

Aus dem Institut für Anatomie II:  
Experimentelle Morphologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. U. Schumacher)  
Zentrum für Experimentelle Medizin  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Xenotransplantation humaner Neuroblastomzellen in  
severe combined immunodeficient (scid) Mäuse

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Fried-Ulrich Valentiner  
aus Schenefeld

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 15.12.2008  
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. R. Erttmann

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. H.-E. Laack

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Fragestellung</b>  | <b>7</b>  |
| <b>2. Einleitung</b>   | <b>8</b>  |
| 2.1. Das Neuroblastom  | 8         |
| 2.2. Das scid-Mausmodell   | 11        |
| 2.3. CD44 und Nestin   | 12        |
| <b>3. Material und Methoden</b>                                  | <b>13</b> |
| 3.1. Zelllinien  | 13        |
| 3.2. Zellkultur  | 13        |
| 3.3. Übertragung von Tumorzellen auf die Versuchstiere           | 14        |
| 3.4. Anfertigen von Paraffinschnitten                            | 15        |
| 3.5. Immunhistochemie  | 15        |
| 3.6. Hämatoxylin-Eosin Färbung und Auswertung der Lungenschnitte | 17        |
| 3.7. Statistische Auswertung                                     | 18        |
| <b>4. Ergebnisse</b>   | <b>19</b> |
| 4.1. Übersicht   | 19        |
| 4.2. Die Ergebnisse der Zelllinien im Einzelnen                  | 23        |
| 4.2.1. Die Zelllinie IMR-32                                      | 23        |
| 4.2.2. Die Zelllinie Kelly                                       | 26        |
| 4.2.3. Die Zelllinie LAN-1                                       | 29        |
| 4.2.4. Die Zelllinie LAN-5                                       | 30        |
| 4.2.5. Die Zelllinie LS  | 32        |
| 4.2.6. Die Zelllinie SH-SY5Y                                     | 33        |
| 4.2.7. Die Zelllinie SK-N-SH                                     | 33        |
| <b>5. Diskussion</b>   | <b>36</b> |
| <b>6. Zusammenfassung</b>  | <b>42</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis</b>                                   | <b>43</b> |

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| <b>8. Danksagung</b>                 | <b>50</b> |
| <b>9. Lebenslauf</b>                 | <b>51</b> |
| <b>10. Selbständigkeitserklärung</b> | <b>52</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |  |
|--------------------|--|
| Abb                | Abbildung  |
| BSG                | Behörde für Soziales, Familie,<br>Gesundheit und Verbraucherschutz |
| BSA                | bovines Serumalbumin   |
| bzgl               | bezüglich  |
| bzw                | beziehungsweise  |
| °C                 | Grad Celsius   |
| ca                 | circa  |
| CASY               | Cellcounter Analyser System  |
| CO <sub>2</sub>    | Kohlendioxid   |
| ddH <sub>2</sub> O | doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O                             |
| EDTA               | Ethylendiamintetraacetat   |
| evtl               | eventuell  |
| g                  | Gramm  |
| GPOH               | Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und<br>Hämatologie         |
| h                  | Stunde   |
| HE                 | Hämatoxylin-Eosin  |
| Hrsg               | Herausgeber  |
| INSS               | International Neuroblastoma Staging System                         |
| kg                 | Kilogramm  |
| KG                 | Körpergewicht  |
| nm                 | nanometer  |
| nM                 | nano Mol   |
| Nr                 | Nummer   |
| n.s.               | nicht signifikant  |
| min                | Minuten  |
| µm                 | micrometer   |
| *                  | p < 0,05   |
| **                 | p < 0,01   |
| ***                | p < 0,001  |
| s                  | Sekunden   |

|       |  |
|-------|--|
| sc    | subcutan   |
| scid  | Severe combined immune deficiency (schwere kombinierte Immundefizienz) |
| SD    | Standard deviation   |
| SEM   | Standard error of the mean   |
| Tab   | Tabelle  |
| TBS   | tris buffered saline (Tris gepufferte Salzlösung)                      |
| UKE   | Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf                                 |
| z. B. | zum Beispiel   |
| z. T. | zum Teil   |

# 1. Fragestellung

Mit etwa 8% aller kindlichen Tumoren ist das Neuroblastom einer der häufigsten malignen Tumoren des Kindesalters, pro Jahr werden 120-130 Neuroblastome in Deutschland neu diagnostiziert (Simon, 2005; Maris *et al.*, 2007). Trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten und einer stetigen Zunahme der 5-Jahresüberlebensrate in den letzten 20 Jahren, liegt die Langzeit-Überlebensrate für Kinder mit metastasiertem Neuroblastom, die älter als ein Jahr sind unter 40% (Berthold *et al.*, 2003; De Bernardi *et al.*, 2003). Folglich sind neue therapeutische Ansätze von großem klinischen Interesse.

Klinisch relevante Tiermodelle sind als Grundlage für Versuche zur Zellbiologie und zur Therapie von humanen Tumoren und ihrer Metastasierung unabdingbar. Daher soll in dieser Arbeit ein geeignetes Xenograftmodell für humane Neuroblastome entwickelt werden.

Im Einzelnen soll untersucht werden:

- Wie sieht das Wachstums- und Metastasierungsverhalten von humanen Neuroblastomzelllinien in scid Mäusen aus?
- Gibt es eine Korrelation zwischen der Größe des Primärtumors und der Anzahl der Fernmetastasen in diesem Modell?
- Welches CD44- und Nestin-Expressionsmuster weisen die in den Mäusen gewachsenen Primärtumoren und wenn vorhanden deren Metastasen auf?

## 2. Einleitung

### 2.1. Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist mit ca. 8% aller kindlichen Tumoren der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindesalter (Simon, 2005; Maris *et al.*, 2007). Etwa 40% der Kinder erkranken im ersten Lebensjahr, bis zum Alter von 6 Jahren sind mehr als 90% der Neuroblastome diagnostiziert. In Deutschland liegt die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr bei 120-130. Die Inzidenz liegt bei 1.3 Erkrankungen auf 100000 Kinder unter 15 Jahren (Hero und Berthold, 2002; Schwab *et al.*, 2003; Simon, 2005).

Das Neuroblastom gehört zu den embryonalen Tumoren, die charakteristischerweise im frühen Kindesalter auftreten. Es ist eine maligne Erkrankung des sympathischen Nervensystems und kann somit überall dort auftreten, wo sympathisches Nervengewebe zu finden ist. In erster Linie entstehen Neuroblastome in den Nebennieren, dem paravertebralen sympathischen Grenzstrang und paraaortal im Abdomen. Die Ausbreitung der Tumore erfolgt durch infiltratives Wachstum, anschließend dann durch lymphogene und hämatogene Metastasierung.

Etwa die Hälfte der Patienten weisen bei der Diagnosestellung Fernmetastasen auf. Diese finden sich meist im Knochenmark, in den Knochen, in Fernlymphknoten und in der Leber, seltener in der Haut, im Gehirn und in der Lunge (Morgenstern *et al.*, 2004; Hero und Berthold, 2002; Simon, 2005).

Die betroffenen Kinder leiden sowohl unter Krankheitszeichen, die direkt auf den Tumor zurückzuführen sind, als auch unter sogenannten Allgemeinsymptomen. Entsprechend der verschiedenen Ursprungsorte kann ein Neuroblastom durch unterschiedliche Symptome auffallen wie z. B. ein tastbarer Knoten im Bauchraum, Atembeschwerden, Husten und verdickte Halslymphknoten oder auch Anzeichen einer Querschnittslähmung durch Vorwachsen des Tumors in Richtung Rückenmark. Als Allgemeinsymptome können Blässe, Gewichtsverlust, Fieber und Durchfall auftreten.

Der Verdacht auf das Vorliegen eines Neuroblastoms ergibt sich aus den typischen Beschwerden und dem Befund der körperlichen Untersuchung. Häufig aber wird ein Neuroblastom auch zufällig im Rahmen einer Routineuntersuchung entdeckt. Die Diagnose durch weiterführende Untersuchungen wird gesichert: Blut- und Urinuntersuchung auf Katecholaminmetabolite, feingewebliche Beurteilung einer Biopsie, Röntgenuntersuchung des Brustkorbs, Ultraschalluntersuchung des Bauchraums, Computer- und Kernspintomographie, Szintigraphie.



Die internationale Stadieneinteilung des Neuroblastoms (INSS) berücksichtigt die Ausbreitung der Tumorerkrankung und die Resektabilität. Sie unterscheidet lokalisierte Neuroblastome, metastasierte Neuroblastome des Stadium IV und das Sonderstadium IV-S mit besonderem Metastasierungsmuster bei Säuglingen bis 1 Jahr (Tabelle 1).

|      |   |
|------|---|
| I    | Auf den Ursprungsort beschränkter Tumor, komplette Resektion mit oder ohne mikroskopischem Rest, ipsi- und kontralaterale Lymphknoten histologisch negativ                |
| IIa  | Unilateraler Tumor mit inkompletter Resektion, ipsi- und kontralaterale Lymphknoten histologisch negativ  |
| IIb  | Tumor wie bei IIa, jedoch positive ipsilaterale Lymphknoten   |
| III  | Tumor infiltriert über die Mittellinie oder Tumor mit positiven kontralateralen Lymphknoten oder Mittellinientumor mit beidseits positiven Lymphknoten                    |
| IV   | Tumoraussaat in Lymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber und andere Organe  |
| IV-S | Sonderform, nur bei Neugeborenen und Säuglingen im 1. Lebensjahr, lokalisierter Primärtumor wie bei Stadium I, IIa oder IIb, Tumoraussaat in Leber, Haut oder Knochenmark |

**Tabelle 1** Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INSS

Der klinische Verlauf des Neuroblastoms kann sehr unterschiedlich sein und ist von vielen Faktoren abhängig (Hero und Berthold, 2002; Simon, 2005). Wichtiger Risikofaktor ist das Tumorstadium bei Diagnosestellung, da lokalisierte Neuroblastome eine deutlich höhere 5-Jahresüberlebensrate haben als metastasierte Tumore des Stadium IV (Tabelle 2). Weiterhin spielt das Erkrankungsalter eine große Rolle für die Prognose. So können bei Kindern im ersten Lebensjahr inkomplett resezierte Tumore oder sogar disseminierte Neuroblastome des Stadium 4S spontan regredieren oder in gutartige Tumo-

re ausdifferenzieren. Im gleichen Stadium haben ältere Kinder eine schlechtere Prognose als Säuglinge im ersten Lebensjahr (Tabelle 2).

| Alter   | Stadium | Anteil der Neuroblastome in der Altersgruppe (%) | 5-Jahresüberlebensrate (%) |
|---------|---------|--|----------------------------|
| <1 Jahr | I-III   | 61   | 95 +/- 1                   |
|         | IV      | 13   | 53 +/-6                    |
|         | IV-S    | 26   | 79 +/-4                    |
| >1 Jahr | I-III   | 45   | 76 +/-2                    |
|         | IV      | 55   | 20 +/-2                    |

**Tabelle 2** Überleben bei Neuroblastom in Abhängigkeit von Alter und Stadium für 615 Kinder < 1 Jahr und 1028 Kinder > 1 Jahr (GPOH - Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Niemeyer, 2003)

Weitere klinische Marker, die mit der Prognose des Neuroblastoms korrelieren, sind LDH und Ferritin. Zunehmende Bedeutung als prognostische Faktoren erlangen molekulargenetische Veränderungen. Der wichtigste prognostisch relevante molekulare Marker ist die myc-N-Amplifikation, die mit einer deutlich schlechteren Überlebensrate einhergeht (Hero und Berthold, 2002). Daneben gibt es weitere zahlreiche klinische und insbesondere molekulare Marker (Status Chromosom 1p, 11q, 3p, Expression des Adhäsionsmoleküls CD44, Telomeraseaktivität etc.), die in der Zukunft sicherlich zunehmend Bedeutung erlangen, deren klinische Wertigkeit z.T. aber noch nicht endgültig geklärt werden konnte (Hero und Berthold, 2002; Schwab *et al.*, 2003; Simon, 2005).

Entsprechend des unterschiedlichen klinischen Verlaufs gibt es beim Neuroblastom keine eindeutige Standardbehandlung, sondern die Therapie erfolgt im Rahmen von aktuellen kooperativen Neuroblastomstudien, z. B. der Neuroblastomstudie NB2004 in Deutschland (Morgenstern *et al.*, 2004; Simon, 2005). In der Regel werden international drei Behandlungsgruppen unterschieden; die Beobachtungs-, die Standardrisiko- und

die Hochrisikogruppe. Die erste therapeutische Maßnahme ist in jedem Fall die Operation. Diese hat einerseits die Tumorresektion zum Ziel, aber auch die Diagnosesicherung und Zuordnung zu einer der Behandlungsgruppen. In Abhängigkeit von der Risikogruppe reichen die therapeutischen Interventionen von alleiniger Operation bis hin zur Maximaltherapie (Interdisziplinäre Leitlinien 2004, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. Frankfurt).

