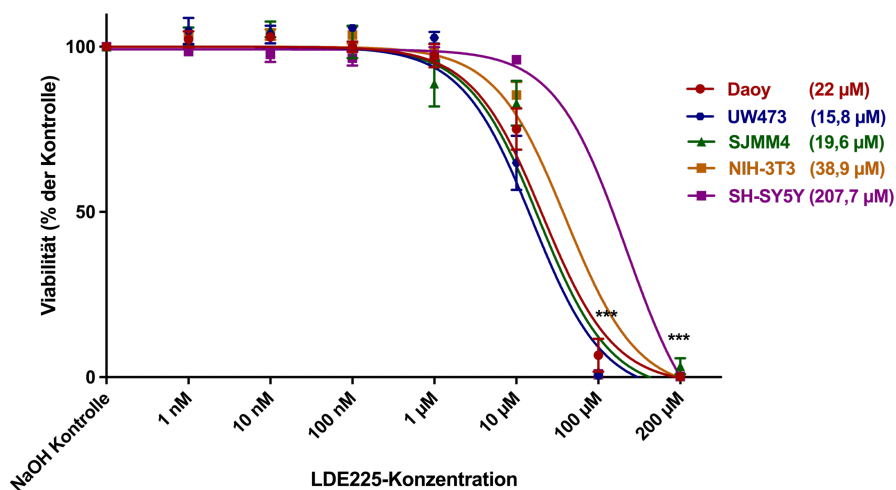


Abbildung 18: Viabilität von etablierten permanenten Zelllinien unter LDE225-Behandlung.

Die Zellviabilität unter LDE225-Behandlung ist bei Daoy-, UW473, SJMM4-, NIH-3T3- und SH-SY5Y-Zellen bis zu einer Konzentration von 10 µM unverändert und sinkt signifikant ab einer LDE225-Konzentration von 100 µM. IC₅₀-Werte in Klammern. *** $p \leq 0,001$.

Die Zelllinien wurden weiterhin einer BrdU-Immunfärbung unterzogen und hinsichtlich ihrer Proliferation untersucht, woraufhin die Linien unterschiedliche Reaktionen zeigten (Abbildung 19). In Daoy-Zellen sank nach 144-stündiger LDE225-Behandlung die Gesamtzellzahl ab einer Konzentration von 10 µM signifikant auf 54,9 % ($p=0,043$) und die Zahl der proliferierenden Zellen unter 10 µM auf 26,6 % ($p=0,004$) im Verhältnis zu unbehandelten Zellen. UW473-Zellen reagierten bei einer LDE225-Dosis von 10 µM ebenfalls mit einer signifikanten Reduktion der Zellzahl (6 %, $p=0,005$) und der BrdU⁺ Zellen

(29,4 %, $p=0,029$). In SJMM4-Zellen kam es unter 1 μM LDE225 bereits zu einer Reduktion der proliferierenden Zellen auf 60,2 % ($p=0,018$), die sich unter 100 μM weiter auf 28,7 % ($p<0,001$) reduzierte. Die Gesamtzellzahl sank erst ab 100 μM LDE225 signifikant auf 11,3 % ($p<0,001$). In NIH-3T3- und SH-SY5Y-Zellen kam es im Konzentrationsbereich bis 10 μM zu keiner signifikanten Veränderung der Zahl der DAPI sowie BrdU⁺ gefärbten Zellen. Erst ab 100 μM LDE225 reagierten diese mit einer Abnahme der Gesamtzellzahl auf 2,7 % ($p<0,001$) respektive 4,0 % ($p<0,001$). Die proliferierenden Zellen reduzierten sich auf 2,7 % ($p<0,001$) bei den NIH-3T3-Zellen und 7,6 % im Falle der SH-SY5Y-Zellen ($p<0,001$).

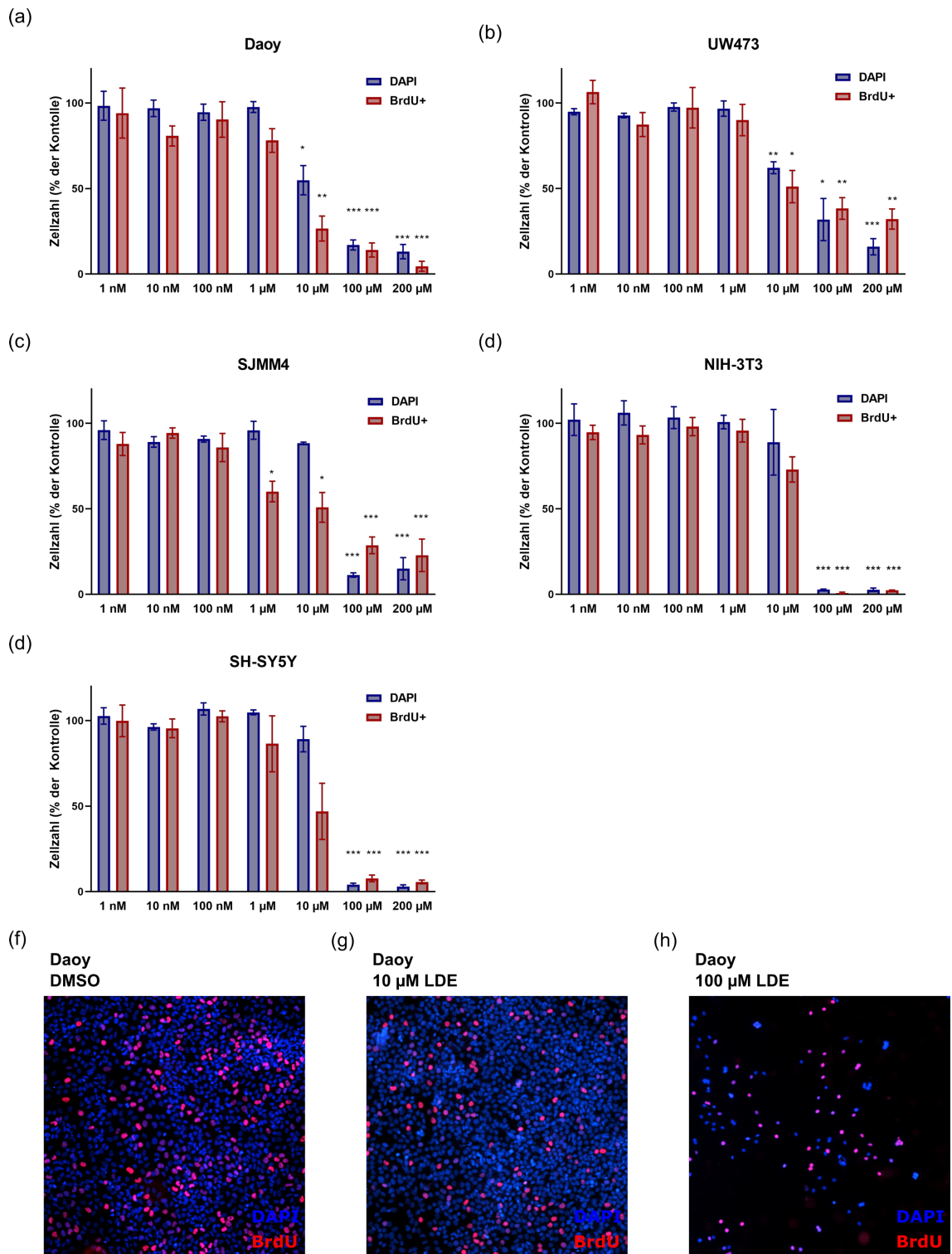


Abbildung 19: Proliferation von etablierten permanenten Zelllinien unter LDE225-Behandlung.

(a-e) Unter LDE225-Behandlung reduzierte sich in den Medulloblastomzelllinien Daoy, UW473 und SJMM4 die Proliferation in niedrigeren Konzentrationsbereichen als in den Zelllinien NIH-3T3 und SH-SY5Y. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$. (f-h) Dargestellt ist die Proliferation von Daoy-Zellen unter DMSO-Kontrolle, 10 μM LDE und 100 μM LDE. Blau gefärbte Zellkerne = DAPI, rot gefärbte Zellkerne = BrdU⁺.

3.5 Kontrollexperimente mit Vincristin

3.5.1 Effekt der Vincristin-Behandlung auf primäre murine Körnerzellvorläufer

Nachdem die primären murinen Körnerzellvorläufer in den MTX-Experimenten kein signifikantes Ansprechen zeigten, wurde der Einfluss eines weiteren Zytostatikums untersucht. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 144 Stunden mit Vincristin behandelt (Abbildung 20). Im Viabilitätsassay war ersichtlich, dass sich der ATP-abhängige Metabolismus der Zellen bereits unter einer Konzentration von 10 nM um 50 % ($p=0,025$) im Gegensatz zu unbehandelten Zellen reduzierte. Im Konzentrationsbereich von 100 nM bis 10 μ M lagen die Werte bei 18 - 20 % ($p<0,001$) und verringerten sich bei weiterer Konzentrationserhöhung auf 0,5 - 2 % ($p<0,001$).

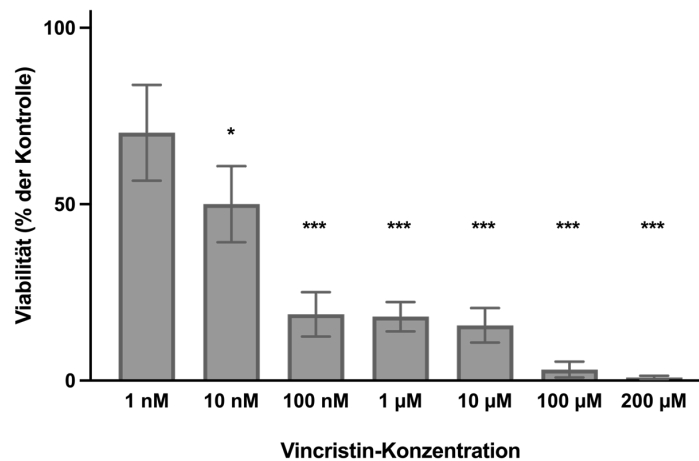


Abbildung 20: Viabilität von primären murinen Körnerzellvorläufern unter Vincristin-Behandlung.

Unter Behandlung mit Vincristin verringerte sich in Körnerzellvorläufern bereits ab einer Konzentration von 10 nM die Zellviabilität signifikant. * $p \leq 0,05$ *** $p \leq 0,001$.

3.5.2 Effekt der Vincristin-Behandlung auf primäre murine Medulloblastomzellen

Weiterhin wurden primäre Medulloblastomzellen des Genotyps *Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}* über einen Zeitraum von 144 Stunden mit Vincristin behandelt und anschließend einem Viabilitätsassay unterzogen (Abbildung 21). Unter 10 nM Vincristin verringert sich die Viabilität der Zellen bereits um 95 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ($p < 0,001$). Bei weiterer Konzentrationserhöhung bis 100 μM Vincristin stagnierten die Werte bei 2 - 5 %.

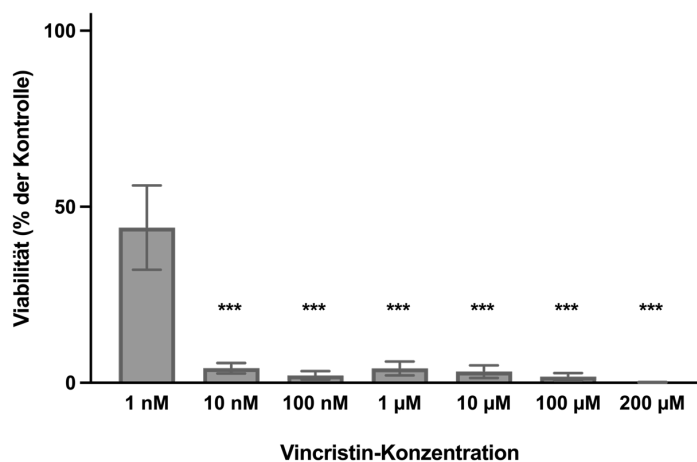


Abbildung 21: Viabilität von primären murinen Medulloblastomzellen unter Vincristin-Behandlung.

Unter Behandlung mit Vincristin verringerte sich in primären Medulloblastomzellen bereits ab einer Konzentration von 10 nM die Zellviabilität signifikant auf 5,1 %. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$.

3.4.3 Effekt der Vincristin-Behandlung auf etablierte permanente Zelllinien

Die Behandlung der Zelllinien Daoy, UW473, SJMM4, NIH-3T3 und SH-SY5Y führt zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität aller Zelllinien ab einer Vincristin-Konzentration von 10 nM ($p < 0,001$). Die IC_{50} -Werte der Daoy-, UW473-, NIH-3T3 und SH-SY5Y-Zellen lagen hierbei in einem Bereich von 1,0 - 4,1 nM. SJMM4-Zellen zeigten ab einer Vincristin-Konzentration von 1 μM eine signifikante Reduktion ihrer Viabilität ($p < 0,001$), der IC_{50} -Wert betrug in dieser Zelllinie 562 nM.

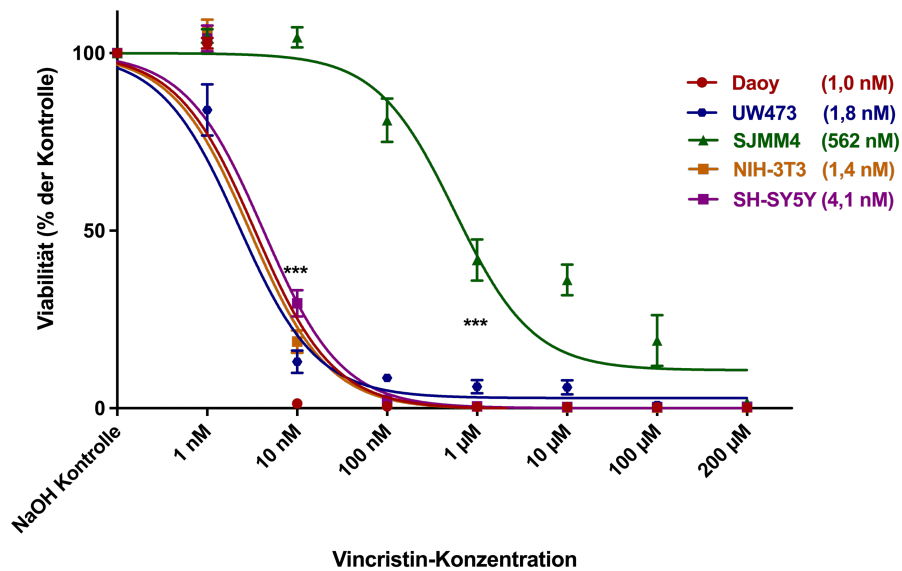


Abbildung 22: Viabilität von etablierten permanenten Zelllinien unter Vincristin-Behandlung.