Trotz kontinuierlicher Verbesserung der 5-Jahresüberlebensrate für Patienten mit Neuroblastom, ist die Prognose für Kinder mit fortgeschrittenen Tumoren im Stadium IV (Tabelle 2) unbefriedigend (Berthold *et al.*, 2003; De Bernardi *et al.*, 2003). Die Prognose von Kindern mit Neuroblastom hängt somit entscheidend von der Fähigkeit dieses malignen Tumors ab Metastasen zu bilden. Die Entstehung von Metastasen ist ein sehr komplexer Vorgang, der eine Vielzahl von aufeinanderfolgenden Schritten im Sinne einer Kaskade umfasst, die diverse Interaktionen zwischen den Tumorzellen und ihrer Umgebung erfordern (Engers und Gabbert, 2000). In *in vitro* Experimenten können immer nur Teilaspekte dieser komplexen Metastasierungskaskade untersucht werden, während in spontan metastasierenden Xenograft Modellen jeder Schritt der Metastasierungskaskade durchlaufen werden muss um im Tier Fernmetastasen zu entwickeln (Eccles, 2001). Solche Modelle sind damit für die Untersuchung der metastatischen Ausbreitung von malignen Tumoren von großem Nutzen.

Die geringe Langzeit-Überlebensrate von Kindern mit metastasiertem Neuroblastom macht die Suche nach weiteren therapeutischen Möglichkeiten dringend erforderlich. Auch um präklinische therapeutische Studien durchführen zu können, ist es wichtig, geeignete metastatische Tiermodellssysteme zu etablieren.

## **2.2. Das scid-Mausmodell**

Ein *in vivo* Tiermodell ist für die Untersuchung komplexer Vorgänge wie der Tumormetastasierung sowie für die Testung möglicher therapeutischer Substanzen *in vitro* Versuchen deutlich überlegen. Dabei ist es wünschenswert, dass das Tiermodell mit der klinischen Situation korreliert.

Für die Untersuchungen hier sollen „severe combined immunodeficient“ (scid) Mäuse verwendet werden, die praktisch keine B- und T-Lymphozyten enthalten und so nicht zu einer spezifischen Immunreaktion fähig sind. Aus diesem Grund bilden die meisten

humanen transplantierten Tumorzellen in diesen Tieren Tumore, die sogar metastasieren können (Schumacher und Mitchell, 1997).

In dem scid Mausmodellssystem konnte für zahlreiche Tumoren wie z. B. das Mammakarzinom, kolorektale Karzinome und das maligne Melanom etc. eine klinische Relevanz nachgewiesen werden (Schumacher und Adam, 1997; Schumacher und Mitchell, 1997; Thies *et al.*, 2007; Valentiner *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit soll nun überprüft werden, ob das scid Mausmodellssystem auch für humane Neuroblastomzelllinien etabliert werden kann.

### **2.3. Immunhistochemische Marker von Neuroblastomen: CD44 und Nestin**

Die *in vitro* und die in den scid Mäusen gewachsenen Neuroblastomzellen sollen auf zwei verschiedene Marker, CD44 und Nestin, immunhistochemisch untersucht und die Färbeergebnisse mit dem Wachstums- und Metastasierungsverhalten korreliert werden. CD44 ist ein transmembranöses Glycoprotein aus der Familie der Zelladhäsionsmoleküle, dessen Hauptligand Hyaluronsäure ist (Underhill, 1992; Lesley *et al.*, 1993). Das CD44 Gen liegt auf Chromosom 11 und aus diesem einen Gen können ca. 20 verschiedene CD44 Isoformen durch alternatives Splicen hergestellt werden (Underhill, 1992; Sreaton *et al.*, 1992). Das am weitesten verbreitete CD44 Molekül ist die Standardform, die in fast allen normalen und vielen neoplastischen Zellen exprimiert werden (Borland, 1998). Interaktionen von CD44 und seinen natürlichen Liganden vermitteln Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakte und spielen eine wesentliche Rolle bei der Transformation, Progression und Metastasierung bestimmter Tumore (Marhaba und Zöller, 2004). In den meisten Tumoren ist eine hohe Expression von CD44 mit fortgeschrittenem Tumorstadium und Disseminierung assoziiert (Le *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2005; Zavriles *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2005). Beim Neuroblastom korreliert die Überexpression von CD44 jedoch mit einer günstigen Prognose (Christiansen *et al.*, 1995; Combaret, 1997; Favrot *et al.*, 1993; Kramer *et al.*, 1997; Terpe, 1995; Gross *et al.*, 2001; Munchar *et al.*, 2003).

Das Intermediärfilament Nestin ist ein neuroepithelialer Stammzellmarker und eine erhöhte Nestinexpression ist bei einigen Tumoren wie auch beim Neuroblastom mit der Malignität assoziiert (Ehrmann *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2004).

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Zelllinien**

Es wurden sieben verschiedene humane Neuroblastomzelllinien getestet: Kelly, LS, SH-SY5Y, SK-N-SH, IMR-32, LAN-1 und LAN-5. Die Zelllinien Kelly, LAN-1, LAN5, SK-N-SH und IMR-32 wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Erttmann (Abteilung für Pädiatrische Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Deutschland) zur Verfügung gestellt; die Linien LS und SH-Y5Y erhielten wir von Herrn Prof. Dr. Hildebrandt (Abteilung Zelluläre Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland).

#### **3.2. Zellkultur**

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in 50 ml Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen (37° C, 100% relative Luftfeuchtigkeit, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luft). Als Nährmedium wurde RPMI Medium (Gibco/Life Technologies, Paisley, Schottland) verwendet, welches zusätzlich mit 10% hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS, Gibco®), 2 mM L-Glutamin (Gibco®), sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco®) versetzt wurde. Dieses Medium wird im Weiteren als Kulturmedium bezeichnet. Je nach Wachstum der Zelllinien wurde das Medium zwei bis drei mal pro Woche gewechselt. Wenn die Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie passagiert. Hierzu wurde das alte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml 0.1 M Kochsalz-Phosphat Puffer (PBS, pH 7.4) gespült, anschließend für fünf Minuten mit je 5 ml Trypsin-EDTA (Gibco®) versetzt und darauf folgend ca. fünf Minuten bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Flaschenboden, erfolgte die Zugabe von 5 ml Kulturmedium, um das Trypsin zu inaktivieren und so eine Schädigung der Zellen durch das Trypsin-EDTA zu verhindern. Die Zellsuspension wurde anschließend fünf Minuten bei 1500 U/Min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Abschließend wurden die Zellen mit Kulturmedium resuspendiert, auf neue Zellkulturflaschen verteilt oder für die Tierexperimente verwendet.

Für die Einbettung in Paraffin wurden die Zellen mit einem Zellschaber (TPP, Trasadingen, Schweiz) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, fünf Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert, mehrfach mit 0.1 M PBS gewaschen und in 4% Paraformaldehyd für 24 Stunden bei 4 °C fixiert. Die Zellen wurden erneut in PBS gewaschen und zentri-

fugiert; dann wurde das Zellpellet in 2% Agar (Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgeschwemmt. Die Zellen wurden herunterzentrifugiert und die festgewordenen Agarblöcke mit dem Zellpellet wurden routinemäßig für die Paraffineinbettung weiter verarbeitet.

Vor der Injektion der Zellen in die Versuchstiere wurden alle Zelllinien auf eine Infektion mit Mykoplasmen überprüft. Dazu wurde das VenorGeM®-Mykoplasmen-Detektionskit eingesetzt, welches auf einer Polymerase-Kettenreaktion basiert und für den Nachweis aller Mykoplasmenpezies geeignet ist, die typischerweise in der Zellkultur auftreten können. Der Test wurde entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei keine der untersuchten Zelllinien eine Kontamination mit Mykoplasmen zeigte.

### **3.3. Übertragung der Tumorzellen auf die Versuchstiere**

Aus in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellpools wurden je zwei Aliquots der sieben Zelllinien aufgetaut und mindestens zwei Wochen lang kultiviert. Für die Injektion in die scid Mäuse wurden die Zellen trypsinisiert und die Zellzahl pro ml wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl wurde dann auf  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Dabei wurden für jede Zelllinie zwei Ansätze hergestellt; einerseits wurden die Zellen in Kulturmedium andererseits in Matrigel® (BD Biosciences, Bedford, USA) entsprechend der Herstellerbeschreibung auf Eis bei 2 bis 8 °C resuspendiert. Jedem Tier wurden 200 µl einer dieser Zellsuspensionen ( $1 \times 10^6$  Zellen) subcutan zwischen die Schulterblätter injiziert. Es wurden pathogen-freie severe combined immunodeficient (scid)-Mäuse verwendet, die am Anfang der Versuche ca. 10 Wochen alt waren und 20 bis 25 g wogen. Jede Zelllinie wurde in zwei Gruppen (mit und ohne Matrigel) aus jeweils 9 bis 11 Tieren injiziert, LS wurde nur auf 5 Tiere pro Gruppe transplantiert. Die Tierversuche waren vorher von der BSG genehmigt worden, und die entsprechenden Richtlinien zur Versuchstierhaltung wurden eingehalten (Versuchstiergenehmigungsnummer 56/03). Die Tiere wurden in Filter-Top Käfigen gehalten und mit sterilem Wasser und sterilem Standard-Einstreufutter (sniff M-Z Alleindiät extrudiert, sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) ad libitum versorgt. Nachdem die Tumore eine ausreichende Größe (10% des Körpergewichts der Maus, ca. 2,5 g) erreicht hatten oder anfangen zu ulzerieren, wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Danach wurden die Neuroblastom-Primärtumore und die Lungen zügig herauspräpariert. Die

Primärtumore wurden gewogen, zum Teil aufgrund ihrer Größe geteilt und in beschriftete Gitterkörbchen überführt. Zur späteren Einbettung in Paraffin nach einem automatisierten Standardverfahren, wurden sie in 4% gepuffertem Formalin für 48 Stunden fixiert.

Die Lungen wurden en bloc in 4% gepuffertem Formalin für 48 Stunden fixiert und anschließend unter einem Stereo-Mikroskop in 1 mm dicke Scheiben geschnitten (Jojovic *et al.*, 2000). Die Lungenschnitte wurden zufällig über einen Objektträger verteilt, in 4%igem Agar eingelegt und mit einem Deckgläschen zusammengedrückt. Dieser Block wurde dann, wie zuvor beschrieben, in Paraffin eingebettet.

### **3.4. Anfertigen von Paraffinschnitten**

Von den in Paraffin eingebetteten Primärtumoren und Lungen wurden mit einem Mikrotom 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Bei den Primärtumoren wurden je 20 Schnitte angefertigt; die Lungen wurden ganz in Serie aufgeschnitten, wobei nur jeder zehnte Schnitt im Abstand von 50 µm zur Auszählung der Metastasen verwendet wurde. Aus der Mitte der Lungenblöcke wurden außerdem 30 Schnitte für die Immunhistologie angefertigt. Die Paraffinschnitte wurden in ein Wärmebad überführt, auf einen beschichteten Objektträger (Histo Bond, Marienfeld, Deutschland) aufgenommen, 24 Stunden im Wärmeschrank bei 37° C getrocknet und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die Schnitte wurden getrocknet, in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe für die folgenden Färbungen rehydriert.

### **3.5. Immunhistochemie**

Die folgenden monoklonalen Antikörper (mAk) wurden angewendet: Maus anti-Human mitochondrialer Antikörper (Chemicon, Hampshire, UK) 1:50 verdünnt in TBS (Kochsalz-TRIS-Puffer), Maus anti-Human Nestin Antikörper (Chemicon, Hampshire, UK) 1:200 verdünnt in 1% bovinem Serumalbumin (BSA) in TBS und Maus anti-Human CD44 Antikörper (BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA) 1:25 verdünnt in antibody diluent (Dako, Glostrup, Denmark).

Nach der Entparaffinierung hing die weitere Vorbehandlung vom jeweiligen Antikörper ab. Bei der Färbung mit dem antimitchondrialen Antikörper wurden die Schnitte mit Protease vorbehandelt. Dazu wurden die Schnitte dreimal für fünf Minuten in TBS ge-

spült und anschließend mit 0.06 mg Protease XXIV (Sigma, Steinheim, Deutschland) gelöst in 100 ml TBS für sieben Minuten im Wasserbad bei 37 °C angedaut. Die Reaktion wurde durch Spülen mit 4° C kaltem TBS dreimal für fünf Minuten gestoppt und dann wurden die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Methanol/3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Hemmung der endogenen Peroxidase inkubiert. Bei der Färbung mit anti-CD44 erfolgte eine Vorbehandlung der Schnitte in der Mikrowelle. Dazu wurden die Schnitte in EDTA-Puffer (pH 8.0) in der Mikrowelle für fünf mal zwei Minuten bei 500 Watt hitzebehandelt. Danach wurden die Schnitte 20 Minuten lang abgekühlt. Dazu wurde schrittweise kalter EDTA-Puffer hinzugegeben, bis die Lösung Raumtemperatur erreicht hatte. Nach dreimaligem Waschen in TBS wurden die Objektträger für drei Minuten mit 30% Essigsäure in Methanol inkubiert, um die endogene alkalische Phosphatase zu hemmen (Brittan *et al.*, 2002). Der anti-Nestin Antikörper wurde ohne weitere Vorbehandlung verwendet.