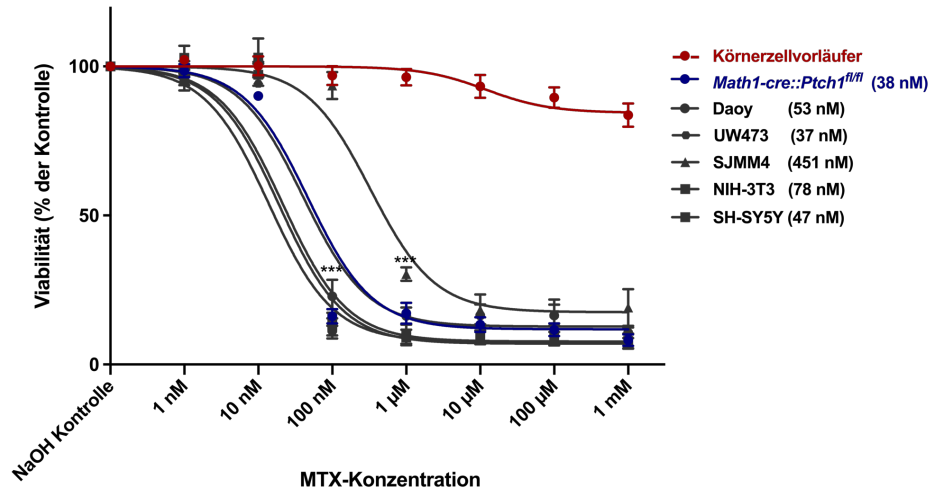
Die Zellviabilität unter Vincristin-Behandlung sank bei Daoy-, UW473, NIH-3T3- und SH-SY5Y-Zellen ab einer Konzentration von 10 nM, und bei SJMM4-Zellen ab einer Vincristin-Konzentration von 1 µM signifikant. IC₅₀-Werte in Klammern. *** $p \leq 0,001$.

3.6 Zusammenfassende Analysen

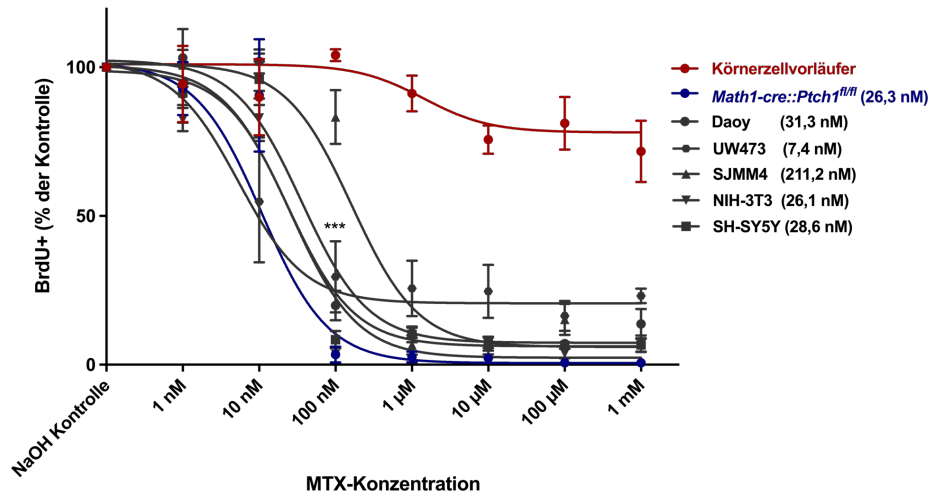
Primäre murine Körnerzellvorläufer, primäre murine Medulloblastomzellen (*Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*) und die Zelllinien Daoy, UW473, SJMM4, NIH-3T3 und SH-SY5Y wurden auf ihre Reaktion auf die MTX-Behandlung untersucht. Generell besteht eine Differenz zwischen dem Verhalten der Körnerzellvorläufer und dem der anderen untersuchten Zellen (Abbildung 23): Die Viabilität der Körnerzellvorläufer unterschied sich ab einer MTX-Konzentration von 100 nM signifikant von der der primären Medulloblastomzellen sowie der Zelllinien Daoy, UW473 und NIH-3T3. Ab einer MTX-Konzentration von 1 µM bestand außerdem eine signifikante Differenz zu den SJMM4-Zellen. Somit kann an dieser Stelle von einer signifikant niedrigeren Sensibilität der Körnerzellvorläufer für MTX gesprochen werden.

Wird die Proliferation der getesteten Zelltypen unter MTX-Behandlung gegenübergestellt, ergeben sich Analogien zu den Viabilitätsexperimenten. Unter einer MTX-Konzentration von 100 nM war das Verhältnis der Proliferation der behandelten zu unbehandelten Zellen für die Körnerzellvorläufer signifikant höher als im Falle der primären Medulloblastomzellen (*Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*) und der Zelllinien Daoy, UW473, NIH-3T3 und SH-SY5Y. Von den SJMM4-Zellen wich die Proliferation der Körnerzellvorläufer ab einer Konzentration von 1 µM MTX signifikant ab. Unter steigender MTX-Konzentration stagnierte die Zahl der BrdU⁺ Zellen bei den primären Medulloblastomzellen und permanenten Zelllinien auf einem ähnlich niedrigen Level bzw. war nicht mehr detektierbar. Die Proliferation der Körnerzellen hingegen sank noch leicht, unterschied sich aber auch unter der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 mM noch signifikant von allen anderen getesteten Zellen. Zusammenfassend zeigten sich sowohl bezüglich der Viabilität als auch der Proliferation signifikante Unterschiede zwischen den Körnerzellvorläufern und allen anderen getesteten Zellen. Die primären Medulloblastomzellen des Genotyps *Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}* hingegen wiesen ähnliche Reaktionen wie die permanenten Zelllinien auf.

(a)



(b)



(c)

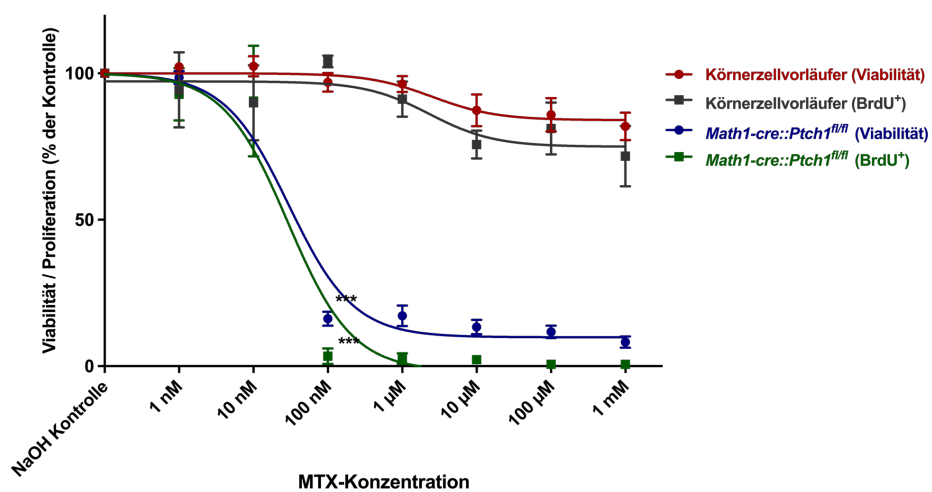


Abbildung 23: Vergleich der verschiedenen Reaktionen auf MTX-Behandlung.

(Legende auf der folgenden Seite)

(a) Eine MTX-Behandlung von 144 Stunden bewirkte nur einen geringen Einfluss auf die Viabilität von primären Körnerzellvorläufern, während diese bei primären Medulloblastomzellen (*Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*) sowie etablierten permanenten Zelllinien signifikant abnahm. *** $p \leq 0,001$. IC₅₀-Werte in Klammern. (b) Eine MTX-Behandlung bewirkte keinen Einfluss auf die Proliferation (BrdU⁺ Zellen) von primären Körnerzellvorläufern, während diese bei primären Medulloblastomzellen sowie etablierten permanenten Zelllinien signifikant abnahm. *** $p \leq 0,001$. IC₅₀-Werte in Klammern. (c) Eine MTX-Behandlung reduzierte sowohl die Viabilität als auch die Proliferation von primären Medulloblastomzellen signifikant ab einer Konzentration von 100 nM, während diese auf primäre Körnerzellvorläufer keinen Einfluss hatte. *** $p \leq 0,001$.

In den Viabilitätsexperimenten unter Einsatz von MTX war zu beobachten, dass die Expositionsdauer unterschiedliche Auswirkungen auf die primären Zellen hatte. Die Körnerzellvorläufer zeigten nach 72 Stunden und 144 Stunden Behandlung ein vergleichbares Verhalten. Die Viabilität reduzierte sich erst unter hohen MTX-Konzentrationen, und selbst dort nur marginal. Auch bei den Medulloblastomzellen (*Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*) war nach 72 Stunden noch keine signifikante Reduktion der Viabilität vorhanden. Zu diesem Messzeitpunkt waren für keine der eingesetzten Konzentrationen signifikante Unterschiede zu den Körnerzellvorläufern ersichtlich. Nach 144 Stunden MTX-Behandlung hingegen kam es zu einer Abnahme der Viabilität auf 26 %. Im Konzentrationsbereich von 100 nM - 1 mM MTX zeigte sich die Viabilität signifikant verändert gegenüber den Körnerzellvorläufern sowie den Medulloblastomzellen, die über einen Zeitraum von 72 Stunden behandelt wurden ($p < 0,001$).

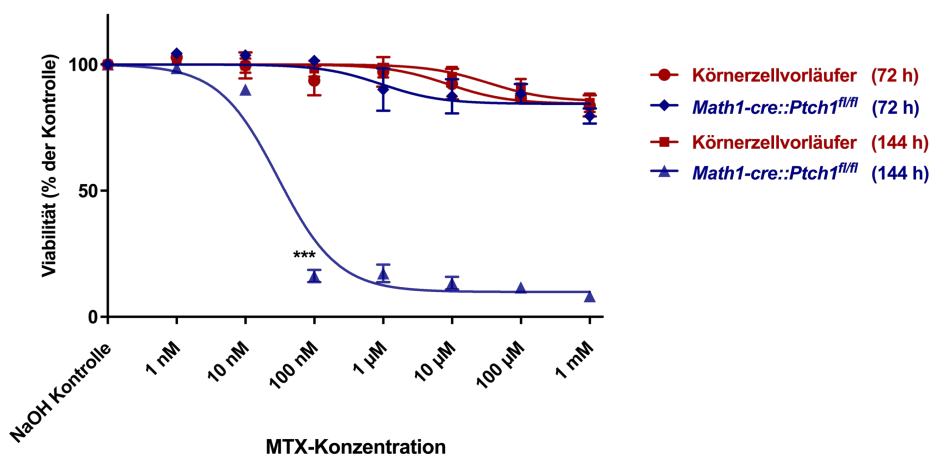


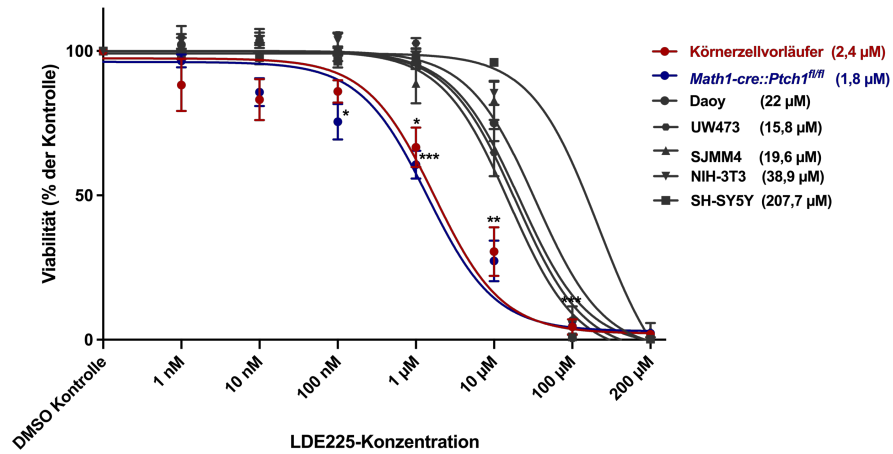
Abbildung 24: Einfluss der Expositionsdauer von MTX.

Die Exposition von MTX führte bei primären Medulloblastomzellen (*Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*) nach 144 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität ab einer Konzentration von 100 nM, während nach 72 Stunden Behandlung noch kein Effekt auftritt. In primären Körnerzellvorläufern zeigte die MTX-Behandlung sowohl nach 72 Stunden als auch nach 144 Stunden Behandlung keinen Einfluss auf die Viabilität. h = Stunden. *** $p \leq 0,001$.

Unter Einfluss des SHH-Signalweginhibitors LDE225 reagierten die Körnerzellvorläufer und die Medulloblastomzellen sensibler in der Reduktion ihrer Viabilität als die restlichen getesteten Zelllinien (Abbildung 25a). Bei einer LDE225-Konzentration von 100 nM war für die Medulloblastomzellen ein signifikanter Unterschied gegenüber allen Zelllinien gegeben ($p < 0,001$) und für die Körnerzellvorläufer gegenüber den UW473-, SJMM4- und NIH-3T3 Zellen ($p = 0,0085$, $p = 0,0311$, $p = 0,011$). Unter 1 μM LDE225 unterschieden sich die Körnerzellvorläufer ebenfalls signifikant von den Daoy- ($p = 0,0109$) und SJMM4-Zellen ($p = 0,0425$). Die IC_{50} -Werte lagen für Körnerzellvorläufer und Medulloblastomzellen bei 2,4 μM und 1,8 μM und bei den permanenten Zelllinien zwischen 15,8 μM und 207,7 μM . Unter den Zelllinien wiesen die Medulloblastomlinien UW473, SJMM4 und Daoy die geringsten IC_{50} -Werte auf.

In den Immunfärbungen der Zellen nach LDE225-Behandlung zeigten die Körnerzellvorläufer und Medulloblastomzellen eine signifikant stärkere Reduktion der Proliferation als die Zelllinien mit Ausnahme der SJMM4-Zellen (Abbildung 25b). Letztere lagen mit einem IC_{50} -Wert von 1,5 μM in einem ähnlichen Bereich wie die primären Zellen mit 1,8 μM (Körnerzellvorläufer) und 1,2 μM (*Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*). Insgesamt zeigten die primären Zellen mit einer starken SHH-Signalwegaktivität eine höhere Sensibilität für LDE225 als die permanenten Zelllinien.

(a)



(b)

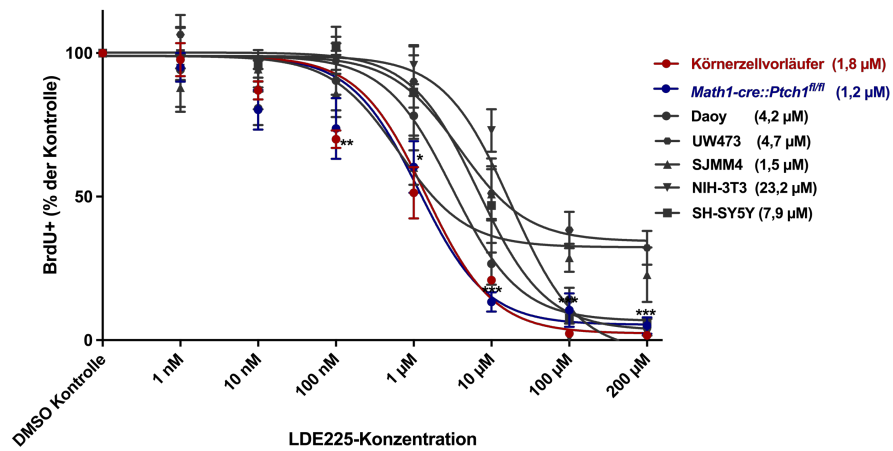


Abbildung 25: Körnerzellvorläufer und Medulloblastomzellen sind sensibel gegenüber LDE225.

(a) Primäre Körnerzellvorläufer sowie primäre Medulloblastomzellen (*Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*) reagierten bezogen auf die Viabilität signifikant sensibler auf eine LDE225-Behandlung als etablierte permanente Zelllinien. (b) Primäre Körnerzellvorläufer sowie primäre Medulloblastomzellen (*Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*) reagierten bezogen auf die Proliferation signifikant sensibler auf eine LDE225-Behandlung als etablierte permanente Zelllinien mit Ausnahme der SJMM4-Zellen. IC₅₀-Werte in Klammern. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$.

In Abbildung 26 ist der Einfluss von Vincristin auf die Viabilität vergleichend dargestellt. Unter steigender Vincristin-Konzentration reduzierte sich in allen untersuchten Zelllinien die Viabilität. Die IC₅₀-Werte der primären Medulloblastomzellen (*Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*) und der Zelllinien Daoy, UW473, SH-SY5Y sowie NIH-3T3 betragen 0,9 - 4,1 nM. Körnerzellvorläufer waren ebenfalls in geringen Konzentrationsbereichen sensibel für Vincristin mit einem IC₅₀-Wert von 15,9 nM. Von den zuvor genannten Zelllinien unterschieden diese sich darin, dass die Viabilität erst bei Konzentrationen ab 100 µM gegen Null konvergierte. In SJMM4-Zellen nahm die Viabilität erst unter höheren Konzentrationen ab, wodurch diese sich im Konzentrationsbereich von 10 nM - 10 µM signifikant von den primären Zellen und Zelllinien unterschieden (p<0,001). Ihr IC₅₀-Wert betrug 562 nM.

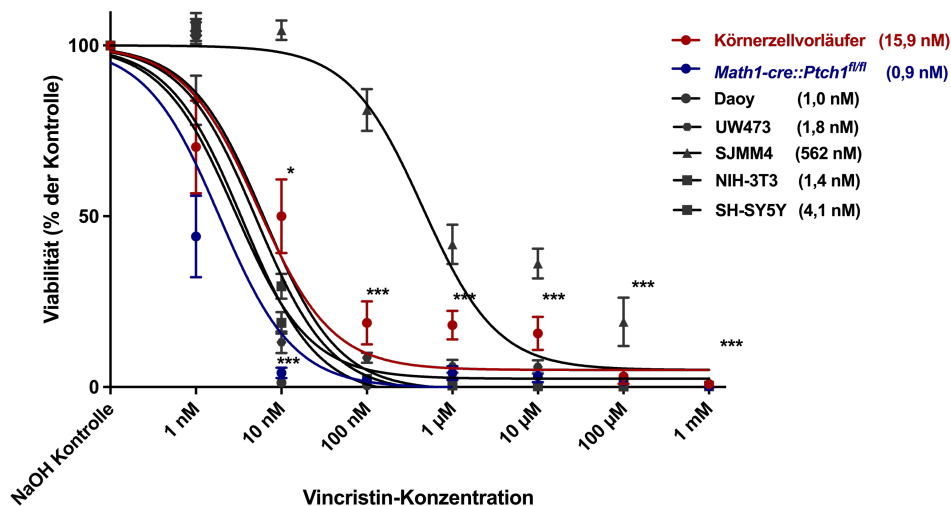


Abbildung 26: Vincristin reduziert die Viabilität von primären Zellen und Zelllinien.

Unter 72-stündiger Behandlung mit Vincristin verringerte sich in primären Körnerzellvorläufern und primären Medulloblastomzellen (*Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*) bereits ab einer Konzentration von 10 nM die Zellviabilität signifikant. In etablierten primären Zelllinien zeigte sich dieser Effekt ebenfalls ab 10 nM, wobei die SJMM4-Zellen mit signifikanten Ergebnissen ab 1 µM eine Ausnahme darstellten. IC₅₀-Werte in Klammern. *** p ≤ 0,001.

4. DISKUSSION

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Behandlung mit den Substanzen MTX, LDE225 und Vincristin je nach untersuchtem Zelltyp unterschiedliche Reaktionen bewirkt. Zentral war die Beobachtung, dass die primären Medulloblastomzellen des Genotyps *Math1-cre::Ptch1^{f/f}* ein sehr gutes Ansprechen auf MTX und Vincristin gezeigt haben, während die Wildtyp-Körnerzellvorläufer hinsichtlich Viabilität und Proliferation kaum oder keineswegs reagibel für MTX waren. Im Gegensatz dazu konnte bereits unter geringen Konzentrationen von Vincristin auch in den Körnerzellvorläufern eine Reduktion der Viabilität erreicht werden. In allen fünf getesteten permanenten Zelllinien reduzierte MTX grundlegende zelluläre Funktionen wie den Metabolismus und die Proliferation. In Daoy-Zellen ähneln die berechneten IC₅₀-Werte von 53 nM den Ergebnissen früherer Studien, die für die gleiche Zelllinie IC₅₀-Werte zwischen 70 und 95 nM ermittelten (Najim et al. 2009, Neradil et al. 2015).

Die beiden primären murinen Zelltypen wurden in dieser Arbeit eingesetzt, da diese jeweils eine Überaktivierung des SHH-Signalwegs aufweisen: In Körnerzellvorläufern, die nach ihrer Isolation mit SHH-Protein stimuliert werden, sind Gene des SHH-Signalwegs vermehrt exprimiert und die Proliferationsrate ist erhöht (Wechsler-Reya and Scott 1999). Die primären Medulloblastomzellen besitzen durch den homozygoten Knockout von *Ptch1* eine Überaktivierung des SHH-Signalwegs und weisen eine erhöhte Expression von Hedgehog-Zielgenen auf (Yang et al. 2008). Sowohl die Körnerzellvorläufer als auch die primären Medulloblastomzellen reagierten in dieser Arbeit sensibler auf den SHH-Signalweginhibitor LDE225 als die permanenten Zelllinien, was eine erhöhte SHH-Signalwegaktivität in diesen Zellen bestätigt. Die erhaltenen IC₅₀-Werte ähneln dabei vorherigen Beobachtungen, bei denen eine LDE225-Konzentration von 1 µM in Tumorzellen aus *Math1-cre::Ptch^{+/-}*-Mäusen die Viabilität auf unter 50 % reduzierte (Pak et al. 2019). Die weiteren getesteten Zelllinien dienen als Negativkontrolle, da diese keine erhöhte Aktivität des SHH-Signalwegs besitzen. Eine Ausnahme stellen die SJMM4-Zellen dar: Aufgrund ihres Ursprungs in Mausmodellen mit heterozygotem *Ptch*-Knockout wäre eine verbleibende SHH-Aktivität in Betracht zu ziehen. Die Ergebnisse der LDE225-Experimente geben

hierauf keine eindeutige Antwort. Obwohl die Proliferationsrate der SJMM4-Zellen in einem vergleichbaren Maß wie die der primären Zellen reduziert war, lagen die Werte für die Viabilität im Bereich der permanenten Zelllinien. Eine Überaktivität des SHH-Signalwegs ist in dieser Zelllinie daher fraglich und müsste ggf. weiter untersucht werden. Weiterhin wurde auch an anderer Stelle beschrieben, dass Medulloblastomzelllinien nach längerer Kultivierung ihre SHH-Aktivität verlieren (Sasai et al. 2006).

Im Folgenden wird erörtert, wie die Ergebnisse im klinischen Kontext zu interpretieren sind und welche klinische Relevanz MTX besitzt. Außerdem werden mögliche Erklärungsansätze für die Wirkweise von MTX auf Medulloblastome, insbesondere im Zusammenhang mit dem SHH-Signalweg, diskutiert. Die Diskrepanz zwischen der Reaktion der Körnerzellvorläufer auf der einen Seite und der Medulloblastomzellen und Zelllinien auf der anderen Seite soll ebenfalls Gegenstand dieser Diskussion sein. Die erhaltenen Ergebnisse legen zudem nahe, dass die Expositionsdauer mit MTX das Ansprechen von Medulloblastomzellen beeinflusst. Dies wirft die Frage auf, inwiefern diese Beobachtung auf künftige Studien und die praktische Anwendung in der klinischen Umgebung übertragbar ist.

4.1 Überlebensvorteil bei SHH-Medulloblastomen durch MTX

Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt vor dem Hintergrund der klinischen Studienlage bei Medulloblastomen im Kleinkindalter, die zur Einordnung an dieser Stelle kurz zusammengefasst ist.

In Deutschland und Österreich wurde im Zuge der „HIT-SKK87“-Studie begonnen, bei Kindern mit neu diagnostizierten malignen Hirntumoren in spezialisierten Zentren MTX intraventrikulär zu applizieren (Rutkowski et al. 2005). In den zuletzt veröffentlichten Ergebnissen der „HIT-2000“-Kohorte konnte unter der Therapie mit intraventrikulärem MTX in Kindern mit SHH-Medulloblastomen ein progressionsfreies 5-Jahres-Überleben von 93 % erzielt werden (Mynarek et al. 2020b). Die Relevanz der intraventrikulären MTX-Anwendung verdeutlichen zwei weitere Studien: Lafay-Cousin et al. behandelten junge Patienten nach dem „HIT-SKK2000“-Protokoll, jedoch ohne Verwendung von intraventrikulär appliziertem MTX. Diese Studie wurde wegen eines

progressionsfreien Überlebens von lediglich 52 % nach zwei Jahren vorzeitig abgebrochen (Lafay-Cousin et al. 2020). In der Studie SJYC07 am St. Jude Children's Research Hospital wurden unter alleiniger Verwendung von konventioneller Chemotherapie ebenfalls keine zufriedenstellenden Ergebnisse erreicht. Das progressionsfreie 5-Jahres-Überleben lag für die SHH-Subgruppe bei 51,1 % (Robinson et al. 2018). Ein besseres Resultat wurde in der jüngsten „Head Start“ III-Studie unter Anwendung von Hochdosis-Chemotherapie in Kombination mit autologer Stammzelltransplantation beobachtet: Hier lag das progressionsfreie 5-Jahres-Überleben mit 89 % in einem ähnlichen Bereich der Ergebnisse der „HIT-2000“-Studie (Dhall et al. 2020). Für eine erfolgreiche Therapie ist demnach laut aktuellem Forschungsstand ein intensivierter Einsatz von MTX unabdingbar; entweder via intraventrikulärer Applikation oder im Rahmen der Hochdosis-Chemotherapie.

4.2 Die Wirkung von MTX auf den SHH-Signalweg

Das außergewöhnlich gute klinische Ansprechen von SHH-Medulloblastomen auf die intraventrikuläre MTX-Therapie lässt einen Zusammenhang zwischen der Wirkweise von MTX und dem SHH-Signalweg vermuten. Der Einfluss von MTX auf den Signalweg wurde zuvor bereits in Basalzellkarzinomen untersucht, welche sich ebenfalls durch eine Überaktivierung des SHH-Signalwegs auszeichnen. Diese Studien konnten zeigen, dass eine MTX-Behandlung von Basalzellkarzinomzelllinien in analogen Konzentrationen sowohl die Viabilität der Zellen als auch die Genexpression von *Ptch1* und *Gli1* reduziert, was auf einen direkten Einfluss von MTX auf den SHH-Signalweg hindeutet (Olesen et al. 2017).

In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass auch murine SHH-Medulloblastome auf zellulärer Ebene positiv auf MTX ansprechen. Die Behandlung mit MTX bewirkte eine deutliche Reduktion von Viabilität und Proliferation. Eine zentrale Erkenntnis der Behandlungsversuche der zerebellären Körnerzellvorläufer war die Tatsache, dass diese im Gegensatz zu den primären Tumorzellen kaum auf MTX reagieren. Dies spricht zunächst gegen eine SHH-Beteiligung an der Wirkweise von MTX, da anzunehmen wäre, dass sowohl die stimulierten Wildtyp-Zellen als auch die primären Medulloblastomzellen eine Reaktion zeigen. In den Proliferationsexperimenten

dieser Arbeit fiel jedoch auf, dass die basale Proliferationsrate der Körnerzellvorläufer geringer ist als die der anderen untersuchten Zellen. Diese lag bei den Körnerzellvorläufern im Bereich von 2 - 12 %, während sie bei den primären Medulloblastomzellen 10 - 30 % betrug. Somit muss hinterfragt werden, inwiefern Körnerzellvorläufer ein geeignetes Modell für die Untersuchung des Einflusses von Chemotherapeutika sind. Diese Beobachtung könnte zumindest erklären, warum die Körnerzellvorläufer weniger empfindlich auf einen Antimetaboliten wie MTX reagieren. Wäre die niedrigere Proliferationsrate als primärer Grund für das Nichtansprechen auf MTX anzunehmen, müsste zu erwarten sein, dass Körnerzellvorläufer auf andere Chemotherapeutika, welche die Zellteilung inhibieren, ebenfalls nicht reagieren. Zumindest für die Substanz Vincristin konnte diese Annahme jedoch widerlegt werden (Abbildung 20).