Bei allen Antikörpern wurden nun die Schnitte mit TBS gewaschen und mit 10% normalem Kaninchen Serum (DAKO, Hamburg, Deutschland) für 30 Minuten bei Raumtemperatur präinkubiert. Nachfolgend wurden die Objektträger für 24 Stunden bei 4° C mit dem primären Antikörper inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal in TBS gespült und dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden biotinylierten 1:200 verdünnten sekundären Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Danach erfolgte eine dreimalige Spülung mit TBS und anschließend die Inkubation für 30 Minuten mit einem Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Komplex (anti-Nestin, anti-CD44) oder einem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (anti-mitochondrial) (beide Vector Laboratories, Burlingame, USA). Die Präparate wurden wiederum dreimal fünf Minuten in Trispuffer gespült. Anschließend erfolgte die Farbreaktion. Die Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase wurde durch eine Reaktion von Naphthol-AS-bisphosphat als Substrat und dem hexazotierten Neufuchsin für eine simultane Kopplung nachgewiesen. Dazu wurden 7,5 ml einer 4%igen Natriumnitritlösung mit 300 µl Neufuchsin-Stammlösung (5 g Neufuchsin gelöst in 100 ml 2 M HCL) vermischt. Dann wurden sofort 30 mg Naphthol-AS-bisphosphat in 750 µl Dimethylformamid gelöst und als Substrat für die alkalische Phosphatase hinzugegeben. Abschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Tween 20. Zur Hemmung der endogenen alkalischen Phosphatase wurden 200 µl Levamisol hinzugegeben. Die Enzymreaktion der Meerrettich-Peroxidase wurde durch die Inkubation mit 0.5 mg/ml Diaminobenzidin (Sigma, St. Louis, USA), 0.4 mg/ml Ammoniumchlorid (Sigma), 600 µl 0.05 mol Ni-



ckelsulfat, 600 µl 10% β-D-Glucose (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 100 µl 1.2 mg/ml Glucoseoxidase in 30 ml Aqua dest. für 20 Minuten sichtbar gemacht (Zaborszky und Leranthy, 1985).

Nach jeweils 20 minütiger Inkubation im Dunkeln wurden dann die Reaktionen durch fließendes Leitungswasser über eine Zeit von zehn Minuten gestoppt. Die Schnitte wurden dann in 50% Mayers Hämalaun 10 Sekunden gegengefärbt und anschließend 10 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser gebläut und mit Aqua dest. gespült. Abschließend wurden die Objektträger mit Crystal/Mount und Clarion (Biomedica, Foster City, USA) eingedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Spezifität der Immunhistochemie wurde durch Kontrollen geprüft, bei denen der primäre Antikörper weggelassen wurde. Keine der Kontrollen zeigte eine Immunreaktion.

Die immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden unter einem Axioplan Fotomikroskop (Zeiss, Oberkochen) ausgewertet und fotografiert.

Bei der Auswertung der Immunhistologie mit Nestin und CD44 wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen im Präparat abgeschätzt. Dabei wurden nekrotische Areale nicht berücksichtigt. Entsprechend dieses prozentualen Anteils wurden die Tumoren und Metastasen in drei Gruppen eingeteilt: <5% wurde als negativ gewertet; 5-20% als schwach positiv und >20% als positiv.

### **3.6. Hämatoxylin-Eosin Färbung und Auswertung der Lungenschnitte**

Die Anzahl der Metastasen in den Lungenpräparaten wurde an HE-gefärbten Schnitten bestimmt. Die HE-Färbung wurde in einem Färbeautomaten (Varistain, Shandon, Frankfurt, Deutschland) nach einem Standardprotokoll durchgeführt.

Die HE-gefärbten Lungenschnitte wurden lichtmikroskopisch bei 100-facher Vergrößerung betrachtet und die Anzahl der Lungenmetastasen ausgezählt und protokolliert. Die Metastasenzählung wurde nach einem vereinfachten Verfahren durchgeführt (Jojovic und Schumacher, 2000). Dabei wurden von den angefertigten Lungenschnitten 10 Schnitte im Abstand von 50 µm aus der Mitte des Lungenblocks unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Aus der Gesamtzahl der ausgezählten Metastasen in diesen Schnitten wurde der Mittelwert für die Anzahl der Metastasen pro Schnitt gebildet und dieser mit

der Gesamtzahl der Lungenschnitte multipliziert. Von diesem Wert wurden 20% subtrahiert um die Anzahl der Metastasen in der gesamten Lunge zu berechnen.

### **3.7. Statistische Auswertung**

Mittels einer Pearson`s Rank Korrelation (RKO) wurde für die Zelllinien IMR-32, Kelly und SK-N-SH untersucht, ob es eine Korrelation zwischen dem Gewicht des Primärtumors und der Anzahl der Lungenmetastasen gab.

Die Entwicklung von Primärtumoren bzw. Lungenmetastasen mit und ohne Matrigel-Koinjektion wurde mit dem exakten Fisher-Test verglichen.

Mit dem ungepaarten t-Test wurde bei den Zelllinien IMR-32, Kelly und SK-N-SH nachgeprüft, ob ein Unterschied bzgl. der Anzahl der Lungenmetastasen zwischen der Injektion mit und ohne Matrigel bestand.

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm Graph Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde ein Wert von  $P < 0.05$  angesehen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Übersicht

Die Neuroblastomzellen aller in dieser Arbeit getesteten Zelllinien sind in den scid Mäusen angewachsen, wobei das Wachstums- und Metastasierungsverhalten aber deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien aufwies. Auch innerhalb einer Zelllinie ergaben sich Differenzen bezüglich der Anwachs- und Metastasierungsrate in Abhängigkeit von der Injektion mit oder ohne Matrigel (zusammenfassend s. Tabelle 3). Dabei zeigten die Zelllinien LAN-1, LAN-5 und LS eine erhöhte Tumoranwachsrate, Kelly und SK-N-SH eine erhöhte Metastasierungsrate unter Matrigel Koinjektion.

Bei den Zelllinien IMR-32, Kelly und SK-N-SH lagen die Lungenmetastasen überwiegend intra- bzw. perivaskulär, ließen sich deutlich vom umgebenden Lungengewebe abgrenzen und konnten ausgezählt werden (Abb. 2b, 3b, 4b). Bei LAN-1 und LAN-5 waren einige bis zahlreiche Mikrometastasen und Einzelzellmetastasen nachweisbar, die diffus in den Alveolarsepten verteilt waren und nicht quantifiziert werden konnten (Abb. 5b, 6, 7b, 8). Der metastatische Ursprung dieser Zellen wurde immunhistochemisch mit einem Maus anti-human mitochondrialen Antikörper verifiziert (Abb. 6, 8). Generell wiesen die malignen Zellen eine verschobene Kern-Plasma-Relation auf mit atypischen (polymorphen und polyzyklischen) Zellkernen, prominenten Nukleoli (2 bis 4 Stück) und Mitosen.

| <b>Zelllinie</b> | <b>Anwachs-<br/>rate</b> | <b>Tumor-<br/>gewicht [g]</b> | <b>Wachstums-<br/>dauer [d]</b> | <b>Metasta-<br/>sierung</b> | <b>Anzahl der<br/>Metastasen</b> |
|------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| <b>IMR-32</b>    | 9/10 (90%)               | 3.58                          | 34.4                            | 4/9 (56%)                   | 190-371 (312)                    |
| <b>IMR-32+M</b>  | 9/9 (100%)               | 2.43                          | 22                              | 9/9 (100%)                  | 84-770 (333)                     |
| <b>Kelly</b>     | 8/10 (80%)               | 1.13                          | 20                              | 3/8 (38%)                   | 28-346 (152)                     |
| <b>Kelly+M</b>   | 8/10 (80%)               | 1.25                          | 16.25                           | 5/8 (71%)                   | 61-7357 (1655)                   |
| <b>SK-N-SH</b>   | 9/9 (100%)               | 1.51                          | 26.2                            | 6/8 (75%)                   | 194-5844 (1684)                  |
| <b>SK-N-SH+M</b> | 9/11 (82%)               | 2.09                          | 28.2                            | 8/9 (89%)                   | 45-21885 (4282)                  |
| <b>LAN-1</b>     | 4/11 (36%)               | 2.9                           | 54.5                            | 3/4 (75%)                   | Mikrometastasen                  |
| <b>LAN-1+M</b>   | 9/9 (100%)               | 2.45                          | 27.6                            | 7/9 (78%)                   | Mikrometastasen                  |
| <b>LAN-5</b>     | 3/9 (22%)                | 4.85                          | 42                              | 3/3 (100%)                  | Mikrometastasen                  |
| <b>LAN-5+M</b>   | 7/9 (78%)                | 1.8                           | 27.6                            | 6/7 (86%)                   | Mikrometastasen                  |
| <b>LS</b>        | 1/5 (20%)                | 3                             | 44                              | 0/1 (0%)                    | 0                                |
| <b>LS+M</b>      | 4/5 (80%)                | 1.83                          | 45.3                            | 0/4 (0%)                    | 0                                |
| <b>SH-SY5Y</b>   | 0/10 (0%)                |                               |                                 |                             |                                  |
| <b>SH-SY5Y+M</b> | 1/10 (10%)               | 1.7                           | 73                              | 0/1 (0%)                    | 0                                |

**Tabelle 3** Ergebnisse der Xenotransplantation von humanen Neuroblastomzellen auf scid Mäuse. Alle untersuchten Neuroblastomzellen entwickelten in den scid Mäusen Tumore allerdings mit deutlich unterschiedlichem Wachstums- und Metastasierungsverhalten. Matrigel Koinjektion führte bei den Zelllinien LAN-1, LAN-5 und LS zu einem verbesserten Tumorgewicht und erhöhte bei Kelly und SK-N-SH die Anzahl der Tiere, die Lungenmetastasen entwickelten. Dargestellt sind die Mittelwerte für das Tumorgewicht und die Wachstumsdauer. Die Werte für die Anzahl der Metastasen zeigen Minimum und Maximum sowie den Mittelwert in Klammern. M=Matrigel.

Das Ergebnis der Immunhistochemie mit Nestin und CD44 war unabhängig von der Injektion mit oder ohne Matrigel. Die Färbeintensität zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Tumoren und Metastasen der verschiedenen Zelllinien (Tabelle 4 und 5). Innerhalb einer Zelllinie war die Immunreaktion mit anti-CD44 ähnlich und zeigte keine interindividuellen Schwankungen (Tabelle 4). Die Immunhistochemie mit anti-Nestin hingegen wies bei den Zelllinien Kelly und IMR-32 unterschiedliche Ergebnisse zwischen in den scid Mäusen gewachsenen Tumoren der gleichen Zelllinie auf (Tabelle 5). So waren 43% der in vivo gewachsenen IMR-32 Tumoren Nestin positiv und 57% schwach positiv. Bei den Kelly Tumoren zeigten 19% der Primärtumore eine schwache Nestinexpression, 81% waren negativ.

| <b>Zelllinie</b> | <b>Primärtumor</b> | <b>Lungenmetastase</b> | <b>Zellen in Paraffin</b> |
|------------------|--------------------|------------------------|---------------------------|
| <b>IMR-32</b>    | positiv            | positiv                | positiv                   |
| <b>Kelly</b>     | positiv            | positiv                | positiv                   |
| <b>SK-N-SH</b>   | positiv            | positiv                | positiv                   |
| <b>LAN-1</b>     | negativ            | negativ                | negativ                   |
| <b>LAN-5</b>     | negativ            | negativ                | negativ                   |
| <b>LS</b>        | negativ            | keine Daten            | positiv                   |
| <b>SH-SY5Y</b>   | negativ            | keine Daten            | negativ                   |

**Tabelle 4** Immunhistochemische Reaktion von Zellen in Paraffin, Primärtumoren und Lungenmetastasen der humanen Neuroblastomzellen mit dem anti-CD44 und dem anti-Nestin Antikörper. Entsprechend des prozentualen Anteils der positiven Zellen erfolgte eine Einteilung in 3 Gruppen: <5% negativ, 5-20% schwach positiv, >20% positiv. Die CD44 Immunreaktivität innerhalb einer Gruppe ist homogen.

| <b>Zelllinie</b> | <b>Primärtumor</b>                   | <b>Lungenmetastase</b> | <b>Zellen in Paraffin</b> |
|------------------|--------------------------------------|------------------------|---------------------------|
| <b>IMR-32</b>    | 8/17 positiv<br>9/17 schwach positiv | positiv                | positiv                   |
| <b>Kelly</b>     | 3/16 schwach positiv<br>3/16 negativ | negativ                | schwach positiv           |
| <b>SK-N-SH</b>   | negativ                              | negativ                | negativ                   |
| <b>LAN-1</b>     | negativ                              | negativ                | negativ                   |
| <b>LAN-5</b>     | negativ                              | negativ                | negativ                   |
| <b>LS</b>        | negativ                              | positiv                | negativ                   |
| <b>SH-SY5Y</b>   | negativ                              | keine Daten            | negativ                   |

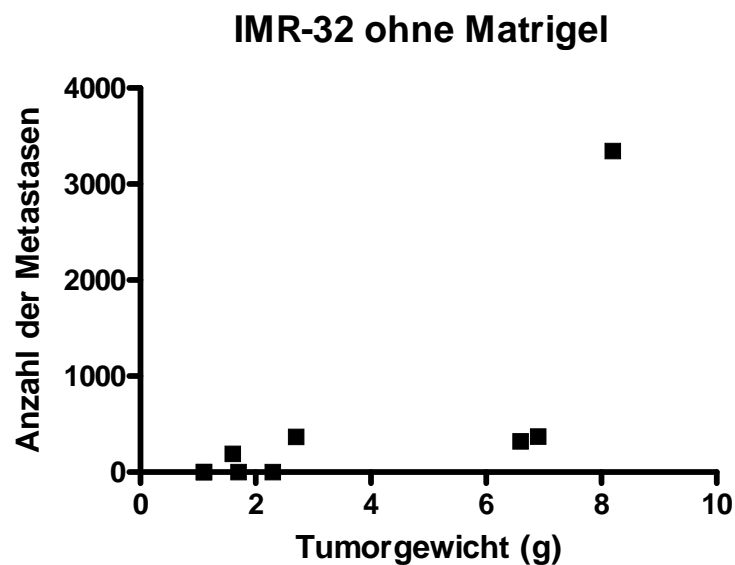
**Tabelle 5** Immunhistochemische Reaktion von Zellen in Paraffin, Primärtumoren und Lungenmetastasen der humanen Neuroblastomzellen mit dem anti-Nestin Antikörper. Entsprechend des prozentualen Anteils der positiven Zellen erfolgte eine Einteilung in 3 Gruppen: <5% negativ, 5-20% schwach positiv, >20% positiv. Im Gegensatz zu CD44 weist die Nestin Immunreaktivität interindividuelle Unterschiede innerhalb einer Zelllinie auf (vergleiche Tabelle 4).