In den Genexpressionsexperimenten zeigt sich wiederum ein Hinweis darauf, dass auch in Körnerzellvorläufern möglicherweise eine Affektion des SHH-Signalwegs besteht. Unter Behandlung mit 1 μ M MTX war die Expression des SHH-Zielgens *Gli1* signifikant erniedrigt. Dies könnte darauf hinweisen, dass Körnerzellvorläufer in dieser Arbeit aufgrund ihrer geringen Proliferationsrate möglicherweise weniger anfällig für die DHFR-vermittelten Effekte von MTX sind, aber dennoch eine Wirkung auf den SHH-Signalweg besteht. Es ist allerdings zu beachten, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen nicht ausreichend sind, um diese Hypothese umfassend bewerten zu können. Eine sinnvolle Erweiterung dieser Experimente wären globale RNA-Sequenzierungs-Analysen, die weitere Komponenten und Zielgene des SHH-Signalwegs wie *Ptch1* und *MYCN* sowie zusätzliche Konzentrationsbereiche von MTX enthalten.

Die vorliegende Diskrepanz in der Sensibilität für MTX wurde zuvor von Sramek et al. auf bemerkenswert ähnliche Weise beobachtet: Die permanente Osteosarkomzelllinie Saos-2 reagiert analog zu den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien ab derselben Konzentration von 100 nM MTX mit einer signifikanten Reduktion der Viabilität und Proliferation. In dieser Studie wurden außerdem fünf weitere Zelllinien aus Tumorgewebe isoliert und untersucht. In keiner dieser Linien konnte jedoch eine Reduktion der Viabilität unter den IC_{50} -Wert durch Konzentrationen bis 100 μ M MTX erreicht werden. Die Autoren begründen dies ebenfalls mit einer erhöhten Verdopplungszeit der fünf Zelllinien gegenüber

Saos-2-Zellen, schließen aber weitere Resistenzmechanismen nicht aus. Interessanterweise waren trotzdem sowohl in allen Linien als auch in Saos-2-Zellen Veränderungen zu beobachten, die auf einer nicht-DHFR-vermittelten Wirkung von MTX basieren. Hierzu gehörten eine Induktion der DNA-Methylierung und eine Erhöhung der globalen Histon H3-Acetylierung (Sramek et al. 2016). Auch für direkte Hedgehog-Antagonisten sind Beobachtungen beschrieben, die mit der hier vorliegenden Ergebnislage der Körnerzellvorläufer übereinstimmen: In mit SHH stimulierten NIH-3T3-Zellen benötigt es hohe Konzentrationen für eine Hemmung des Zellwachstums, während eine Suppression von *Gli1* schon unter kleinen Konzentrationen detektierbar ist (Romer et al. 2004).

In den primären Medulloblastomzellen (*Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}*) deuten die Ergebnisse insgesamt ebenfalls auf eine Verminderung der SHH-Signalwegaktivität unter MTX-Behandlung hin: Neben der Reduktion von Viabilität und Proliferation war unter MTX-Behandlung auch die Expression des SHH-Zielgens *Gli1* signifikant erniedrigt. Jedoch muss auch hier angemerkt werden, dass für eine umfassende Aussage neben *Gli1* weitere beteiligte Gene des SHH-Signalwegs untersucht werden müssten. Weiterhin könnte vermutet werden, dass die Medulloblastomzellen analog zu den LDE225-Experimenten sensibler auf MTX reagieren als die fünf Zelllinien, in denen keine SHH-Überaktivierung bekannt ist. Dies hat sich jedoch nicht bestätigt und auch in den Experimenten mit Vincristin zeigte sich der IC₅₀-Wert auf ähnlich niedrigem Niveau wie in den Zelllinien, was auf ein generell gutes Ansprechen auf Zytostatika aufgrund der hohen Proliferationsrate der Medulloblastomzellen zurückzuführen sein könnte.

Innerhalb der permanenten Zelllinien ergaben sich ebenfalls Unterschiede: Die SJMM4-Zellen hoben sich unter Behandlung mit MTX und Vincristin durch höhere IC₅₀-Werte von den restlichen Zelllinien ab. Da sich die SJMM4-Zellen ebenfalls durch eine niedrigere Proliferationsrate von etwa 11 % auszeichnen, legen diese Beobachtungen nahe, dass MTX in den getesteten Zelllinien vorrangig über eine Hemmung der DHFR wirkt.

4.3 DHFR-vermittelte und weitere Wirkmechanismen von MTX

Werden SHH-Medulloblastome im Zusammenhang mit der schon lang bekannten Wirkweise von MTX über den Folsäurestoffwechsel betrachtet, ergeben sich in der Literatur folgende Annahmen: Körnerzellvorläufer, die durch das Mitogen SHH stimuliert wurden, weisen einen erhöhten replikativen Stress auf. Dieser unterscheidet sich grundlegend von onkogen ausgelöstem replikativem Stress: Letzterer führt zu einer Verlangsamung der Replikationsgabel, wohingegen eine hohe SHH-Signalwegaktivität eine Erhöhung der Replikationsgeschwindigkeit bewirkt. Dies führt wiederum zu einer Verkürzung der S-Phasen (Macheret and Halazonetis 2015, Tamayo-Orrego et al. 2020). Weiterhin fördert der SHH-induzierte replikative Stress den Verlust der Heterozygotie am Locus von *Ptch1* und somit die Entstehung von SHH-Medulloblastomen (Tamayo-Orrego et al. 2020). Die über den SHH-Signalweg vermittelte erhöhte Replikationsgeschwindigkeit erfordert vor allem in den sich schnell teilenden Medulloblastomzellen eine zusätzlich erhöhte Menge an Substraten, wie den Nukleotiden. Für deren Bereitstellung ist eine erhöhte Aktivität der Dihydrofolatreduktase erforderlich. In diesem Sachverhalt könnte eine mögliche Erklärung für das gute Ansprechen von primären Medulloblastomzellen auf MTX liegen: Durch eine Hemmung der DHFR wird der Nukleotid-Pool erschöpft und die hohe Replikationsgeschwindigkeit kann nicht aufrechterhalten werden. Möglicherweise ist in dieser Arbeit die Reaktion der primären Medulloblastomzellen aus diesem Grund stärker ausgeprägt als die der Körnerzellvorläufer, da der replikative Stress in den Tumorzellen grundsätzlich höher ist.

Der p53/p21-Signalweg ist in vielen biologischen Prozessen involviert und stellt einen wichtigen Mediator der Zellseneszenz dar, die wiederum ein tumorsuppressiver Mechanismus ist (Braig et al. 2005, Chen et al. 2005). Das Protein p21 ist ein CDK (*cyclin dependent kinase*)-Inhibitor und wird durch das Gen *Cdkn1a* codiert. In Mäusen mit heterozygotem Verlust von *Ptch1* konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Cdkn1a* in präneoplastischen Läsionen erhöht, aber in fortgeschrittenen Medulloblastomen nicht mehr detektierbar ist. Somit scheint der Verlust von p21 und damit des Mechanismus der Zellseneszenz einer der Treiber für den Übergang einer präneoplastischen Läsion zum malignen Tumor zu sein (Tamayo-Orrego et al. 2016). Im Kontext mit

MTX existieren Hinweise, dass der p53/p21-Signalweg von MTX beeinflusst wird. Es wird angenommen, dass MTX über eine Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53 eine erhöhte Expression von *Cdkn1a* bewirkt, was in Tumorzellen die Apoptose induziert (Huang et al. 2011). In den im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsexperimenten konnte in den primären Medulloblastomzellen eine Veränderung in der Expression von *Cdkn1a* gezeigt werden: Unter der Behandlung mit MTX war die Expression von *Cdkn1a* in den Medulloblastomzellen signifikant erhöht, während dieser Effekt in Körnerzellvorläufern nicht nachweisbar war. Dies könnte darauf hindeuten, dass MTX eine Wiederherstellung der Mechanismen der Zellseneszenz bewirkt und somit einer weiteren Proliferation der Tumorzellen entgegenwirkt. Dieser Zusammenhang könnte in Mausmodellen mit zusätzlichem *Tp53*-Knockout jedoch noch besser untersucht werden. Weiterhin wäre auch das klinische Ansprechen von Patienten mit *Tp53*-Mutation auf MTX von Interesse. Die Fallzahlen sind allerdings in der Gruppe der SHH-Medulloblastome mit einem Anteil von 10 % äußerst begrenzt, was die Durchführung einer umfassenden Evaluierung erschwert (Northcott et al. 2019).

4.4 Resistenzmechanismen gegenüber MTX

Das geringe Ansprechen der Körnerzellvorläufer auf MTX wirft weiterhin die Frage auf, ob in diesen Zellen ein bestimmter Resistenzmechanismus vorliegt. Generell sind die am besten untersuchten Mechanismen gegenüber MTX eine verminderte Aufnahme durch den RFC1-Transporter, eine kürzere Retention aufgrund verminderter Polyglutaminierung, eine erhöhte Aktivität und eine veränderte Bindungsdomäne der Dihydrofolatreduktase sowie ein erhöhtes Ausschleusen des Wirkstoffs aus der Zelle (Bertino et al. 1996, Fotoohi et al. 2004). Neradil et al. beobachteten ebenfalls eine MTX-Resistenz der Medulloblastomzelllinie MBL-02. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass diese Resistenz vermutlich auf einer verminderten Expression von *RFC1* beruht. Im Gegensatz dazu war in Daoy-Zellen die Expression von *RFC1* erhöht. In diesen Zellen ist möglicherweise eine hohe Aktivität der DHFR und Thymidilat-Synthase ursächlich für eine MTX-Resistenz (Neradil et al. 2015). Ergänzend zu den Ergebnissen dieser Arbeit könnte eine Untersuchung der Körnerzellvorläufer und

Medulloblastomzellen hinsichtlich der Expression von *RFC1*, *DHFR* und *TS* weitere Erkenntnisse liefern.

Ein weiterer möglicher Resistenzmechanismus könnte durch die ABC-Transporter bedingt sein, die in der Zelle als Efflux-Pumpen fungieren. Das für *ABCG2* codierende Gen ist in verschiedenen malignen Erkrankungen, die gegenüber Zytostatika resistent sind, häufig hochreguliert. Auch MTX ist als Substrat dieses Transporters bekannt und wird über diesen aus der Zelle transportiert (Volk and Schneider 2003). Ein gutes Ansprechen auf MTX ist mit einer geringen Expression von *ABCG2* assoziiert (Muto et al. 2021). Es gibt Hinweise in der Literatur, dass *ABCG2* während der Kleinhirnentwicklung exprimiert wird, was eine mögliche Erklärung für die Resistenz von Körnerzellvorläufern gegenüber MTX wäre (Zhou et al. 2006). Daher wäre es interessant, die Expression von *ABCG2* in Körnerzellvorläufern direkt zu bestimmen und vergleichend zu untersuchen, wie sich dieser Sachverhalt in Medulloblastomzellen verhält. Außerdem ist ein direkter Einfluss des SHH-Signalwegs auf den *ABCG2*-Transporter beschrieben: Das zugrundeliegende Gen des *ABCG2* besitzt eine direkte Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors *Gli1* (Singh et al. 2011). In Ösophagus-, Prostata- und Plattenepithelkarzinomen sowie in Tumorstammzellen des Magens ist eine erhöhte *ABCG2*-Expression durch einen aktivierten SHH-Signalweg zu beobachten (Sims-Mourtada et al. 2007, Xu et al. 2015). Wenn dies auch für Medulloblastome zutrifft, könnte angenommen werden, dass eine Inhibierung des SHH-Signalwegs zu einer Verminderung der *ABCG2*-Transporterdichte führt und damit zu einer Akkumulation von Substraten wie MTX und anderen Chemotherapeutika. Eine durch MTX verursachte Hemmung der SHH-Aktivität hätte in diesem Zusammenhang den weiteren Effekt, dass sich wiederum die Verweildauer von MTX in der Zelle verlängert. Dies könnte dazu führen, dass *DHFR*-vermittelte Wirkungen besser zum Tragen kommen. Während die Hypothese für eine SHH-Signalweg-Inhibition durch MTX weiter zu untersuchen ist, ist dies für SHH-Antagonisten wie Sonidegib bereits gesichert (Romer et al. 2004, Kool et al. 2014). Dies könnte eine Bedeutung für mögliche Kombinationstherapien haben, indem durch den Einsatz von SHH-Antagonisten über eine Hemmung des *ABCG2* die Sensibilität für Zytostatika erhöht wird. Anhand von

Lungenkarzinomzellen konnte dieser Effekt unter Verwendung von *Sonidegib* bereits gezeigt werden (Zhang et al. 2022).

4.5 Toxizität und Nebenwirkungen von MTX

Obwohl die Ergebnisse dieser Arbeit keine definitive Erklärung für die verminderte Sensibilität von Körnerzellvorläufern gegenüber MTX bieten, könnten sie dennoch bedeutsame Anhaltspunkte bezüglich der Toxizität liefern. Letztlich stellt im klinischen Kontext eine Substanz, die nur Tumorzellen schädigt und gesundes Gewebe nicht beeinträchtigt, die Idealvorstellung dar. Sicherlich entspricht dies im Fall von MTX klinisch nicht der Realität, da es eine Reihe teils gravierender Nebenwirkungen aufweist (s. Kapitel 1.3.2). Im Rahmen der HIT-MED-Studien wurde das Nebenwirkungsprofil und die Toxizität der intraventrikulären MTX-Therapie untersucht. Direkte toxische Effekte zeigten sich nur selten und die Therapie war im Allgemeinen gut tolerabel, wobei hierzu noch keine Langzeitdaten existieren (Pompe et al. 2015). Die neuropsychologischen Auswirkungen waren in etwa vergleichbar mit denen der Hochdosis-Chemotherapie und alleiniger Resektion, während unter Radiotherapie schlechtere Ergebnisse erzielt wurden (Mynarek et al. 2020b, Ottensmeier et al. 2020). Es ist allerdings weiterhin unklar, wie stark der Einfluss von intraventrikulär appliziertem MTX auf die Neurokognition ist, da auch in der Therapie von Leukämien diesbezüglich kontroverse Ergebnisse vorliegen (Butler et al. 2013, Moleski 2000).

4.6 Einfluss der Expositionsdauer von MTX

Die Viabilitätsexperimente haben gezeigt, dass die Reaktion der primären Medulloblastomzellen auf eine Behandlung mit MTX maßgeblich von der Expositionsdauer abhängt und ein signifikanter Effekt erst nach 144 Stunden eintritt (Abbildung 9). Interessanterweise ist auch in der Behandlung von Basalzellkarzinomzellen mit MTX eine Steigerung der Expositionsdauer von 24 Stunden auf 72 Stunden erforderlich, um signifikante Effekte in der Reduktion der Viabilität zu erzielen. Hingegen erreichen andere Chemotherapeutika wie Cisplatin, 5-FU und Bleomycin bei Behandlung derselben Zellen schon nach 24 Stunden signifikant niedrigere IC_{50} -Werte (Olesen et al. 2017). Diese

Beobachtung könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass die Toxizität von MTX aufgrund des Einflusses auf die DNA-Replikation stark von der Proliferationsrate der Zellen abhängt (Genestier et al. 2000). Das in der klinischen Praxis beobachtete gute Ansprechen auf intraventrikulär verabreichtes MTX könnte mit diesem Sachverhalt zusammenhängen: Die Exposition nach intraventrikulärer Gabe mit 60 - 120 Stunden ist ebenfalls deutlich länger als nach intravenöser Gabe mit einer Expositionsdauer von weniger als 48 Stunden. Dies hat den Vorteil, dass durch die intraventrikuläre Therapie mit kleineren Dosen verhältnismäßig höhere Konzentrationen im ZNS erreicht werden können (Fleischhack et al. 2005, Pompe et al. 2015).

Bezüglich der optimalen MTX-Dosis sollten die in dieser Arbeit gezeigten IC_{50} -Werte zurückhaltend betrachtet werden, da eine adäquate Konzentration im Organismus höchstwahrscheinlich hiervon abweicht. Die klinisch unter Hochdosis-Chemotherapie maximal erreichten Plasmakonzentrationen liegen bei etwa 40 μ M (Sterba et al. 2006). In den *in vitro* Experimenten war ersichtlich, dass die Medulloblastomzellen schon in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen auf MTX reagieren. Der IC_{50} -Wert von 38 nM liegt in einem ähnlichen Bereich wie die Reaktion von Basalzellkarzinomzellen mit 8 - 31 nM (Olesen et al. 2017). Nichtsdestotrotz könnten sich hier Parallelen zur klinischen Anwendung darstellen: Der Kurvenverlauf in den Viabilitätsexperimenten mit den primären Medulloblastomzellen ist im Konzentrationsbereich bis 100 nM sehr steil und flacht dann deutlich ab (Abbildung 9). Eine weitere Steigerung der MTX-Dosis führt also nicht zu signifikant stärkeren Effekten. Auch in den Ergebnissen von Neradil et al. war dieser Zusammenhang zu beobachten: Konzentrationen ab 1 μ M MTX konnten die Proliferation von Medulloblastomzelllinien nicht weiter reduzieren (Neradil et al. 2015). Für die klinische Anwendung könnten diese Beobachtungen darauf hindeuten, dass die intraventrikuläre Therapie mit MTX durch eine verlängerte Wirkungsdauer bei niedrigeren Dosen eine hohe Effektivität aufweist, und das möglicherweise bei geringerer Toxizität.

5. AUSBLICK

In Studiengruppen wurde beobachtet, dass insbesondere in der vulnerablen Patientengruppe von Kindern unter drei bis fünf Jahren der Einsatz von intraventrikulär appliziertem MTX einen Überlebensvorteil bewirkt (s. Kapitel 4.1). Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass Medulloblastomzellen *in vitro* ein gutes Ansprechen auf MTX zeigen, und ergaben sich Hinweise darauf, dass der SHH-Signalweg hieran beteiligt ist. Um dies noch besser bewerten zu können, könnten die Genexpressionsanalysen durch globale RNA-Sequenzierungs-Analysen erweitert werden (s. Kapitel 4.2).

Aufgrund der hohen klinischen Relevanz bietet sich die Fortführung des Projekts durch *in vivo* Experimente an. Hierbei könnten verschiedene Dosen von systemischem und intrathekalem MTX hinsichtlich ihres Einflusses auf Tumorwachstum und Überleben in Mäusen mit SHH-Medulloblastom untersucht werden. Dazu würde sich das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell des Genotyps *Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}* eignen.

Basierend auf den vorliegenden *in vitro* Ergebnissen lässt sich ableiten, dass schon minimale Konzentrationen von MTX einen messbaren Effekt erzielen können. Daher könnte in den *in vivo* Experimenten eine Strategie mit geringen Dosen und einer längeren Expositionsdauer in Erwägung gezogen werden. In diesem Zusammenhang sollte auch Augenmerk auf die Toxizität von intraventrikulärem MTX gelegt werden, da hierzu noch keine klinischen Langzeitdaten existieren. Die Ergebnisse der Experimente mit den Körnerzellvorläufern deuten darauf hin, dass MTX möglicherweise ein vorteilhaftes Nebenwirkungsprofil in Bezug auf benigne Zellen aufweist. Um diese Hypothese weiter zu prüfen, könnten zusätzliche Analysen der murinen Großhirnstruktur mittels MRT oder *post mortem* hinsichtlich Zeichen einer Leukenzephalopathie erfolgen. Ein weiterer bedeutsamer Aspekt im klinischen Kontext ist die Beeinträchtigung der Neurokognition unter MTX-Therapie, welche auch in klinischen Studien miterfasst wird (Ottensmeier et al. 2020, Mynarek et al. 2020b). Daher könnte es von zusätzlichem Interesse sein, die *in vivo* Experimente durch neurokognitive Testungen zu erweitern.

Ebenso könnte auch die Integration einer Kombinationstherapie aus direkten Signalweginhibitoren und MTX *in vivo* wichtige Erkenntnisse liefern. Diese

Strategie hat in anderen Tumorentitäten bereits zu einer erhöhten Chemosensitivität geführt und könnte somit von Relevanz sein (s. Kapitel 4.4).

Weitere Ursachen für die Sensibilität von Medulloblastomzellen für MTX hängen möglicherweise mit einem erhöhten replikativen Stress und der Zellseneszenz zusammen (s. Kapitel 4.3). Diese Aspekte könnten ebenfalls als Grundlage für die Planung zukünftiger Studien dienen, um die Wirkweise von MTX weiter zu verstehen und Therapieoptionen zu optimieren.

Die *in vitro* Ergebnissen dieser Arbeit haben bereits potenzielle Parallelen zu klinischen Beobachtungen aufgezeigt. Falls sich diese Übereinstimmungen im Mausmodell bestätigen, könnten die positiven klinischen Ergebnisse der intraventrikulären MTX-Therapie biologisch genauer erklärt werden. Dies würde ermöglichen, davon profitierende Patienten besser zu identifizieren. Insgesamt würden wichtige Erkenntnisse für die Therapie von Medulloblastomen resultieren, und nicht zuletzt könnte der hohe Stellenwert der intraventrikulären Therapie von SHH-Medulloblastomen mit MTX weiter begründet werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Medulloblastome sind die häufigsten malignen Hirntumoren im Kindesalter und lassen sich in die vier molekularen Subgruppen WNT, SHH, Gruppe 3 und Gruppe 4 unterteilen. Die Basis der Therapie bilden die operative Resektion, Chemotherapie und ggf. Radiotherapie. Besonders bei Kindern im Alter unter drei bis fünf Jahren wird versucht, die Radiotherapie aufgrund der zu erwartenden Langzeitfolgen zu vermeiden. Das Zytostatikum Methotrexat (MTX) ist als Folsäureantagonist bekannt und ein fester Bestandteil der Chemotherapie. Unter der additiven Gabe von intraventrikulärem MTX wurde in der Gruppe der SHH-Medulloblastome in klinischen Studien ein besseres Überleben erreicht. Im Rahmen dieser Arbeit sollten der Einfluss von MTX auf SHH-Medulloblastome *in vitro* untersucht sowie mögliche Konsequenzen für die Klinik dargestellt werden. In primären murinen Medulloblastomzellen konnte eine hohe Sensibilität gegenüber MTX bestätigt werden. Die Rolle des SHH-Signalwegs konnte in diesem Zusammenhang nicht abschließend geklärt werden, da die erhaltenen IC₅₀-Werte vergleichbar zu denen der Referenz-Zelllinien waren. Die Expression des SHH-Zielgens *Gli1* war unter MTX-Behandlung deutlich erniedrigt, was einen Einfluss auf den SHH-Signalweg nahelegt. In Körnerzellvorläufern, die als Ursprungszellen für SHH-Medulloblastome gelten, waren die Ergebnisse kontrovers. Das Zellwachstum konnte durch MTX nur wenig eingeschränkt werden, in den Genexpressionsanalysen gab es hingegen Hinweise auf eine mögliche Affektion des SHH-Signalwegs.

Aus den Experimenten an primären Medulloblastomzellen ergab sich, dass für einen signifikanten Effekt eine längere Behandlungsdauer von 144 Stunden erforderlich war. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits geringe Konzentrationen an MTX ausreichend, um die Viabilität der Zellen zu reduzieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben die hohe Sensibilität von SHH-Medulloblastomen gegenüber MTX weiter verdeutlicht. Für die klinische Anwendung könnte von wichtiger Bedeutung sein, dass eine längere Exposition mit niedrigeren Dosen möglicherweise vorteilhaft ist. Die Beteiligung des SHH-Signalwegs an der Wirkung von MTX lässt sich aufgrund der durchgeführten Experimente weiterhin annehmen und sollte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* noch weiter evaluiert werden.

7. ABSTRACT

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor of childhood and can be divided into four molecular subgroups named WNT, SHH, Group 3 and Group 4. The general treatment options comprise surgical resection, chemotherapy and radiotherapy. However, children under the age of three to five often show detrimental long-term effects after radiotherapy, which is therefore aimed to be avoided. The cytostatic agent methotrexate (MTX), known to act as a folate antagonist, is regularly implemented in chemotherapy schedules of medulloblastoma. It has been shown that addition of intraventricular MTX increases survival in children with SHH medulloblastoma. In this work, the objective was to examine the impact of MTX on SHH medulloblastoma *in vitro* and derive potential clinical implications.

We were able to confirm a strong response of primary murine medulloblastoma cells to MTX. The role of MTX on the SHH-signaling pathway could not be completely clarified, as the IC₅₀ values were comparable to the ones obtained in the reference cell lines. However, gene expression analyses showed a noticeable decrease in the expression of the SHH target gene *Gli1* proposing an interaction with the SHH pathway. Granule cell precursors (GCPs), the cells of origin for SHH medulloblastoma, showed controversial reactions to MTX. Cell viability and proliferation were only slightly decreased, while gene expression analyses indicated a potential suppression of the Hedgehog signaling pathway.

Furthermore, we observed that a treatment duration of 144 hours was necessary to obtain significant results in medulloblastoma cells. Then, low concentrations of the substance were sufficient for a markable decrease of cell viability.

The findings of this work have pointed out that murine SHH medulloblastomas are highly sensitive for MTX. The fact that a longer exposition with lower doses is potentially beneficial, might be relevant for the clinical use of MTX. Based on our results, an involvement of the SHH signaling pathway in the mechanism of action can still be assumed and should further be examined by *in vitro* and *in vivo* experiments.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-FU	5-Fluoruracil
ACB	ATP-binding cassette
ATP	Adenosintriphosphat
ATRT	Atypischer teratoider/rhabdoider Tumor
BET	Bromo- und extraterminale Domäne
BrdU	Bromdesoxyuridin
Bzw	beziehungsweise
CDK	cyclin dependant kinase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cre	causing recombination
DAPI	4'6'-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
E	Embryonaltag
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	extracellular-signal regulated kinases
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCPs	Körnerzellvorläufer (granule cell precursors)
Ggf	gegebenenfalls
GLI	Gliom-assoziierte Onkogen-Familie
Hh	Hedgehog

h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
JAK	Januskinase
KCNA	Kaliumkanal A
loxP	locus of crossing-over(x) in P1
MB	Medulloblastom
mM	millimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
MTX	Methotrexat
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	nuclear factor kappa B
nM	nanomolar
n.s.	nicht signifikant
o.g.	oben genannt
P	Postnataltag
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG-MTX	Polyglutaminiertes Methotrexat
PTCH	Patched
Ptch ^{fl/fl}	Murine Medulloblastomzellen des Genotyps <i>Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}</i>
RFC1	reduced folate carrier 1
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
Saos	sarcoma osteogenic
SHH	Sonic Hedgehog
SKK	Säuglinge und Kleinkinder
SMO	Smoothened

STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SUFU	Suppressor of Fused
TS	Thymidilat-Synthase
Trizol	Guanidin-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion
μM	mikromolar
v.a.	vor allem
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WNT	Wingless Int-1
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allegra CJ, Chabner BA, Drake JC, Lutz R, Rodbard D, Jolivet J (1985) Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates. *J Biol Chem* 260: 9720-6.
2. Anand S, Honari G, Hasan T, Elson P, Maytin EV (2009) Low-dose methotrexate enhances aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in skin carcinoma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 15: 3333-43.
3. Assaraf YG (2006) The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Updat* 9: 227-46.
4. Aza-Blanc P, Ramírez-Weber FA, Laget MP, Schwartz C, Kornberg TB (1997) Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89: 1043-53.
5. Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL (2002) Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* 129: 4753-61.
6. Baugh CM, Krumdieck CL, Nair MG (1973) Polyglutamate metabolites of methotrexate. *Biochem Biophys Res Commun* 52: 27-34.
7. Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MF, Fisher EM (2000) Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet* 24: 23-5.
8. Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG (1997) Mouse models of human disease. Part I: techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes Dev* 11: 1-10.
9. Ben-Arie N, Bellen HJ, Armstrong DL, McCall AE, Gordadze PR, Guo Q, Matzuk MM, Zoghbi HY (1997) Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* 390: 169-72.
10. Bertino JR, Göker E, Gorlick R, Li WW, Banerjee D (1996) Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors. *Oncologist* 1: 223-226.
11. Bhojwani D, Sabin ND, Pei D, Yang JJ, Khan RB, Panetta JC, Krull KR, Inaba H, Rubnitz JE, Metzger ML, Howard SC, Ribeiro RC, Cheng C, Reddick WE, Jeha S, Sandlund JT, Evans WE, Pui CH, Relling MV (2014) Methotrexate-induced neurotoxicity and leukoencephalopathy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 32: 949-59.
12. Borghesani PR, Peyrin JM, Klein R, Rubin J, Carter AR, Schwartz PM, Luster A, Corfas G, Segal RA (2002) BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Development* 129: 1435-42.
13. Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AHFM, Schlegelberger B, Stein H, Dörken B, Jenuwein T, Schmitt CA (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436: 660-665.
14. Branda CS, Dymecki SM (2004) Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* 6: 7-28.
15. Butler RW, Fairclough DL, Katz ER, Kazak AE, Noll RB, Thompson RD, Sahler OJ (2013) Intellectual functioning and multi-dimensional attentional processes in long-term survivors of a central nervous system related pediatric malignancy. *Life Sci* 93: 611-6.
16. Capper D, Jones DTW, Sill M, Hovestadt V, Schrimpf D, Sturm D, Koelsche C, Sahm F, Chavez L, Reuss DE, Kratz A, Wefers AK, Huang K, Pajtler KW, Schweizer L, Stichel D, Olar A, Engel NW, Lindenberg K, Harter PN, Braczynski AK, Plate KH, Dohmen H, Garvalov BK, Coras R, Hölsken A, Hoyer M, Bewerunge-Hudler M, Schick M, Fischer R, Beschorner R, Schittenhelm J, Staszewski O, Wani K, Varlet P, Pages M, Temming P, Lohmann D, Selt F, Witt H, Milde T, Witt O, Aronica E, Giangaspero F, Rushing E, Scheurlen W, Geisenberger C, Rodriguez FJ, Becker A, Preusser M, et al. (2018) DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature* 555: 469-474.

17. Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L, Peacock J, Shih DJH, Luu B, Garzia L, Torchia J, Nor C, Morrissy AS, Agnihotri S, Thompson YY, Kuzan-Fischer CM, Farooq H, Isaev K, Daniels C, Cho BK, Kim SK, Wang KC, Lee JY, Grajkowska WA, Perek-Polnik M, Vasiljevic A, Faure-Contier C, Jouvett A, Giannini C, Nageswara Rao AA, Li KKW, Ng HK, Eberhart CG, Pollack IF, Hamilton RL, Gillespie GY, Olson JM, Leary S, Weiss WA, Lach B, Chambless LB, Thompson RC, Cooper MK, Vibhakhar R, Hauser P, Van Veelen MC, Kros JM, French PJ, Ra YS, Kumabe T, López-Aguilar E, Zitterbart K, Sterba J, et al. (2017) Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell* 31: 737-754.e6.
18. Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, Drake JC, Jolivet J (1985) Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest* 76: 907-12.
19. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin H-K, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Paolo Pandolfi P (2005) Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436: 725-730.
20. Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15: 532-4, 536-7.
21. Cohen M, Kicheva A, Ribeiro A, Blassberg R, Page KM, Barnes CP, Briscoe J (2015) Ptch1 and Gli regulate Shh signalling dynamics via multiple mechanisms. *Nat Commun* 6: 6709.
22. Consalez GG, Goldowitz D, Casoni F, Hawkes R (2020) Origins, Development, and Compartmentation of the Granule Cells of the Cerebellum. *Front Neural Circuits* 14: 611841.
23. Curtin SC, Minino AM, Anderson RN (2016) Declines in Cancer Death Rates Among Children and Adolescents in the United States, 1999-2014. *NCHS Data Brief*: 1-8.
24. Dhall G, O'neil SH, Ji L, Haley K, Whitaker AM, Nelson MD, Gilles F, Gardner SL, Allen JC, Cornelius AS, Pradhan K, Garvin JH, Olshefski RS, Hukin J, Comito M, Goldman S, Atlas MP, Walter AW, Sands S, Sposto R, Finlay JL (2020) Excellent outcome of young children with nodular desmoplastic medulloblastoma treated on "Head Start" III: a multi-institutional, prospective clinical trial. *Neuro Oncol* 22: 1862-1872.
25. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75: 1417-30.
26. Ellison DW, Dalton J, Kocak M, Nicholson SL, Fraga C, Neale G, Kenney AM, Brat DJ, Perry A, Yong WH, Taylor RE, Bailey S, Clifford SC, Gilbertson RJ (2011a) Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathol* 121: 381-96.
27. Ellison DW, Kocak M, Dalton J, Megahed H, Lusher ME, Ryan SL, Zhao W, Nicholson SL, Taylor RE, Bailey S, Clifford SC (2011b) Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables. *J Clin Oncol* 29: 1400-7.
28. Erdmann F, Kaatsch P, Grabow D, Spix C (2020) German Childhood Cancer Registry-Annual Report 2019 (1980-2018). *Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz*.
29. Evans DG, Farndon PA, Burnell LD, Gattamaneni HR, Birch JM (1991) The incidence of Gorlin syndrome in 173 consecutive cases of medulloblastoma. *Br J Cancer* 64: 959-61.
30. Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF, Wolff JA (1948) Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). *New England Journal of Medicine* 238: 787-793.
31. Farndon PA, Del Mastro RG, Evans DG, Kilpatrick MW (1992) Location of gene for Gorlin syndrome. *Lancet* 339: 581-2.
32. Fleischhack G, Jaehde U, Bode U (2005) Pharmacokinetics Following Intraventricular Administration of Chemotherapy in Patients with Neoplastic Meningitis. *Clinical Pharmacokinetics* 44: 1-31.

33. Fotoohi K, Jansen G, Assaraf YG, Rothen L, Stark M, Kathmann I, Gregorczyk J, Peters GJ, Albertioni F (2004) Disparate mechanisms of antifolate resistance provoked by methotrexate and its metabolite 7-hydroxymethotrexate in leukemia cells: implications for efficacy of methotrexate therapy. *Blood* 104: 4194-4201.
34. Gajjar A, Robinson GW, Smith KS, Lin T, Merchant TE, Chintagumpala M, Mahajan A, Su J, Bouffet E, Bartels U, Schechter T, Hassall T, Robertson T, Nicholls W, Gururangan S, Schroeder K, Sullivan M, Wheeler G, Hansford JR, Kellie SJ, Mccowage G, Cohn R, Fisher MJ, Krasin MJ, Stewart CF, Broniscer A, Buchhalter I, Tatevossian RG, Orr BA, Neale G, Jr PK, Boop F, Srinivasan A, Pfister SM, Gilbertson RJ, Onar-Thomas A, Ellison DW, Northcott PA (2021) Outcomes by Clinical and Molecular Features in Children With Medulloblastoma Treated With Risk-Adapted Therapy: Results of an International Phase III Trial (SJMB03). *Journal of Clinical Oncology* 39: 822-835.
35. Genestier L, Paillot R, Fournel S, Ferraro C, Miossec P, Revillard JP (1998) Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. *J Clin Invest* 102: 322-8.
36. Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP (2000) Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology* 47: 247-57.
37. Gerber NU, Mynarek M, Von Hoff K, Friedrich C, Resch A, Rutkowski S (2014) Recent developments and current concepts in medulloblastoma. *Cancer Treat Rev* 40: 356-65.
38. Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Currie DS, Eden C, Kranenburg TA, Hogg T, Poppleton H, Martin J, Finkelstein D, Pounds S, Weiss A, Patay Z, Scoggins M, Ogg R, Pei Y, Yang ZJ, Brun S, Lee Y, Zindy F, Lindsey JC, Takeito MM, Boop FA, Sanford RA, Gajjar A, Clifford SC, Roussel MF, Mckinnon PJ, Gutmann DH, Ellison DW, Wechsler-Reya R, Gilbertson RJ (2010) Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature* 468: 1095-9.
39. Goldin A (1968) Preclinical methodology for the selection of anticancer agents. *Methods in Cancer Research* 4: 193-254.
40. Goodrich LV, Milenković L, Higgins KM, Scott MP (1997) Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277: 1109-13.
41. 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 (1996) Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 85: 841-51.
42. Hahn H, Wojnowski L, Miller G, Zimmer A (1999) The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models. *Journal of Molecular Medicine* 77: 459-468.
43. Hatten ME, Alder J, Zimmerman K, Heintz N (1997) Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation. *Curr Opin Neurobiol* 7: 40-7.
44. Hendrikse LD, Haldipur P, Saulnier O, Millman J, Sjoeben AH, Erickson AW, Ong W, Gordon V, Coudière-Morrison L, Mercier AL, Shokouhian M, Suárez RA, Ly M, Borlase S, Scott DS, Vladoiu MC, Farooq H, Sirbu O, Nakashima T, Nambu S, Funakoshi Y, Bahcheli A, Diaz-Mejia JJ, Golser J, Bach K, Phuong-Bao T, Skowron P, Wang EY, Kumar SA, Balin P, Visvanathan A, Lee JJY, Ayoub R, Chen X, Chen X, Mungall KL, Luu B, Bérubé P, Wang YC, Pfister SM, Kim S-K, Delattre O, Bourdeaut F, Doz F, Masliah-Planchon J, Grajkowska WA, Loukides J, Dirks P, Fèvre-Montange M, Jouvét A, et al. (2022) Failure of human rhombic lip differentiation underlies medulloblastoma formation. *Nature* 609: 1021-1028.
45. Hertz R, Li MC, Spencer DB (1956) Effect of methotrexate therapy upon choriocarcinoma and chorioadenoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 93: 361-6.
46. Hertz R, Lewis J, Jr., Lipsett MB (1961) Five year's experience with the chemotherapy of metastatic choriocarcinoma and related trophoblastic tumors in women. *Am J Obstet Gynecol* 82: 631-40.
47. Hirano T, Satow R, Kato A, Tamura M, Murayama Y, Saya H, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Fukami K (2013) Identification of novel small compounds that restore E-cadherin expression and inhibit tumor cell motility and invasiveness. *Biochemical Pharmacology* 86: 1419-1429.

48. Horton TM, Steuber P 2020. Overview of the treatment of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma in children and adolescents (Internet). UpToDate.com. Zuletzt aktualisiert am 04.05.2020. Zitiert am 19.07.2022. URL: https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-treatment-of-acute-lymphoblastic-leukemia-lymphoma-in-children-and-adolescents?search=leukämie&source=search_result&selectedTitle=3~150&usage_type=default&display_rank=3.
49. Hovestadt V, Remke M, Kool M, Pietsch T, Northcott PA, Fischer R, Cavalli FM, Ramaswamy V, Zapatka M, Reifenberger G, Rutkowski S, Schick M, Bewerunge-Hudler M, Korshunov A, Lichter P, Taylor MD, Pfister SM, Jones DT (2013) Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumour material using high-density DNA methylation arrays. *Acta Neuropathol* 125: 913-6.
50. Howard SC, McCormick J, Pui CH, Buddington RK, Harvey RD (2016) Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *Oncologist* 21: 1471-1482.
51. Huang WY, Yang PM, Chang YF, Marquez VE, Chen CC (2011) Methotrexate induces apoptosis through p53/p21-dependent pathway and increases E-cadherin expression through downregulation of HDAC/EZH2. *Biochem Pharmacol* 81: 510-7.
52. Huangfu D, Anderson KV (2006) Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development* 133: 3-14.
53. Inaba H, Khan RB, Laningham FH, Crews KR, Pui CH, Daw NC (2008) Clinical and radiological characteristics of methotrexate-induced acute encephalopathy in pediatric patients with cancer. *Ann Oncol* 19: 178-84.
54. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH, Jr., Scott MP (1996) Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272: 1668-71.
55. Kieran MW, Chisholm J, Casanova M, Brandes AA, Aerts I, Bouffet E, Bailey S, Leary S, Macdonald TJ, Mechinaud F, Cohen KJ, Riccardi R, Mason W, Hargrave D, Kalambakas S, Deshpande P, Tai F, Hurh E, Georger B (2017) Phase I study of oral sonidegib (LDE225) in pediatric brain and solid tumors and a phase II study in children and adults with relapsed medulloblastoma. *Neuro Oncol* 19: 1542-1552.
56. Kiltie AE, Lashford LS, Gattamaneni HR (1997) Survival and late effects in medulloblastoma patients treated with craniospinal irradiation under three years old. *Med Pediatr Oncol* 28: 348-54.
57. Kim H, Kim M, Im SK, Fang S (2018) Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res* 34: 147-159.
58. Kimura H, Ng JM, Curran T (2008) Transient inhibition of the Hedgehog pathway in young mice causes permanent defects in bone structure. *Cancer Cell* 13: 249-60.
59. Kool M, Jones DT, Jäger N, Northcott PA, Pugh TJ, Hovestadt V, Piro RM, Esparza LA, Markant SL, Remke M, Milde T, Bourdeaut F, Ryzhova M, Sturm D, Pfaff E, Stark S, Hutter S, Seker-Cin H, Johann P, Bender S, Schmidt C, Rausch T, Shih D, Reimand J, Sieber L, Wittmann A, Linke L, Witt H, Weber UD, Zapatka M, König R, Beroukhir R, Berthold G, Van Sluis P, Volckmann R, Koster J, Versteeg R, Schmidt S, Wolf S, Lawrenz C, Bartholomae CC, Von Kalle C, Unterberg A, Herold-Mende C, Hofer S, Kulozik AE, Von Deimling A, Scheurten W, Felsberg J, Reifenberger G, et al. (2014) Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothed inhibition. *Cancer Cell* 25: 393-405.
60. Koźmiński P, Halik PK, Chesori R, Gniazdowska E (2020) Overview of Dual-Acting Drug Methotrexate in Different Neurological Diseases, Autoimmune Pathologies and Cancers. *Int J Mol Sci* 21.
61. Kresbach C, Holst L, Schoof M, Leven T, Göbel C, Neyazi S, Tischendorf J, Loose C, Wrzeszcz A, Yorgan T, Rutkowski S, Schüller U (2023) Intraventricular SHH inhibition proves efficient in SHH medulloblastoma mouse model and prevents systemic side effects. *Neuro Oncol*.
62. Lafay-Cousin L, Bouffet E, Strother D, Rudneva V, Hawkins C, Eberhart C, Horbinski C, Heier L, Souweidane M, Williams-Hughes C, Onar-Thomas A, Billups CA, Fouladi M, Northcott P, Robinson G, Gajjar A (2020) Phase II Study of Nonmetastatic Desmoplastic Medulloblastoma in Children Younger Than 4 Years of Age: A Report of the Children's Oncology Group (ACNS1221). *J Clin Oncol* 38: 223-231.