## 4.2. Die Ergebnisse der Zelllinien im Einzelnen

### 4.2.1. Die Zelllinie IMR-32

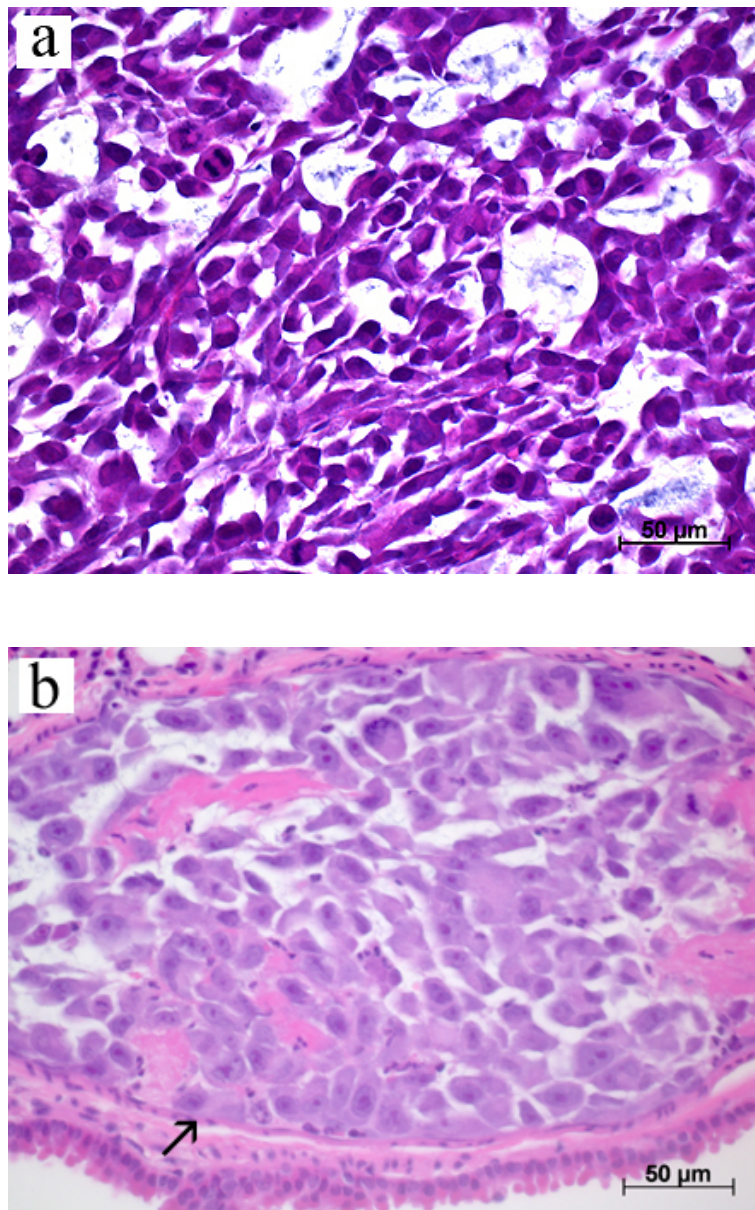
Das Tumorstadium der Zelllinie IMR-32 dauerte maximal 36 Tage ohne Matrigel bei einer Anwachsrate von 90% und 22 Tage mit Matrigel bei 100% Anwachsrate. Das durchschnittliche Tumorgewicht lag bei 3.58 g ohne Matrigel und bei 2.43 g mit Matrigel. Die Metastasierungsrate lag ohne Matrigel bei 56% und verdoppelte sich bei der Injektion mit Matrigel signifikant auf 100% ( $P < 0.05$ ), wobei die durchschnittliche Anzahl der Metastasen mit 312 bzw. 333 ähnlich war (n.s.).

Für die IMR-32 Tumoren ohne Matrigel ergab sich eine schwach signifikante ( $P = 0.036$ ) Korrelation zwischen dem Tumorgewicht und der Anzahl der Metastasen (Pearson  $r = 0.7$ ), für die Tumoren mit Matrigel nicht.



**Abbildung 1** Korrelation zwischen Tumorgewicht und Anzahl der Metastasen (IMR-32 ohne Matrigel). Nur in dieser Gruppe konnte eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden (Pearson  $r = 0.7$ ;  $P = 0.036$ ).

Die Primärtumoren und Metastasen der Zelllinie IMR-32 bestanden histologisch aus eher spindelförmigen Zellen, die locker innerhalb der extrazellulären Matrix verteilt waren (Abb. 2). Die Primärtumoren zeigten zentral nekrotische Areale und enthielten zahlreiche mitotische und apoptotische Zellen.

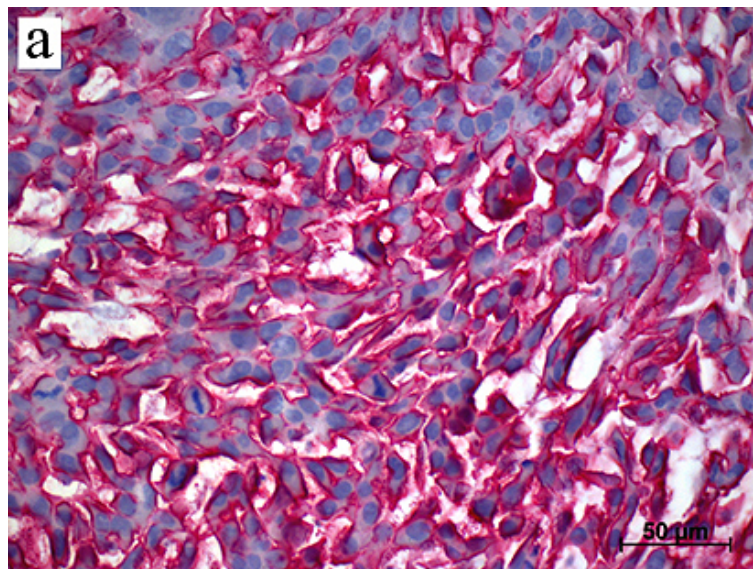


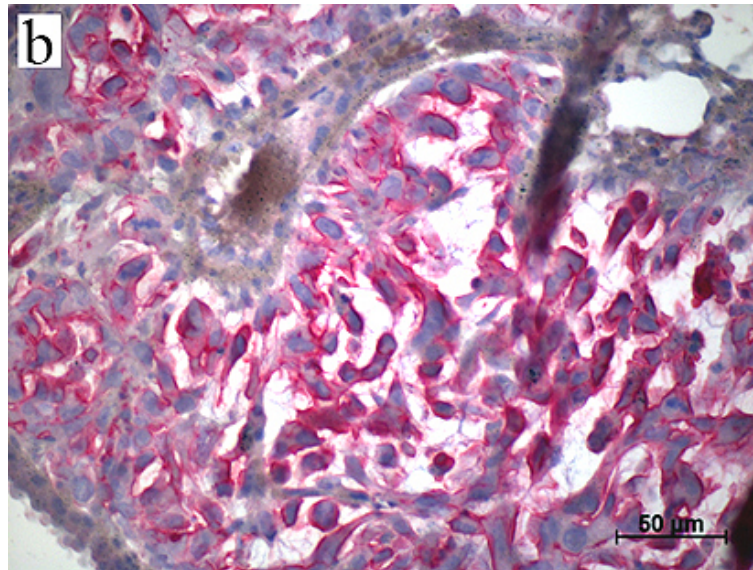
**Abbildung 2** a) Primärtumor und b) intravaskulär gelegene Lungenmetastase der humanen Neuroblastomzelllinie IMR-32 transplantiert in scid Mäuse (HE Färbung). ↗ Wand eines Pulmonalarterienasts



Die Immunreaktion mit anti-Nestin und anti-CD44 war für die Tumoren und Metastasen dieser Zelllinie am stärksten. Das Färbemuster mit Nestin war heterogen, weil die Tumoren sowohl Nestin-positive als auch negative Zellen enthielten. Die positiven Zellen zeigten eine granulierte, zytoplasmatische Färbung und waren in Gruppen angeordnet, die zufällig im Tumor verteilt waren. Alle IMR-32 Primärtumoren enthielten solche Nestin-positiven Areale, neun von siebzehn (53%) Tumoren waren schwach positiv und acht von siebzehn (47%) positiv mit teilweise einem Anteil positiver Zellen, der größer als 50% war. Alle untersuchten Lungenmetastasen waren ebenfalls positiv; Paraffin eingebettete IMR-32 Zellen aus der Zellkultur enthielten ca. 40% immunreaktive Zellen.

Das Färbemuster mit anti-CD44 war gleichfalls heterogen mit positiven und negativen Arealen. Die immunreaktiven Zellen zeigten ein membranständiges, aber kein zytoplasmatisches Signal und waren häufig in der peripheren, expandierenden Zone des Tumors lokalisiert. Sowohl die Primärtumoren als auch die Lungenmetastasen und die in der Kultur gewachsenen Zellen waren positiv, wobei der Anteil der gefärbten Zellen durchgehend über 50% lag (Abb. 3). Bei den in Paraffin eingebetteten Zellen reagierten vereinzelt liegende IMR-32 Zellen stärker als Zellcluster.





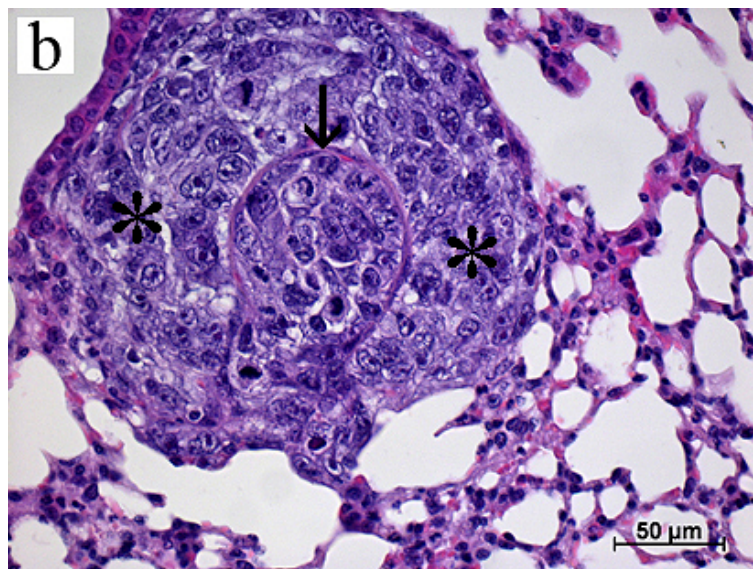
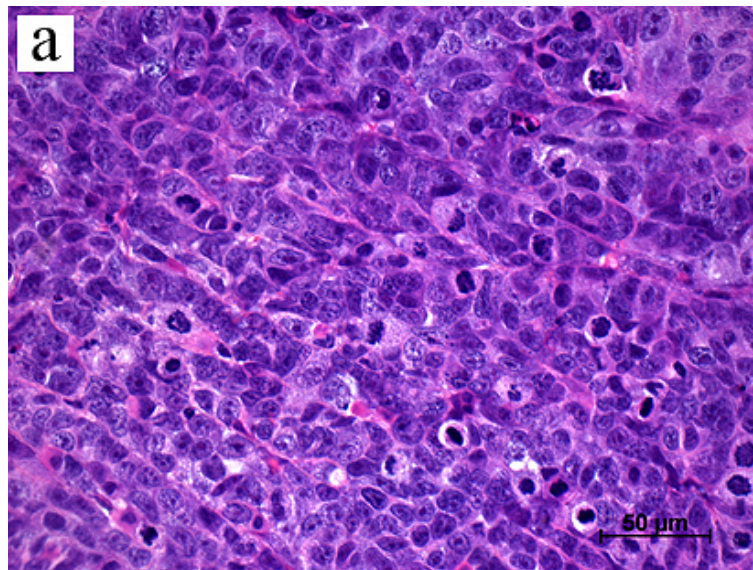
**Abbildung 3** Immunhistochemische Darstellung der CD44 Expression von der humanen Neuroblastomzelllinie IMR-32 im scid Mausmodell. Sowohl der **a)** Primärtumor als auch **b)** die Metastase zeigten eine starke Immunreaktivität mit anti-CD44.

#### **4.2.2. Die Zelllinie Kelly**

Die Zelllinie Kelly zeigte eine Anwachsrate von 80% bei einer Wachstumsdauer von 15 bis 20 Tagen ohne Matrigel und von 20 Tagen mit Matrigel. Das Tumorgewicht lag ohne Matrigel zwischen 0.3 g und 2.5 g, mit Matrigel zwischen 0.5 g und 2.3 g. Die Metastasierungsrate lag mit Matrigel (71%) höher als ohne Matrigel (38%) (n.s.). Die Anzahl der Metastasen reichte von 28 bis 346 ohne Matrigel bzw. von 61 bis 7357 mit Matrigel und zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Es bestand keine Korrelation zwischen dem Tumorgewicht und der Anzahl der Metastasen.

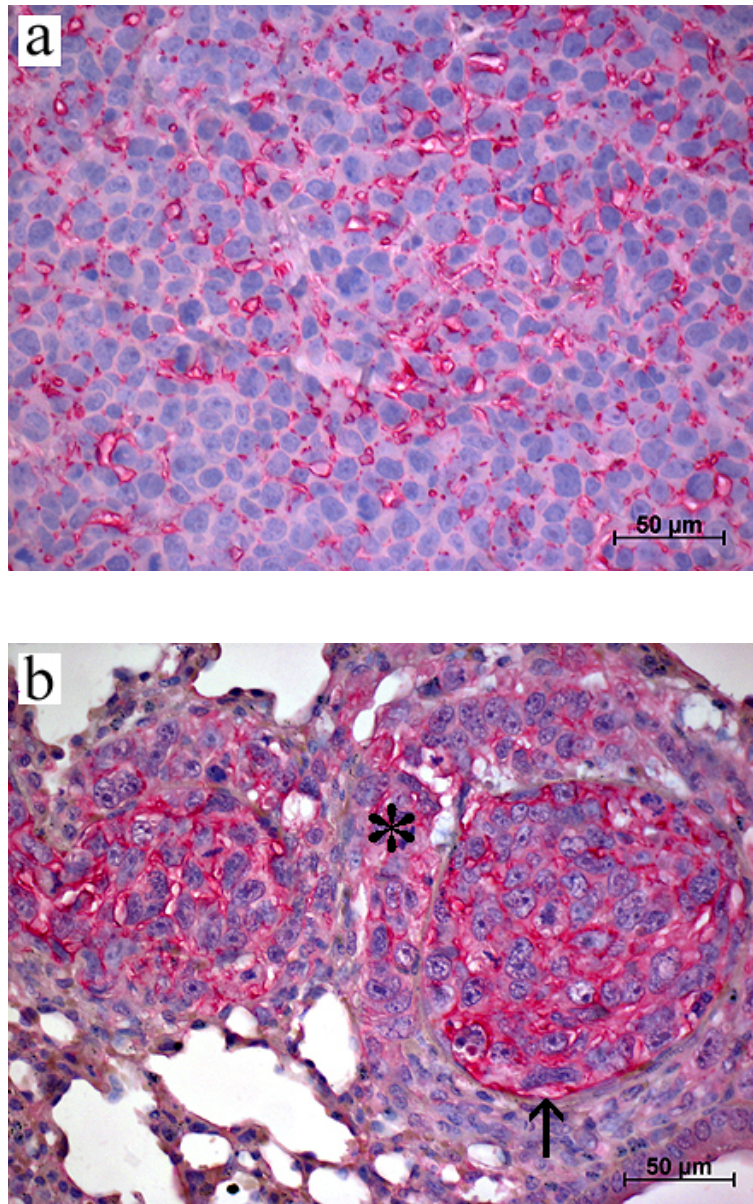
Histologisch stellten sich die in scid Mäusen gewachsenen Kelly Zellen als runde, undifferenzierte und überwiegend dicht gepackte Zellen (Abb. 4). Die Primärtumoren enthielten wenig Stroma, viele Mitosen und im Zentrum nekrotische Bereiche. In der Peripherie waren die Zellen teilweise lockerer angeordnet mit mehr extrazellulärer Matrix.



**Abbildung 4 a)** Primärtumor und **b)** intra- und perivaskulär gelegene Lungenmetastase der humanen Neuroblastomzelllinie Kelly transplantiert in scid Mäuse (HE Färbung). ↓ Wand eines Pulmonalarterienasts. \* periarteriolarer Raum.

Das Färbemuster mit anti-Nestin und anti-CD44 war entsprechend der Beschreibung für IMR-32. Die Immunreaktivität mit dem anti-Nestin Antikörper war eher gering. Dreizehn von sechszehn (81%) der Tumoren waren negativ mit <5% positiven Zellen und drei von sechszehn (19%) Tumoren waren schwach positiv (5-20% positive Zellen). In den Lungenmetastasen waren nur vereinzelt Nestin-positive Zellen nachzuweisen. 20% der Kelly Zellen in Paraffin reagierten mit anti-Nestin.

Die Kelly Primärtumoren und Lungenmetastasen waren positiv für CD44 und enthielten jeweils mindestens 20% immunreaktive Zellen (Abb. 5). Annähernd 100% der in der Kultur gewachsenen Kelly Zellen waren CD44-positiv.



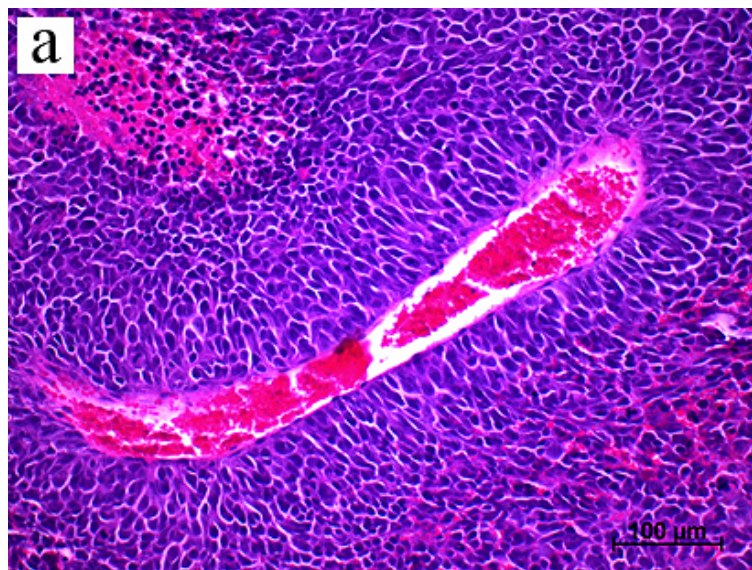
**Abbildung 5** Immunhistochemische Darstellung der CD44 Expression von der humanen Neuroblastomzelllinie Kelly im scid Mausmodell. Sowohl der a) Primärtumor als auch b) die intra- und periarteriell gelegene Lungenmetastase zeigten eine Immunreaktivität mit anti-CD44. ↑ Wand eines Pulmonalarterienasts. \* periarteriolenärer Raum.

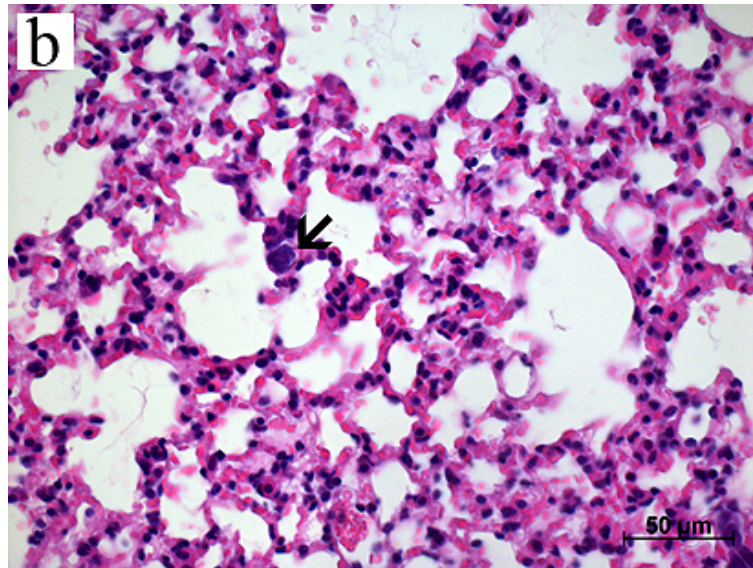
#### 4.2.3. Die Zelllinie LAN-1

Die Zelllinie LAN-1 zeigte mit Matrigel eine signifikant höhere Anwachsrate (100%) als ohne Matrigel (36%)( $P < 0.01$ ). Die Tumore wuchsen zwischen 24 und 36 Tagen mit Matrigel und zwischen 37 und 65 Tagen ohne Matrigel. Das Tumorgewicht reichte von 0.6 g bis 7.2 g mit Matrigel und von 2.6 g bis 3.5 g ohne Matrigel. Die Lungen zeigten in 78% bzw. 75% Einzelzell- und Mikrometastasen, die diffus in der Lunge verteilt waren und nicht eindeutig ausgezählt werden konnten. Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen den Tieren bezüglich der Häufigkeit dieser Zellen, die nur vereinzelt, aber auch massenhaft in der Lunge vorhanden sein konnten. In der HE-Färbung ließen sich diese Zellen morphologisch vom Lungengewebe der Maus unterscheiden (Abb. 6b). Der metastatische Ursprung dieser Zellen wurde durch ihre Anfärbung mit dem anti-human mitochondrialen Antikörper bestätigt. (Abb. 7).

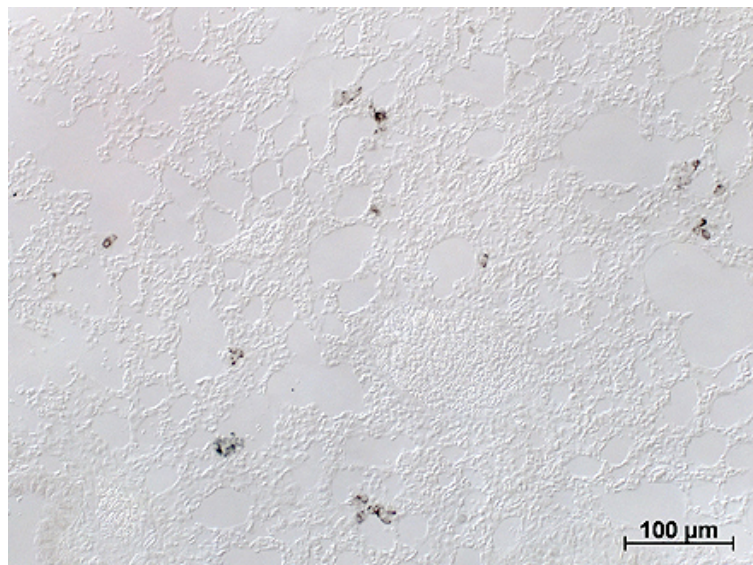
Im Primärtumor stellten sich die Tumorzellen in der HE-Färbung als undifferenzierte, dicht gepackte Zellen dar (Abb. 6a). Die Tumoren enthielten diverse Bindegewebssepten und in diesen Septen zahlreiche erweiterte Blutgefäße; ein Indikator für das große angiogenetische Potential dieser Zelllinie. Alle Tumoren wiesen wiederum Mitosen und nekrotische Areale auf.

Sowohl in vivo als auch in vitro gewachsene LAN-1 Zellen waren für Nestin und für CD44 negativ.





**Abbildung 6 a)** Primärtumor und **b)** im Alveolareseptum lokalisierte Lungeneinzelzellmetastase (↙) der humanen Neuroblastozelllinie LAN-1 transplantiert in scid Mäuse (HE Färbung).



**Abbildung 7** Mikrometastasen der LAN-1 Zellen in der Lunge. Die Immunreaktion mit dem Maus anti-human mitochondrialen Antikörper bestätigte die Abstammung der Zellen aus einer humanen Tumorzelllinie.

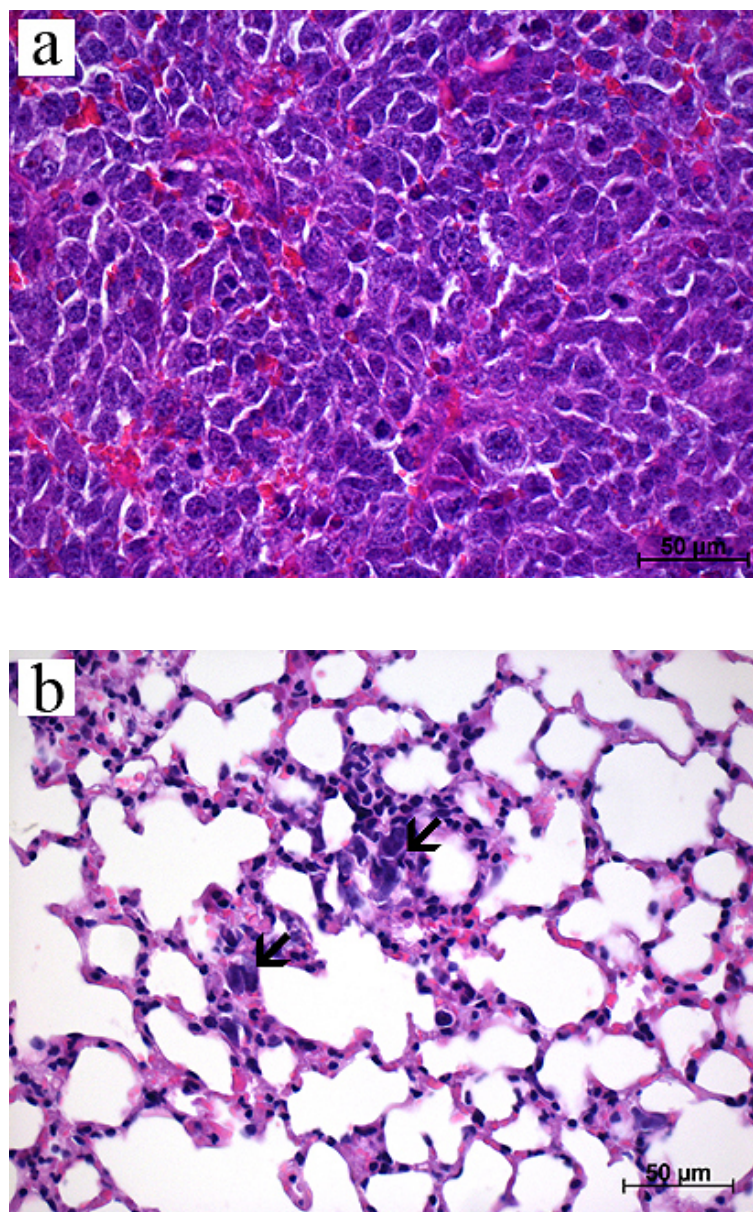
#### 4.2.4. Die Zelllinie LAN-5

Auch die Zelllinie LAN-5 hatte mit Matrigel eine bessere Tumoranwachsrate (78%) als ohne (22%) (n.s.). Das Tumorstadium dauerte 42 bis 50 Tage ohne Matrigel und 24 bis 50 Tage mit Matrigel. Die Tumoren wogen zwischen 1.4 g und 5.3 g ohne Matrigel und zwischen 0.7 g und 3.7 g mit Matrigel. Wie bei LAN-1 konnten in der Lunge mor-

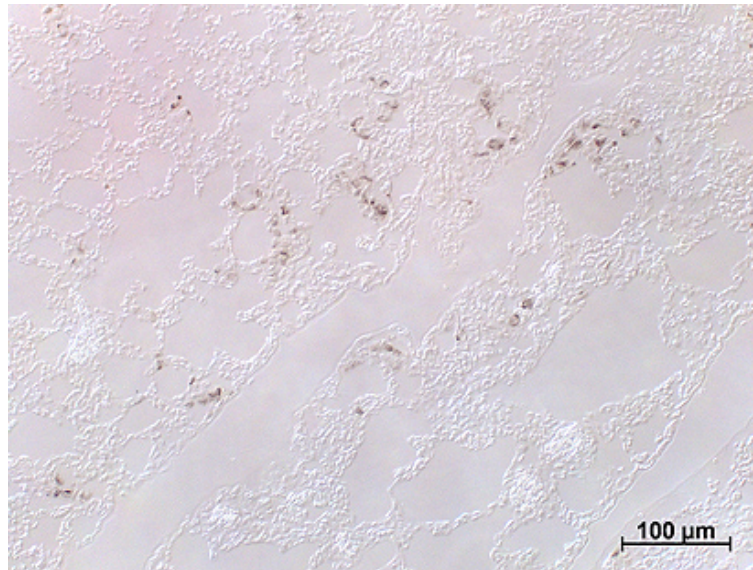
phologisch und immunhistochemisch Einzelzell- und Mikrometastasen in unterschiedlicher Menge nachgewiesen werden (Abb. 8b, 9). Der Anteil an metastasierten Tumoren lag bei 100% ohne Matrigel und bei 85% mit Matrigel (n.s.).

LAN-5 Tumoren bestanden ebenfalls aus undifferenzierten, kompakten Zellen mit vielen Mitosen und nekrotischen Arealen und enthielten Bindegewebssepten mit Blutgefäßen (Abb. 8a).

LAN-5 Zellen zeigten keine Immunreaktivität mit anti-Nestin und anti-CD44.



**Abbildung 8 a)** Primärtumor und **b)** in den Alveolarsepten lokalisierte Lungeneinzelzellmetastasen (↙) der humanen Neuroblastomzelllinie LAN-5 transplantiert in scid Mäuse (HE Färbung).



**Abbildung 9** Mikrometastasen der LAN-5 Zellen in der Lunge. Die Immunreaktion mit dem Maus anti-human mitochondrialen Antikörper bestätigte die Abstammung der Zellen aus einer humanen Tumorzelllinie.

#### **4.2.5. Die Zelllinie LS**

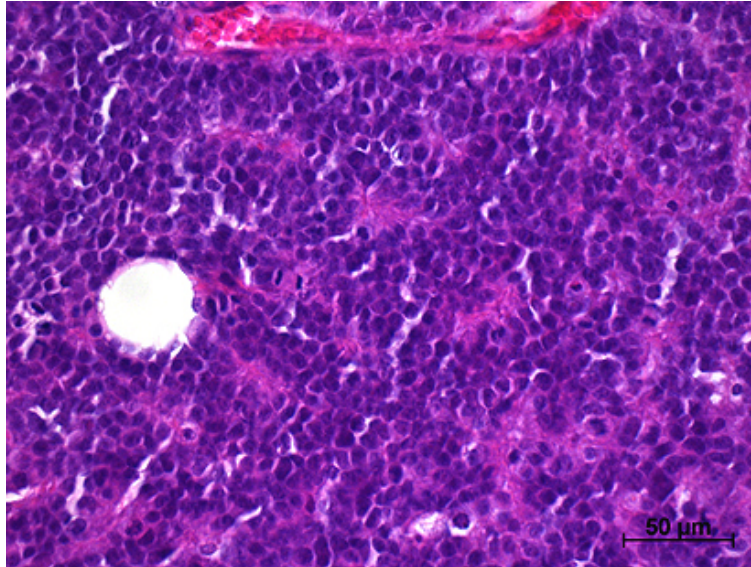
Bei LS erhöhte sich die Tumorrare von 20% auf 80% bei der Injektion mit Matrigel (n.s.). Die Wachstumsdauer lag zwischen 29 und 58 Tagen mit Matrigel, der einzige Tumor, der bei der Injektion ohne Matrigel entstand, wuchs 44 Tage bei einem Gewicht von 3 g. Das Tumorgewicht mit Matrigel erstreckte sich von 1.1 g bis 3.6 g. Keine der Mäuse mit einem LS Primärtumor entwickelte Lungenmetastasen.

Die Tumoren setzten sich aus undifferenzierten, dicht gepackten Zellen zusammen mit wenig Stromaanteil. Teile des Tumors, die häufig inselartig zwischen nekrotischen Arealen lagen, enthielten zahlreiche Blutgefäße mit kreisförmig darum angeordneten Tumorzellen (Abb. 10).

Die Primärtumoren und in vitro gewachsenen Zellen reagierten nicht mit dem anti-Nestin Antikörper.

LS Tumoren waren ebenfalls CD44-negativ, während nahezu 100% der Paraffin eingebetteten LS Zellen eine mäßig intensive Färbung mit anti-CD44 aufwiesen.





**Abbildung 10** Primärtumor der humanen Neuroblastomzelllinie LS transplantiert in scid Mäuse (HE Färbung).

#### 4.2.6. Die Zelllinie SH-SY5Y

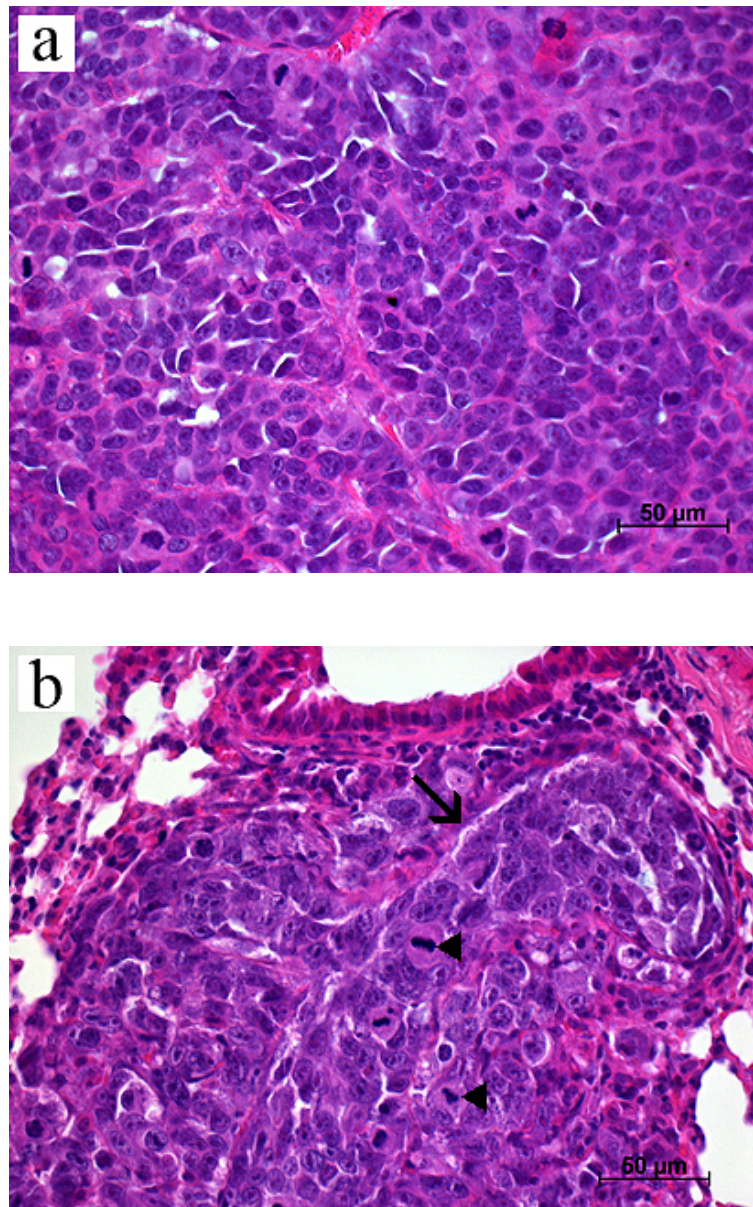
SH-SY5Y Zellen zeigten bei der Injektion ohne Matrigel kein Tumorwachstum. Auch wenn die Zellen mit Matrigel appliziert wurden, wies nur eine von zehn (10%) Mäusen ein Tumorwachstum auf. Bei einem Tumorgewicht von 1.7 g dauerte das Wachstum dieses Tumors 73 Tage. Eine Lungenmetastasierung konnte nicht nachgewiesen werden.

Aufgrund der unzureichenden Anwachsrate wurde diese Zelllinie in unseren Untersuchungen nur eingeschränkt berücksichtigt. Weder SH-SY5Y Zellen in Paraffin noch der Primärtumor reagierten mit dem anti-Nestin und anti-CD44 Antikörper.

#### 4.2.7. Die Zelllinie SK-N-SH

Das Tumorwachstum der SK-N-SH Zellen dauerte ohne Matrigel 20 bis 36 Tage, wobei alle Mäuse (100%) Tumoren entwickelten, mit Matrigel zeigten 82% (9/11) der Mäuse Primärtumoren bei einem Wachstum von 24 bis 43 Tagen (n.s.). Das Tumorgewicht lag zwischen 0.3 g und 2.8. g ohne Matrigel und bei 0.5 g bis 2.9 g mit Matrigel. Sechs von acht (75%; ohne Matrigel) bzw. acht von neun (89%; mit Matrigel) Tieren zeigten Lungenmetastasen. Die Anzahl der Lungenmetastasen erstreckte sich von 194 bis 5844 ohne Matrigel bzw. von 45 bis 21885 mit Matrigel (n.s.). Zwischen dem Gewicht des Primärtumors und der Anzahl der Lungenmetastasen bestand keine Korrelation.

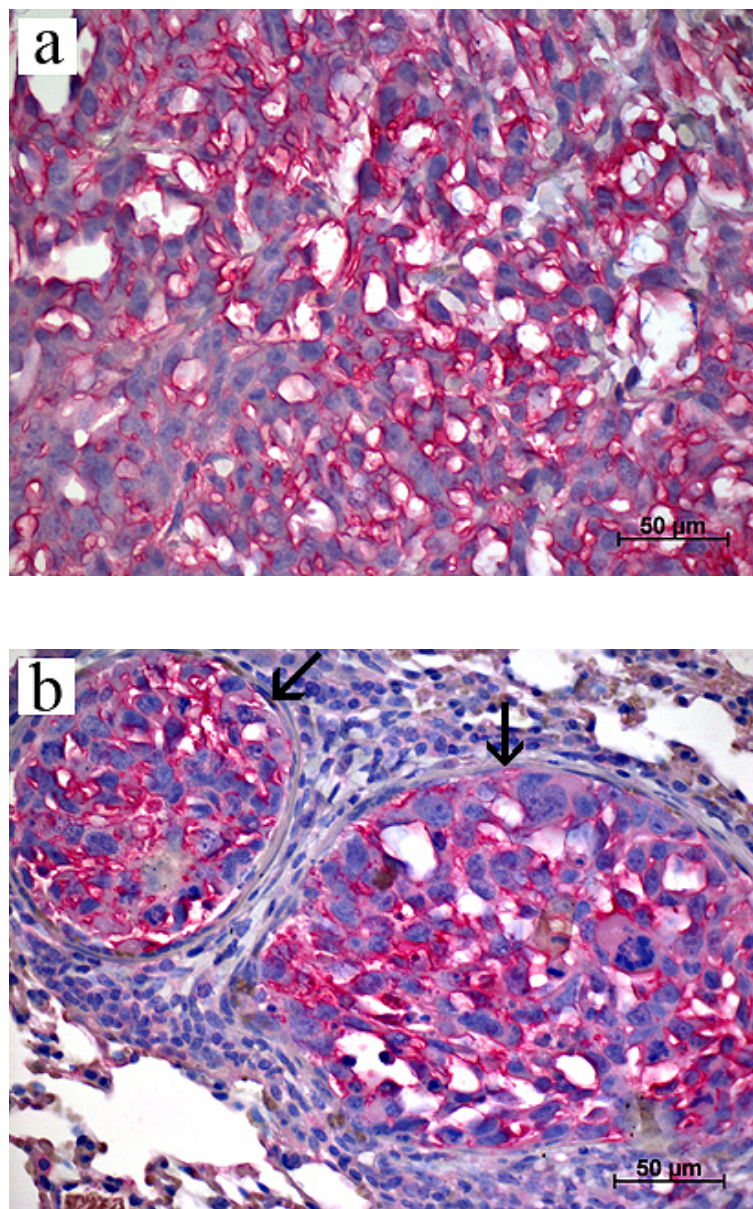
Die Histologie der Tumoren und Metastasen der Zelllinie SK-N-SH war vergleichbar mit der Zelllinie Kelly. Die Tumorzellen präsentierten sich als runde, undifferenzierte, kompakte Zellen und waren bis auf kleine Bereiche in der Peripherie dicht gepackt (Abb. 11a). Die Tumoren enthielten wenig Stroma; in ihrem Zentrum waren ausgeprägte nekrotische Areale zu erkennen.



**Abbildung 11** a) Primärtumor und b) intra- und periarteriell gelegene Lungenmetastase der humanen Neuroblastozelllinie SK-N-SH transplantiert in scid Mäuse (HE Färbung). ↘ Wand eines Pulmonalarterienasts. ◄ Tumorzellen in Mitose

Die Immunhistochemie mit anti-Nestin zeigte nur vereinzelt immunreaktive Zellen sowohl in den SK-N-SH Tumoren, den Metastasen und bei den Zellen in Paraffin und wurde somit als negativ eingestuft.

Das CD44 Färbemuster entsprach dem von IMR-32 und Kelly. Die Primärtumoren und Metastasen waren alle positiv mit >20% CD44 positiven Zellen (Abb. 12); annähernd 100% der Paraffin eingebetteten Zellen waren intensiv gefärbt mit anti-CD44.



**Abbildung 12** Immunhistochemische Darstellung der CD44 Expression von der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-SH im scid Mausmodell. Sowohl der **a)** Primärtumor als auch **b)** die intravaskulär gelegene Metastase zeigten eine Immunreaktivität mit anti-CD44. ↓ Wand eines Pulmonalarterienasts.

## 5. Diskussion

Die Entwicklung von Maus-Xenograft-Modellen, welche die biologische Komplexität bei der Metastasenbildung von humanen Tumoren widerspiegeln, spielt eine bedeutende Rolle in der Tumorforschung. Anhand dieser Modelle können zellbiologische Vorgänge untersucht werden, die das Wachstums- und Metastasierungsverhalten der Tumorzellen *in vivo* beeinflussen. Dabei ist es das Ziel neue therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren und mögliche neue therapeutische Substanzen an den entwickelten Tiermodellen zu überprüfen.

In der vorliegenden Studie sind sieben humane Neuroblastomzelllinien mit und ohne Matrigel in *scid* Mäuse xenotransplantiert worden, um das Wachstums- und Metastasierungsverhalten der Zellen *in vivo* zu untersuchen. Zur weiteren Charakterisierung ist die Expression von Nestin und CD44, beides mögliche prognostische Marker von Neuroblastomen in klinischen Studien, analysiert worden (Favrot *et al.*, 1993; Terpe *et al.*, 1995; Munchar *et al.*, 2003; Riley *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2004).

Die Injektion der humanen Neuroblastomzellen ist subkutan zwischen die Schulterblätter der *scid* Mäuse erfolgt. Bei dieser Vorgehensweise müssen die injizierten Tumorzellen jeden Schritt der komplexen metastatischen Kaskade durchlaufen um in andere Organe einwandern zu können. Xenograft Modelle, in denen die Tumorzellen in die Schwanzvene injiziert werden (Gottstein *et al.*, 1994; Bogenmann, 1996; Thompson *et al.*, 2000), rufen zwar ebenfalls disseminierte Tumorerkrankungen hervor, aber die Tumorzellen müssen dabei nicht aus dem Primärtumor in die Blutgefäße auswandern, um Metastasen zu bilden. Somit entsprechen diese Modellansätze nicht vollständig der klinischen Situation und sind nur begrenzt geeignet für die Untersuchung der metastatischen Kaskade.

Alle sieben Neuroblastomzelllinien dieser Studie haben Primärtumoren in den *scid* Mäusen entwickelt. Die Anwachs- und Metastasierungsraten zwischen den einzelnen Zelllinien haben jedoch deutlich variiert und wurden innerhalb einer Zelllinie auch von der Koinjektion von Matrigel beeinflusst. SK-N-SH, Kelly und IMR-32 Zellen zeigten die höchsten Anwachsrate mit Werten zwischen 80% und 100% unabhängig von einer Koinjektion von Matrigel. LAN-1 (36%), LAN-5 (33%), LS (20%) und SH-SY5Y (0%) Zellen hatten unbefriedigende Anwachsrate ohne Matrigel, die sich durch die Koinjektion von Matrigel bei LAN-5 (78%) und LS (100%) verbessert haben (n.s.) sowie bei LAN-1 signifikant auf 100% angestiegen sind ( $P < 0.01$ ). Nur eine von 10 Mäusen, die

mit SH-SY5Y Zellen in Matrigel beimpft wurden, zeigte ein Tumorwachstum. Daher wurde diese Zelllinie bei den weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Die Metastasierungsrate der Zelllinien LAN-1, LAN-5 und SK-N-SH war unabhängig von einer Matrigel Koinjektion. Dagegen ist die Metastasierungsrate der IMR-32 Zellen signifikant angestiegen durch die Matrigel Koinjektion ( $P < 0.05$ ). Auch bei der Zelllinie Kelly haben unter Matrigel Koinjektion mehr Tiere Metastasen entwickelt (n.s.). Matrigel besteht aus einem Extrakt von Membranproteinen wie Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat und Entactin und sein fördernder Einfluss auf Wachstum und Metastasierung von malignen Zellen in Xenograft Modellen wurde schon für diverse Tumortypen nachgewiesen (Fridmann *et al.*, 1990; Fridmann *et al.*, 1991; Pretlow *et al.*, 1991; Mehta *et al.*, 1993). Diese Arbeit zeigt, dass auch das Wachstum und die Metastasierung von Neuroblastomzellen in scid Mäusen durch Matrigel beeinflusst werden können.

Ein wichtiger Aspekt für das Wachstum der Neuroblastomzellen in den scid Mäusen ist die Kontamination der injizierten Tumorzellen mit Mykoplasmen. Versuche mit Tumorzellen, die mit Mykoplasmen infiziert waren, haben lediglich bei zwei Zelllinien die Entwicklung von Primärtumoren bei verlängerter Wachstumsdauer gezeigt. Nur eine Zelllinie hat Lungenmetastasen gebildet (eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Somit ist vor der Anwendung von Tumorzellen in einem Tiermodell eine routinemäßige Testung auf Mykoplasmen unerlässlich so wie sie in diesem Versuchsansatz erfolgt ist.

Eine Korrelation zwischen Tumorgewicht und Anzahl der Metastasen konnte in dieser Studie nur für die IMR-32 Gruppe ohne Matrigel Koinjektion nachgewiesen werden. Grundsätzlich scheint eine Assoziation zwischen Primärtumor und Metastasen zelllinienspezifisch zu sein. So konnte für humane Melanomzelllinien keine signifikante Beziehung zwischen Tumorgewicht und Anzahl der Lungenmetastasen gezeigt werden (Thies *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu ist bei der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 eine solche Korrelation nachgewiesen worden (Jojovic und Schumacher, 2000). Da in der vorliegenden Arbeit dieser Zusammenhang nur bei einer Subgruppe der Neuroblastome aufgetreten ist, scheint hier die Metastasenanzahl eher unabhängig vom Tumorgewicht zu sein.

Beim Vergleich der metastasierenden Zelllinien sind zwei unterschiedliche Muster aufgefallen. Während Kelly, IMR-32 und SK-N-SH Zellen vielzellige Lungenmetastasen überwiegend in den Lungenarterien und in dem die Gefäße umgebenden Bereich verursacht haben, haben LAN-1 und LAN-5 Zellen Mikro- und Einzelzellmetastasen in den Alveolarsepten der Lunge hervorgerufen. Dabei konnte eine Assoziation zwischen der

Expression von CD44 und den beschriebenen Metastasierungsmustern festgestellt werden. Die Zelllinien, die Einzelzell- und Mikrometastasen im Lungenstroma bildeten, haben nicht mit dem CD44 Antikörper reagiert. Die Neuroblastomzellen, die größere meist intra- und perivaskulär gelegene Metastasen entwickelt haben, sind hingegen CD44 positiv gewesen. Die Ergebnisse dieser immunhistochemischen Untersuchungen stimmen zum Teil mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein. Während LAN-1 und SH-SY5Y Zellen im Western Blot und in Immunfluoreszenzanalysen negativ für CD44 gewesen sind, konnte eine CD44 Expression von SK-N-SH Zellen im Western Blot nachgewiesen werden (Gross *et al.*, 1994; Gross *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2001). IMR-32 Zellen, die in der vorliegenden Untersuchung die stärkste Immunreaktion mit dem anti-CD44 Antikörper gezeigt haben, sind hingegen in der Studie von Gross *et al.* (1994) CD44 negativ gewesen. Diese Befunde zeigen, dass die gleiche Zelllinie in verschiedenen Laboratorien unterschiedliche Antigene exprimieren kann. CD44 ist ein Zelladhäsionsmolekül mit einer Vielfalt von Funktionen und vermittelt unter anderem Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionen über die Bindung zu seinem wichtigsten Liganden, der Hyaluronsäure (HA) (Gross *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2006). In klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von CD44 in Neuroblastomen mit einer günstigen Prognose assoziiert ist (Combaret *et al.*, 1997; Favrot *et al.*, 1993, Terpe *et al.*, 1995; Munchar *et al.*, 2003; Riley *et al.*, 2004). In Nacktmäusen hat die Unterdrückung eines funktionalen CD44 zu einer Zunahme des Neuroblastomwachstums geführt (Gross *et al.*, 2000). In dem vorliegenden scid Mausmodell ist eine prognostische Beurteilung der Zelllinien nicht eindeutig möglich, da Tumorwachstum, Tumorgewicht und Metastasierungsrate abhängig vom Injektionsmedium waren. Bei der Koinjektion von Matrigel sind keine auffallenden Unterschiede bezüglich der oben genannten Parameter zwischen den Zelllinien aufgetreten. Ohne Matrigel-Koinjektion sind die CD44 positiven Zelllinien besser und schneller angewachsen als die CD44 negativen. Die Metastasierungsrate ist allerdings bei den CD44 negativen LAN-1 und LAN-5 Zellen höher gewesen als bei den CD44 positiven IMR-32 und Kelly Zellen.

Neuroblastome können aus zwei Subpopulationen von Zellen bestehen: dem invasiven und dem proliferativen Typ (Xie *et al.*, 2007). Dabei ist eine Zunahme der VSNL-1 (Vesinin-like protein-1) Expression mit einem hochinvasiven Phänotyp und mit einer Abnahme der CD44 Expression vergesellschaftet (Xie *et al.*, 2007). Der invasive Zelltyp proliferiert langsamer, hat aber dafür ein größeres metastatisches Potential als der proliferative Typ. In der vorliegenden Arbeit haben die CD44 positiven Neuroblastome ohne

Matrigel schneller Primärtumore gebildet als die CD44 negativen Neuroblastomzellen und sie haben sich im Gegensatz zu den CD44 negativen Zellen in der Lunge vermehrt und große, vielzellige Lungenmetastasen gebildet. Die unterschiedliche Größe der Metastasen von CD44 negativen und positiven Neuroblastomen in der scid Maus kann allerdings auch durch die Wachstumsdauer bedingt sein. Die operative Entfernung des Primärtumors bei weiterem Überleben der Tiere kann so zu einer enormen Größenzunahme der Metastasen führen, die ohne Resektion des Primärtumors klein geblieben wären (Mitchell *et al.*, 1997).

Nichtsdestotrotz weisen die gesamten Ergebnisse darauf hin, dass CD44 eine Rolle bei der Regulation der Proliferation und der Zell-Zell-Adhäsion von Neuroblastomzellen in scid Mäusen spielt. Eine fehlende CD44 Expression scheint dabei Neuroblastomzellen zu charakterisieren, die sich zwar langsam vermehren, dafür allerdings hochmetastatische Eigenschaften haben. Auch in einem transgenen Brustkrebsmausmodell führte der Verlust von CD44 zu einer Zunahme der Lungenmetastasierung (Lopez *et al.*, 2005; Götte und Yip, 2006).

Bei den CD44 positiven Zelllinien ist aufgefallen, dass die disseminierten Zellen in den Pulmonalarterien und dem angrenzenden perivaskulären Raum verblieben sind und nicht in das Lungenstroma einwandern konnten. Das perivaskuläre Lungenkompartiment ist von Pabst (2004) erstmalig beschrieben worden und hat eine Bedeutung für die Lungenödembildung und Leukozytenwanderung bei entzündlichen and allergischen Prozessen (Pabst, 2004). Das isolierte Auftreten von Metastasen in dieser Region ist bisher nicht beschrieben worden und bestätigt die speziellen strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieses perivaskulären Raums. Die genauen Mechanismen, die dazu führen, dass die disseminierten CD44 positiven Neuroblastomzellen in diesem Raum verbleiben und sich dort vermehren sind jedoch unklar.

Es konnte gezeigt werden, dass Interaktionen zwischen CD44 und seinem Hauptbindungspartner HA wichtig für die Adhäsion von Brust- und Prostatakarzinomzellen an endotheliale Knochenmarkszellen sind (Simpson *et al.*, 2001; Draffin *et al.*, 2004). Außerdem wird die Adhäsion von Lymphozyten an Endothelzellen und ihre Extravasation über CD44-HA Interaktionen vermittelt (Mohamadzadeh *et al.*, 1998). Bei der Lymphozytenadhäsion bindet ein aktivierter CD44-Rezeptor der Lymphozyten an eine oberflächliche HA-Schicht der Endothelzellen (Mohamadzadeh *et al.*, 1998; Draffin *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wird die Bindung von Tumorzellen an z. B. endotheliale Zellen des Knochenmarks über Interaktionen eines Hyaluronsäuremantels, der die Tumor-

zelle umgibt und einem aktivierten CD44 Rezeptor der Endothelzellen vermittelt (Simpson *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2002; Draffin *et al.*, 2004). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Expression des CD44 Rezeptors auf Neuroblastomzellen eine Bedeutung für die Adhäsion der Zellen an die Endothelzellen der Lungenarterien der scid Maus haben könnte. Die Transmigration der Neuroblastomzellen durch die Kapillaren des perivaskulären Raums und ihr Einwandern in das pulmonale Stroma wird anscheinend jedoch eher durch die Expression des CD44 Rezeptors an der Neuroblastomzelloberfläche behindert.

LS Zellen haben eine unterschiedliche CD44 Expression von *in vitro* (Zellkultur) und *in vivo* (Maus) gewachsenen Zellen aufgewiesen. Während die Primärtumoren negativ gewesen sind, haben die Zellen in Paraffin eine mäßig starke Reaktion mit anti-CD44 gezeigt. Diese unterschiedliche CD44 Expression *in vivo* und *in vitro* wurde ebenfalls für Stromazellen des Knochenmarks nachgewiesen (Schade *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse der Immunhistochemie mit anti-Nestin sind nicht eindeutig zu interpretieren. Nestin ist ein Intermediärfilament, das in embryonalen neuroektodermalen Zellen vorkommt und bei einigen Tumoren mit der Aggressivität assoziiert ist (Rutka *et al.*, 1999; Ehrmann *et al.*, 2005). Die Bedeutung von Nestin für das Neuroblastom ist bisher ungeklärt. Während Thomas *et al.* (2004) eine Korrelation zwischen Nestin Expression und Aggressivität von Neuroblastomen zeigen konnten, haben Korja *et al.* (2005) Nestin keine Bedeutung als Malignitätsmarker in Neuroblastomen zugeordnet. In der vorliegenden Untersuchung ist die Reaktion der Neuroblastomzellen mit anti-Nestin sehr heterogen gewesen. Es konnte keine Korrelation zwischen der Nestinexpression und dem Tumorwachstum oder der Metastasierung nachgewiesen werden, so dass Nestin in unserem Xenograft-Modell nicht von prognostischer Bedeutung in Bezug auf die Metastasierung ist.

Das hier dargestellte spontan metastatische Neuroblastom-Xenograft-Modell ist für die Untersuchung neuer therapeutischer Agenzen geeignet. SK-N-SH bietet sich dabei als Standardzelllinie für präklinische therapeutische Studien von Neuroblastomen an. Diese Zelllinie hat ein großes Wachstums- und Metastasierungspotential bei einer Wachstumsdauer von nur ca. vier Wochen gezeigt. Das scid Mausmodell ist außerdem geeignet für grundlegende Untersuchungen über die metastatische Kaskade. In diesem Zusammenhang scheint CD44 eine funktionelle Bedeutung für die proliferativen und adhäsiven Eigenschaften von Neuroblastomzellen im vorgestellten Xenograft-Modell zu



haben. Das Wachstums- und Metastasierungsverhalten der Neuroblastomzellen in den scid Mäusen scheint hingegen unabhängig von der Nestinexpression zu sein.

## 6. Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle Tumor im Kindesalter. Bei Kindern, die älter als ein Jahr sind und Neuroblastome aufweisen, die bereits Fernmetastasen entwickelt haben, ist die Langzeitüberlebensrate mit weniger als 40% nach wie vor unbefriedigend. Aus diesem Grund ist es erforderlich neue therapeutische Ansätze zu entwickeln. In diesem Zusammenhang sind Xenograft-Modelle hilfreich, da diese *in vivo* Modelle sowohl dazu geeignet sind grundlegende Untersuchungen zur metastatischen Kaskade zu machen als auch präklinische therapeutische Studien durchzuführen.

In dieser Arbeit sind sieben humane Neuroblastomzelllinien mit und ohne Matrigel subcutan in scid Mäuse injiziert worden und ihr Wachstums- und Metastasierungsverhalten wurde analysiert. Weiterhin wurde die Expression von Nestin und CD44, beides mögliche prognostische Marker beim Neuroblastom, in den *in vitro* und *in vivo* gewachsenen humanen Neuroblastomzellen immunhistochemisch untersucht.

Alle Neuroblastomzelllinien bildeten Primärtumoren in den scid Mäusen, aber das Tumorstadium und das Metastasierungsverhalten zeigten große Unterschiede zwischen den Zelllinien in Abhängigkeit von der Koinjektion von Matrigel. Drei der metastasierenden Zelllinien (IMR-32, Kelly und SK-N-SH) entwickelten multizelluläre überwiegend intra- und periarteriell gelegene Lungenmetastasen; LAN-1 und LAN-5 wiesen Einzell- und Mikrometastasen im pulmonalen Stroma auf. Die Expression von CD44 war mit diesem Metastasierungsverhalten assoziiert. So waren IMR-32, Kelly und SK-N-SH Zellen CD44 positiv, aber LAN-1 und LAN-5 Zellen CD44 negativ.

In dem scid Maus Xenograft-Modell scheint CD44 eine funktionelle Bedeutung für die proliferativen und adhäsiven Eigenschaften von metastatischen Neuroblastomzellen zu haben. So transmigrieren CD44 positive Neuroblastomzellen meistens nicht ins Lungenstroma, sondern verbleiben im intra- bzw. periarteriellen Raum der Lunge. Die CD44 negativen Zellen hingegen wandern in die Alveolarsepten ein, aber vermehren sich dort nur langsam. Die Nestinexpression weist keine Assoziation zum Wachstums- und Metastasierungsverhalten der Neuroblastomzellen in den scid Mäusen auf.

Das in dieser Arbeit beschriebene spontan metastatische Neuroblastom-scid-Maus-Xenograft-Modell ist für Studien neuer therapeutischer Substanzen und Untersuchungen über die metastatische Kaskade geeignet. SK-N-SH Zellen haben ein großes Wachstums- und Metastasierungspotential in den scid Mäusen gezeigt und bieten sich somit als Standardzellen für präklinische therapeutische Studien an.

## 7. Literaturverzeichnis

Berthold F, Hero B, Kremens B, Handgretinger R, Henze G, Schilling FH, Schrappe M, Simon T, Spix C (2003) Long-term results and risk profiles of patients in five consecutive trials (1979-1997) with stage 4 neuroblastoma over 1 year of age. *Cancer Lett* 197:11-17

Bogenmann E (1996) A metastatic neuroblastoma model in scid mice. *Int J Cancer* 67:379-385

Borland G, Ross JA, Guy K. Forms and functions of CD44. *Immunology* 1998;93:139-148

Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Poulson R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Goldman J, Alison MR, Wright NA (2002) Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. *Gut* 50:752-757

Christiansen H, Sahin K, Berthold F, Hero B, Terpe HJ, Lampert F (1995) Comparison of DNA aneuploidy, chromosome 1 abnormalities, MYCN amplification and CD44 expression as prognostic factors in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 31:541-544

Combaret V, Gross N, Lasset C, Frappaz D, Beretta-Brognara C, Philip T, Beck D, Favrot MC (1997) Clinical relevance of CD44 cell surface expression and MYCN gene amplification in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 33:2101-2105

DeBernardi B, Nicolas B, Boni L, Indolfi P, Carli M, Di Montezemolo LC, Donfrancesco A, Pession A, Provenzi M, Di Cataldo A, Rizzo A, Tonini GT, Dall'orso S, Conte M, Gambini C, Garaventa A, Sonetti F, Zanazzo A, D'Angelo P, Bruzzi P (2003) Disseminated neuroblastoma in children older than one year at diagnosis: Comparable results with three consecutive high-dose protocols adopted by the italian co-operative group for neuroblastoma. *J Clin Oncol* 21:1592-1601

Draffin JE, McFarlane S, Hill A, Johnston PG, Waugh DJ (2004) CD44 potentiates the adherence of metastatic prostate and breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. *Cancer Res* 64:5702-5711

Eccles SA (2001) Basic principles for the study of metastasis using animal models. In: Brooks SA and Schumacher U (eds) *Metastasis Research Protocols, Volume II, Analysis of cell behaviour in vitro and in vivo*, Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 161-171

Ehrmann J, Kolar Z, Mokry J(2005) Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. *J Clin Pathol* 58:222-223

Engers R, Gabbert HE (2000) Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:682-92

Favrot MC, Combaret V, Lasset C (1993) CD44 – A new prognostic marker for neuroblastoma. *N Engl J Med* 329:1965

Fridman R, Giaccone G, Kanemoto T, Martin GR, Gazdar AF, Mulshine JL (1990) Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6698-6702

Fridman R, Kibbey MC, Royce LS, Zain M, Sweeney M, Jicha DL, Yannelli JR, Martin GR, Kleinman HK (1991) Enhanced tumor growth of both primary and established human and murine tumor cells in athymic mice after coinjection with Matrigel. *J Natl Cancer Inst* 83:769-774

Götte M, Yip GW (2006) Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res* 66:10233-10237

Gottstein C, Schön G, Tawadros S, Kube D, Wargalla-Plate UC, Hansmann ML, Wacker HH, Berthold F, Diehl V, Engert A (1994) Antidisialoganglioside ricin A-chain immunotoxins show potent antitumor effects in vitro and in a disseminated human neuroblastoma severe combined immunodeficiency mouse model. *Cancer Res* 54:6186-6193

Gross N, Beretta C, Peruisseau G, Jackson D, Simmons D, Beck D (1994) CD44H expression by human neuroblastoma cells: relation to MYCN amplification and lineage differentiation. *Cancer Res* 54:4238-4242

Gross N, Balmas Bourlout K, Brognara CB (2000) MYCN-related suppression of functional CD44 expression enhances tumorigenic properties of human neuroblastoma cells. *Exp Cell Res* 260:396-403

Gross N, Balmas K, Beretta Brognara C (2001) Role of CD44h carbohydrate structure in neuroblastoma adhesive properties. *Med Ped Oncol* 36:139-141

Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE (2006) Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med* 12:1167-1174

Jojovic M and Schumacher U (2000) Quantitative assessment of spontaneous lung metastases of human HT29 colon cancer cells transplanted into SCID mice. *Cancer Lett* 153:151-156

Korja M, Finne J, Salmi TT, Kalimo H, Karikoski R, Tanner M, Isola J, Haapasalo H (2005) Chromogenic in situ hybridization-detected hotspot MYCN amplification associates with Ki-67 expression and inversely with nestin expression in neuroblastomas. *Mod Pathol* 18:1599-1605

Kramer K, Cheung NK, Gerald WL, LaQuaglia M, Kushner BH, LeClerc JM, LeSauter L, Saragovi HU (1997) Correlation of MYCN amplification, Trk-A and CD44 expression with clinical stage in 250 patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer* 33:2098-2100

Lai CH, Shan YS, Sy ED, Hsieh YH, Tsai HW, Lee JC, Lin PW (2005) The significance of CD44 expression in gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Hepatogastroenterology* 52:1071-1076

Le QT, Chen E, Salim A, Cao H, Kong CS, Whyte R, Donington J, Cannon W, Wakelee H, Tibshirani R, Mitchell JD, Richardson D, O'Byrne KJ, Koong AC, Giaccia AJ (2006) An evaluation of tumor oxygenation and gene expression in patients with early stage non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 12:1507-1514

Lesley J, Hyman R, Kincade PW (1993) CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 54:271-335

Lopez JI, Camenisch TD, Stevens MV, Sands BJ, McDonald J, Schroeder JA (2005) CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res* 65:6755-6763

Marhaba R, Zoller M (2004) CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol* 35:211-231

Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007) Neuroblastoma. *Lancet* 369:2106-2120

Mehta RR, Graves JM, Hart GD, Shilkaitis A, Das Gupta TK (1993) Growth and metastasis of human breast carcinomas with Matrigel in athymic mice. *Breast Cancer Res Treat* 25:65-71

Mitchell BS, Horny HP, Schumacher U (1997) Immunophenotyping of human HT29 colon cancer cell primary tumours and their metastases in severe combined immunodeficient mice. *Histochem J* 29:393-399

Mohamadzadeh M, DeGrendele H, Arizpe H, Estess P, Siegelman M (1998) Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. *J Clin Invest* 101:97-108

- Morgenstern BZ, Krivoschik AP, Anderson PM (2004) Wilms' tumour and neuroblastoma. *Acta Paediatr Suppl* 445:78-85
- Munchar MJ, Sharifah NA, Jamal R, Looi LM (2003) CD44s expression correlated with the International Neuroblastoma Pathology Classification (Shimada system) for neuroblastic tumours. *Pathol* 35:125-129
- Niemeyer C (2003