63. Leto K, Arancillo M, Becker EB, Buffo A, Chiang C, Ding B, Dobyns WB, Dusart I, Haldipur P, Hatten ME, Hoshino M, Joyner AL, Kano M, Kilpatrick DL, Koibuchi N, Marino S, Martinez S, Millen KJ, Millner TO, Miyata T, Parmigiani E, Schilling K, Sekerková G, Sillitoe RV, Sotelo C, Uesaka N, Wefers A, Wingate RJ, Hawkes R (2016) Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum* 15: 789-828.
64. Lewis PM, Gritli-Linde A, Smeyne R, Kottmann A, McMahon AP (2004) Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev Biol* 270: 393-410.
65. Liu D, Wang S, Cui Y, Shen L, Du Y, Li G, Zhang B, Wang R (2012) Sonic hedgehog elevates N-myc gene expression in neural stem cells. *Neural Regen Res* 7: 1703-8.
66. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-8.
67. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, Von Deimling A, Ellison DW (2021) The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* 23: 1231-1251.
68. Low JA, De Sauvage FJ (2010) Clinical experience with Hedgehog pathway inhibitors. *J Clin Oncol* 28: 5321-6.
69. Macheret M, Halazonetis TD (2015) DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu Rev Pathol* 10: 425-48.
70. Machold R, Fishell G (2005) Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron* 48: 17-24.
71. Mao J, Ligon KL, Rakhlin EY, Thayer SP, Bronson RT, Rowitch D, McMahon AP (2006) A novel somatic mouse model to survey tumorigenic potential applied to the Hedgehog pathway. *Cancer Res* 66: 10171-8.
72. Mazewski C, Kang G, Kellie S, Gossett J, Leary S, Li B, Aridgides P, Hayes L, Reddy A, Shaw D, Burger P, Judkins A, Geyer JR, Fouladi M, Huang A (2020) MBCL-34. Efficacy Of Methotrexate (Mtx) According To Molecular Sub-Type In Young Children With Medulloblastoma (Mb): A Report From Children's Oncology Group Phase Iii Trial Acns0334. *Neuro-Oncology* 22: iii396-iii396.
73. Meinke G, Bohm A, Hauber J, Pisabarro MT, Buchholz F (2016) Cre Recombinase and Other Tyrosine Recombinases. *Chem Rev* 116: 12785-12820.
74. Ming JE, Kaupas ME, Roessler E, Brunner HG, Golabi M, Tekin M, Stratton RF, Sujansky E, Bale SJ, Muenke M (2002) Mutations in PATCHED-1, the receptor for SONIC HEDGEHOG, are associated with holoprosencephaly. *Hum Genet* 110: 297-301.
75. Moleski M (2000) Neuropsychological, neuroanatomical, and neurophysiological consequences of CNS chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Arch Clin Neuropsychol* 15: 603-30.
76. Muto S, Minamitani N, Ogura T, Nakajima A, Nakagawa K, Masaka T, Hiura S, Kobayashi H, Kato H, Kameda H (2021) Good response to methotrexate is associated with a decrease in the gene expression of ABCG2, a drug transporter, in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 31: 1079-1086.
77. Mynarek M, Obrecht D, Timmermann B, Schwarz R, Rutkowski S (2020a) HIT-MED Guidance for Patients with newly diagnosed Medulloblastoma Ependymoma and Pineoblastoma (Internet). Version 5.1. Zuletzt aktualisiert 08/2020. Zitiert am 14.10.2023. URL: <https://skion.nl/workspace/uploads/HIT-MED-Guidance-Final-Version-5-1.pdf>.
78. Mynarek M, Von Hoff K, Pietsch T, Ottensmeier H, Warmuth-Metz M, Bison B, Pfister S, Korshunov A, Sharma T, Jaeger N, Ryzhova M, Zheludkova O, Golanov A, Rushing EJ, Hasselblatt M, Koch A, Schüller U, Von Deimling A, Sahm F, Sill M, Riemenschneider MJ, Dohmen H, Monoranu CM, Sommer C, Staszewski O, Mawrin C, Schittenhelm J, Brück W, Filipinski K, Hartmann C, Meinhardt M, Pietschmann K, Haberler C, Slavc I, Gerber NU, Grotzer M, Benesch M, Schlegel PG, Deinlein F, Von Bueren AO, Friedrich C, Juhnke BO, Obrecht D, Fleischhack G, Kwicien R, Faldum A, Kortmann RD, Kool M, Rutkowski S (2020b) Nonmetastatic Medulloblastoma of Early Childhood: Results From the Prospective Clinical Trial HIT-2000 and An Extended Validation Cohort. *J Clin Oncol* 38: 2028-2040.

79. Nabai L, Kilani RT, Aminuddin F, Li Y, Ghahary A (2015) Methotrexate modulates the expression of MMP-1 and type 1 collagen in dermal fibroblast. *Molecular and Cellular Biochemistry* 409: 213-224.
80. Najim N, Podmore ID, Mcgown A, Estlin EJ (2009) Methionine restriction reduces the chemosensitivity of central nervous system tumour cell lines. *Anticancer Res* 29: 3103-8.
81. Nanni L, Ming JE, Bocian M, Steinhaus K, Bianchi DW, Die-Smulders C, Giannotti A, Imaizumi K, Jones KL, Campo MD, Martin RA, Meinecke P, Pierpont ME, Robin NH, Young ID, Roessler E, Muenke M (1999) The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 8: 2479-88.
82. Neradil J, Pavlasova G, Sramek M, Kyr M, Veselska R, Sterba J (2015) DHFR-mediated effects of methotrexate in medulloblastoma and osteosarcoma cells: the same outcome of treatment with different doses in sensitive cell lines. *Oncol Rep* 33: 2169-75.
83. Northcott PA, Hielscher T, Dubuc A, Mack S, Shih D, Remke M, Al-Halabi H, Albrecht S, Jabado N, Eberhart CG, Grajkowska W, Weiss WA, Clifford SC, Bouffet E, Rutka JT, Korshunov A, Pfister S, Taylor MD (2011a) Pediatric and adult sonic hedgehog medulloblastomas are clinically and molecularly distinct. *Acta Neuropathol* 122: 231-40.
84. Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, Bouffet E, Clifford SC, Hawkins CE, French P, Rutka JT, Pfister S, Taylor MD (2011b) Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol* 29: 1408-14.
85. Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy AS, Hovestadt V, Weischenfeldt J, Ehrenberger T, Gröbner S, Segura-Wang M, Zichner T, Rudneva VA, Warnatz H-J, Sidiropoulos N, Phillips AH, Schumacher S, Kleinheinz K, Waszak SM, Erkek S, Jones DTW, Worst BC, Kool M, Zapatka M, Jäger N, Chavez L, Hutter B, Bieg M, Paramasivam N, Heinold M, Gu Z, Ishaque N, Jäger-Schmidt C, Imbusch CD, Jugold A, Hübschmann D, Risch T, Amstislavskiy V, Gonzalez FGR, Weber UD, Wolf S, Robinson GW, Zhou X, Wu G, Finkelstein D, Liu Y, Cavalli FMG, Luu B, Ramaswamy V, Wu X, Koster J, Ryzhova M, Cho Y-J, et al. (2017) The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature* 547: 311-317.
86. Northcott PA, Robinson GW, Kratz CP, Mabbott DJ, Pomeroy SL, Clifford SC, Rutkowski S, Ellison DW, Malkin D, Taylor MD, Gajjar A, Pfister SM (2019) Medulloblastoma. *Nat Rev Dis Primers* 5: 11.
87. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795-801.
88. Olesen UH, Bojesen S, Gehl J, Haedersdal M (2017) Anticancer drugs and the regulation of Hedgehog genes GLI1 and PTCH1, a comparative study in nonmelanoma skin cancer cell lines. *Anticancer Drugs* 28: 1106-1117.
89. Oliver TG, Grasfeder LL, Carroll AL, Kaiser C, Gillingham CL, Lin SM, Wickramasinghe R, Scott MP, Wechsler-Reya RJ (2003) Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: A critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 7331-7336.
90. Ottensmeier H, Schlegel PG, Eyrich M, Wolff JE, Juhnke BO, Von Hoff K, Frahssek S, Schmidt R, Faldum A, Fleischhack G, Von Bueren A, Friedrich C, Resch A, Warmuth-Metz M, Krauss J, Kortmann RD, Bode U, Kuhl J, Rutkowski S (2020) Treatment of children under 4 years of age with medulloblastoma and ependymoma in the HIT2000/HIT-REZ 2005 trials: Neuropsychological outcome 5 years after treatment. *PLoS One* 15: e0227693.
91. Padovani L, André N, Constine LS, Muracciole X (2012) Neurocognitive function after radiotherapy for paediatric brain tumours. *Nat Rev Neurol* 8: 578-88.
92. Pak E, Mackenzie EL, Zhao X, Pazyra-Murphy MF, Park PMC, Wu L, Shaw DL, Addleson EC, Cayer SS, Lopez BG, Agar NYR, Rubin LL, Qi J, Merk DJ, Segal RA (2019) A large-scale drug screen identifies selective inhibitors of class I HDACs as a potential therapeutic option for SHH medulloblastoma. *Neuro Oncol* 21: 1150-1163.
93. Pan S, Wu X, Jiang J, Gao W, Wan Y, Cheng D, Han D, Liu J, Englund NP, Wang Y, Peukert S, Miller-Moslin K, Yuan J, Guo R, Matsumoto M, Vattay A, Jiang Y, Tsao J, Sun F, Pferdekamper AC, Dodd S, Tuntland T, Maniara W, Kelleher JF, 3rd, Yao YM, Warmuth M, Williams J, Dorsch M (2010)

Discovery of NVP-LDE225, a Potent and Selective Smoothed Antagonist. *ACS Med Chem Lett* 1: 130-4.

94. Park KS, Martelotto LG, Peifer M, Sos ML, Karnezis AN, Mahjoub MR, Bernard K, Conklin JF, Szczepny A, Yuan J, Guo R, Ospina B, Falzon J, Bennett S, Brown TJ, Markovic A, Devereux WL, Ocasio CA, Chen JK, Stearns T, Thomas RK, Dorsch M, Buonamici S, Watkins DN, Peacock CD, Sage J (2011) A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer. *Nat Med* 17: 1504-8.
95. Pasca Di Magliano M, Hebrok M (2003) Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer* 3: 903-11.
96. Pompe RS, Von Bueren AO, Mynarek M, Von Hoff K, Friedrich C, Kwiecien R, Treulieb W, Lindow C, Deinlein F, Fleischhack G, Kuehl J, Rutkowski S (2015) Intraventricular methotrexate as part of primary therapy for children with infant and/or metastatic medulloblastoma: Feasibility, acute toxicity and evidence for efficacy. *Eur J Cancer* 51: 2634-42.
97. Pöschl J, Stark S, Neumann P, Gröbner S, Kawauchi D, Jones DT, Northcott PA, Lichter P, Pfister SM, Kool M, Schüller U (2014) Genomic and transcriptomic analyses match medulloblastoma mouse models to their human counterparts. *Acta Neuropathol* 128: 123-36.
98. Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW, James CD (1997) Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res* 57: 842-5.
99. Reddick WE, Glass JO, Helton KJ, Langston JW, Xiong X, Wu S, Pui CH (2005) Prevalence of leukoencephalopathy in children treated for acute lymphoblastic leukemia with high-dose methotrexate. *AJNR Am J Neuroradiol* 26: 1263-9.
100. Robinson GW, Orr BA, Wu G, Gururangan S, Lin T, Qaddoumi I, Packer RJ, Goldman S, Prados MD, Desjardins A, Chintagumpala M, Takebe N, Kaste SC, Rusch M, Allen SJ, Onar-Thomas A, Stewart CF, Fouladi M, Boyett JM, Gilbertson RJ, Curran T, Ellison DW, Gajjar A (2015) Vismodegib Exerts Targeted Efficacy Against Recurrent Sonic Hedgehog-Subgroup Medulloblastoma: Results From Phase II Pediatric Brain Tumor Consortium Studies PBTC-025B and PBTC-032. *J Clin Oncol* 33: 2646-54.
101. Robinson GW, Kaste SC, Chemaitilly W, Bowers DC, Laughton S, Smith A, Gottardo NG, Partap S, Bendel A, Wright KD, Orr BA, Warner WC, Onar-Thomas A, Gajjar A (2017) Irreversible growth plate fusions in children with medulloblastoma treated with a targeted hedgehog pathway inhibitor. *Oncotarget* 8: 69295-69302.
102. Robinson GW, Rudneva VA, Buchhalter I, Billups CA, Waszak SM, Smith KS, Bowers DC, Bendel A, Fisher PG, Partap S, Crawford JR, Hassall T, Indelicato DJ, Boop F, Klimo P, Sabin ND, Patay Z, Merchant TE, Stewart CF, Orr BA, Korbel JO, Jones DTW, Sharma T, Lichter P, Kool M, Korshunov A, Pfister SM, Gilbertson RJ, Sanders RP, Onar-Thomas A, Ellison DW, Gajjar A, Northcott PA (2018) Risk-adapted therapy for young children with medulloblastoma (SJYC07): therapeutic and molecular outcomes from a multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 19: 768-784.
103. Romer JT, Kimura H, Magdaleno S, Sasai K, Fuller C, Baines H, Connelly M, Stewart CF, Gould S, Rubin LL, Curran T (2004) Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice. *Cancer Cell* 6: 229-40.
104. Roussel MF, Robinson GW (2013) Role of MYC in Medulloblastoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: 1-15.
105. 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 (2005) Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone. *N Engl J Med* 352: 978-86.
106. Rutkowski S, Gerber NU, Von Hoff K, Gnekow A, Bode U, Graf N, Berthold F, Henze GN, Wolff JEA, Warmuth-Metz M, Soerensen N, Emser A, Ottensmeier H, Deinlein F, Schlegel P-G, Kortmann R-D, Pietsch T, Kuehl J, Group TGPBTS (2009) Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy and deferred radiotherapy. *Neuro-Oncology* 11: 201-210.
107. Rutkowski S (2018) Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie: Medulloblastom im Kindes- und Jugendalter. S1-Leitlinie 025/009 (Internet). Zuletzt aktualisiert 04/2018. Zitiert am 30.05.2022. URL: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-009l_S1_Medulloblastom-Kinder-Jugendliche_2018-04.pdf.

108. Sasai K, Romer JT, Lee Y, Finkelstein D, Fuller C, Mckinnon PJ, Curran T (2006) Shh Pathway Activity Is Down-Regulated in Cultured Medulloblastoma Cells: Implications for Preclinical Studies. *Cancer Research* 66: 4215-4222.
109. Schüller U, Heine VM, Mao J, Kho AT, Dillon AK, Han YG, Huillard E, Sun T, Ligon AH, Qian Y, Ma Q, Alvarez-Buylla A, McMahon AP, Rowitch DH, Ligon KL (2008) Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell* 14: 123-34.
110. Schwalbe EC, Williamson D, Lindsey JC, Hamilton D, Ryan SL, Megahed H, Garami M, Hauser P, Dembowska-Baginska B, Perek D, Northcott PA, Taylor MD, Taylor RE, Ellison DW, Bailey S, Clifford SC (2013) DNA methylation profiling of medulloblastoma allows robust subclassification and improved outcome prediction using formalin-fixed biopsies. *Acta Neuropathol* 125: 359-71.
111. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A (2022) Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 72: 7-33.
112. Sims-Mourtada J, Izzo JG, Ajani J, Chao KS (2007) Sonic Hedgehog promotes multiple drug resistance by regulation of drug transport. *Oncogene* 26: 5674-9.
113. Singh RR, Kunkalla K, Qu C, Schlette E, Neelapu SS, Samaniego F, Vega F (2011) ABCG2 is a direct transcriptional target of hedgehog signaling and involved in stroma-induced drug tolerance in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene* 30: 4874-4886.
114. Skowron P, Farooq H, Cavalli FMG, Morrissy AS, Ly M, Hendrikse LD, Wang EY, Djambazian H, Zhu H, Mungall KL, Trinh QM, Zheng T, Dai S, Stucklin ASG, Vladoiu MC, Fong V, Holgado BL, Nor C, Wu X, Abd-Rabbo D, Bérubé P, Wang YC, Luu B, Suarez RA, Rastan A, Gillmor AH, Lee JJY, Zhang XY, Daniels C, Dirks P, Malkin D, Bouffet E, Tabori U, Loukides J, Doz FP, Bourdeaut F, Delattre OO, Masliah-Planchon J, Ayrault O, Kim SK, Meyronet D, Grajkowska WA, Carlotti CG, De Torres C, Mora J, Eberhart CG, Van Meir EG, Kumabe T, French PJ, Kros JM, et al. (2021) The transcriptional landscape of Shh medulloblastoma. *Nat Commun* 12: 1749.
115. Smith KS, Bihannic L, Gudenas BL, Haldipur P, Tao R, Gao Q, Li Y, Aldinger KA, Iskusnykh IY, Chizhikov VV, Scoggins M, Zhang S, Edwards A, Deng M, Glass IA, Overman LM, Millman J, Sjoboen AH, Hadley J, Golser J, Mankad K, Sheppard H, Onar-Thomas A, Gajjar A, Robinson GW, Hovestadt V, Orr BA, Patay Z, Millen KJ, Northcott PA (2022) Unified rhombic lip origins of group 3 and group 4 medulloblastoma. *Nature* 609: 1012-1020.
116. Spurlock CF, Iii, Gass HM, Iv, Bryant CJ, Wells BC, Olsen NJ, Aune TM (2014) Methotrexate-mediated inhibition of nuclear factor κB activation by distinct pathways in T cells and fibroblast-like synovocytes. *Rheumatology* 54: 178-187.
117. Sramek M, Neradil J, Sterba J, Veselska R (2016) Non-DHFR-mediated effects of methotrexate in osteosarcoma cell lines: epigenetic alterations and enhanced cell differentiation. *Cancer Cell International* 16: 14.
118. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LaG, Moreno F, Dolya A, Bray F, Hesseling P, Shin HY, Stiller CA (2017) International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. *Lancet Oncol* 18: 719-731.
119. Sterba J, Dusek L, Demlova R, Valik D (2006) Pretreatment plasma folate modulates the pharmacodynamic effect of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: "folate overrescue" concept revisited. *Clin Chem* 52: 692-700.
120. Tamayo-Orrego L, Wu CL, Bouchard N, Khedher A, Swikert SM, Remke M, Skowron P, Taylor MD, Charron F (2016) Evasion of Cell Senescence Leads to Medulloblastoma Progression. *Cell Rep* 14: 2925-37.
121. Tamayo-Orrego L, Gallo D, Racicot F, Bemmo A, Mohan S, Ho B, Salameh S, Hoang T, Jackson AP, Brown GW, Charron F (2020) Sonic hedgehog accelerates DNA replication to cause replication stress promoting cancer initiation in medulloblastoma. *Nature Cancer* 1: 840-854.
122. 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 (2002) Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 31: 306-10.

123. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, Eberhart CG, Parsons DW, Rutkowski S, Gajjar A, Ellison DW, Lichter P, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Kool M, Pfister SM (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 123: 465-72.
124. Thomas S, Fisher KH, Snowden JA, Danson SJ, Brown S, Zeidler MP (2015) Methotrexate Is a JAK/STAT Pathway Inhibitor. *PLoS One* 10: e0130078.
125. Tonn S, Korshunov A, Obrecht D, Sill M, Spohn M, Von Hoff K, Milde T, Pietsch T, Goschzik T, Bison B, Juhnke BO, Struve N, Sturm D, Sahm F, Bockmayr M, Friedrich C, Von Bueren AO, Gerber NU, Benesch M, Jones DTW, Kool M, Wefers AK, Schüller U, Pfister SM, Rutkowski S, Mynarek M (2023) Risk prediction in early childhood sonic hedgehog medulloblastoma treated with radiation-avoiding chemotherapy: Evidence for more than 2 subgroups. *Neuro Oncol* 25: 1518-1529.
126. Vandamme TF (2014) Use of rodents as models of human diseases. *J Pharm Bioallied Sci* 6: 2-9.
127. Vezmar S, Becker A, Bode U, Jaehde U (2003) Biochemical and clinical aspects of methotrexate neurotoxicity. *Chemotherapy* 49: 92-104.
128. Volk EL, Schneider E (2003) Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res* 63: 5538-43.
129. Wägner L, Bison B, Neumann-Holbeck A, Tischler T, Guiard A, Obrecht D, Ottensmeier H, Kortmann RD, Von Hoff K, Schlegel PG, Remke M, Redlich A, Holzer U, Blattmann C, Fleischhack G, Sander A, Jorch N, Becker M, Karremann M, Frühwald MC, Van Buijen M, Struve N, Warmuth-Metz M, Rutkowski S, Mynarek M (2022) QOL-10. Treatment-induced leukoencephalopathy in pediatric medulloblastoma survivors and its impact on long-term neurocognitive functioning. *Neuro Oncol* 24: i135.
130. Wang H, Mejia MC, Gonzalez SJ, Zoorob RJ, Chai W, Du XL (2021) Cancer incidence and survival trends among infants in the United States from 1975 to 2014. *Pediatr Blood Cancer* 68: e28917.
131. Wang Y, Zhou Z, Walsh CT, McMahon AP (2009) Selective translocation of intracellular Smoothed to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2623-8.
132. Wechsler-Reya RJ, Scott MP (1999) Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22: 103-14.
133. West AC, Johnstone RW (2014) New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *The Journal of Clinical Investigation* 124: 30-39.
134. Wiine S, Collier J, Kennedy C, Koller K, Grundy R, Walker D (2007) Presentation of childhood CNS tumours: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 8: 685-95.
135. Wingate RJ (2001) The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr Opin Neurobiol* 11: 82-8.
136. Xu M, Gong A, Yang H, George SK, Jiao Z, Huang H, Jiang X, Zhang Y (2015) Sonic hedgehog-glioma associated oncogene homolog 1 signaling enhances drug resistance in CD44(+)/Musashi-1(+) gastric cancer stem cells. *Cancer Lett* 369: 124-33.
137. Yang P-M, Lin J-H, Huang W-Y, Lin Y-C, Yeh S-H, Chen C-C (2010) Inhibition of histone deacetylase activity is a novel function of the antifolate drug methotrexate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391: 1396-1399.
138. Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, Read TA, Kessler JD, Bourbonoulas M, Schüller U, Machold R, Fishell G, Rowitch DH, Wainwright BJ, Wechsler-Reya RJ (2008) Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* 14: 135-45.
139. Zhang Y, Vagiannis D, Budagaga Y, Sabet Z, Hanke I, Rozkoš T, Hofman J (2022) Sonidegib potentiates the cancer cells' sensitivity to cytostatic agents by functional inhibition of ABCB1 and ABCG2 in vitro and ex vivo. *Biochemical Pharmacology* 199: 115009.
140. Zhou S, Fatima S, Sorrentino BP (2006) Abcg2 Expression Marks Neural Stem Cells in the Murine Cerebellum. *Blood* 108: 1674.

10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die vier Subgruppen und ihre klinischen sowie molekularen Charakteristika.	3
Abbildung 2: Der Sonic Hedgehog-Signalweg im inaktiven und aktiven Zustand.	5
Abbildung 3: Das Cre/loxP-Rekombinationssystem am Beispiel von Mäusen des Genotyps <i>Math1-cre::Ptch1^{fl/fl}</i>	10
Abbildung 4: Die Wirkweise von MTX auf den Folsäure-Stoffwechsel.	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Isolation von Körnerzellvorläufern.	27
Abbildung 6: Viabilität von Körnerzellvorläufern unter MTX-Behandlung.	35
Abbildung 7: Proliferation von Körnerzellvorläufern unter MTX-Behandlung.	36
Abbildung 8: Genexpression in Körnerzellvorläufern unter MTX-Behandlung.	37
Abbildung 9: Viabilität von primären murinen Medulloblastomzellen unter MTX-Behandlung.	38
Abbildung 10: Proliferation von primären murinen Medulloblastomzellen unter MTX-Behandlung.	39
Abbildung 11: Genexpression in primären murinen Medulloblastomzellen unter MTX-Behandlung.	40
Abbildung 12: Viabilität von etablierten permanenten Zelllinien unter MTX-Behandlung.	41
Abbildung 13: Proliferation von etablierten permanenten Zelllinien unter MTX-Behandlung.	43
Abbildung 14: Viabilität von Körnerzellvorläufern unter LDE-Behandlung.	44
Abbildung 15: Proliferation von Körnerzellvorläufern unter LDE225-Behandlung.	45
Abbildung 16: Viabilität von primären murinen Medulloblastomzellen unter LDE225-Behandlung.	46
Abbildung 17: Proliferation von primären murinen Medulloblastomzellen unter LDE225-Behandlung.	47
Abbildung 18: Viabilität von etablierten permanenten Zelllinien unter LDE225-Behandlung.	48
Abbildung 19: Proliferation von etablierten permanenten Zelllinien unter LDE225-Behandlung.	50
Abbildung 20: Viabilität von primären murinen Körnerzellvorläufern unter Vincristin-Behandlung.	51
Abbildung 21: Viabilität von primären murinen Medulloblastomzellen unter Vincristin-Behandlung.	52
Abbildung 22: Viabilität von etablierten permanenten Zelllinien unter Vincristin-Behandlung.	53
Abbildung 23: Vergleich der verschiedenen Reaktionen auf MTX-Behandlung.	55
Abbildung 24: Einfluss der Expositionsdauer von MTX.	56
Abbildung 25: Körnerzellvorläufer und Medulloblastomzellen sind sensibel gegenüber LDE225.	58
Abbildung 26: Vincristin reduziert die Viabilität von primären Zellen und Zelllinien.	59

11. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Auflistung aller Chemikalien, Reagenzien und Lösungen	18
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Kits	19
Tabelle 3: Verwendete Zellkulturmedien und -zusätze	19
Tabelle 4: Verwendete Medikamente, ihre Wirkstoffklasse und Hersteller	20
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Zelllinien	21
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Geräte	21
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 8: Primer für die Genotypisierung.....	24
Tabelle 9: PCR-Programm für die Genotypisierung.....	24
Tabelle 10: Zusammensetzung des Körnerzellmediums	26
Tabelle 11: Zusammensetzung des Tumorzellmediums	28
Tabelle 12: Für die Immunfärbung verwendete Antikörper, ihre Herkunft und Verdünnung	31
Tabelle 13: Zusammensetzung des qRT-PCR-Ansatzes.....	32
Tabelle 14: Primer für die qRT-PCR.....	33
Tabelle 15: LightCycler-Programm der qRT-PCR.....	33

12. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Schüller für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe an diesem Projekt zu arbeiten. Ich konnte mich stets auf eine gute Betreuung verlassen und habe die fachlichen Diskussionen und hilfreichen Anregungen sehr geschätzt.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Fördergemeinschaft Kinderkrebs-Zentrum e.V. Durch die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Juli-Harnack-Stipendiums wurde mir ermöglicht, mich vollständig auf die Dissertation zu konzentrieren. Ein weiterer Dank geht an meine Mit-StipendiatInnen für das freundliche Miteinander und die gegenseitige Unterstützung.

Ein großer Dank gilt auch den (ehemaligen) Mitgliedern der AG Schüller! Die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, nette Mittags- und Kaffeepausen und stete Hilfsbereitschaft haben mich immer gern ins Institut kommen lassen. Bei Vany und Jacky bedanke ich mich für die technische Assistenz und die Übernahme undankbarer Aufgaben wie des Färbens unzähliger Deckgläschen. Für die Hilfe bei der Organisation rund um die Mäuschen und die vielen wertvollen Anregungen bedanke ich mich bei Catena. Dann bedanke ich mich ganz besonders bei Caro und Melanie für die Unterstützung vom Anfang bis zum Ende. Nicht nur bei den ersten gescheiterten Körnerzellkulturen hattet ihr immer Ratschläge, wenn ich selbst mal keine mehr hatte! Ein großer Dank gilt auch Margarethe, für deinen Support, der weit über die Arbeit im Labor hinausging.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Besonders meinen Eltern sowie Stefan danke ich von ganzem Herzen für die uneingeschränkte Unterstützung, Geduld, die nötige Ablenkung sowie die ermunternden Worte. Ohne euch wäre das Gelingen dieser Arbeit so nicht möglich gewesen!

13. LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

Publikationen

Göbel C, Godbole S, Schoof M, Holdhof D, Kresbach C, **Loose C**, Neumann J, Schüller U (2023) MYC overexpression and SMARCA4 loss cooperate to drive medulloblastoma formation in mice. *Acta Neuropathol Commun.* 11(1):174.
doi: 10.1186/s40478-023-01654-2.

Kresbach C, Holst L, Schoof M, Leven T, Göbel C, Neyazi S, Tischendorf J, **Loose C**, Wrzeszcz A, Yorgan T, Rutkowski S, Schüller U (2023) Intraventricular SHH inhibition proves efficient in SHH medulloblastoma mouse model and prevents systemic side effects. *Neuro-Oncology.* 5;26(4):609-622.
doi: 10.1093/neuonc/noad191

14. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: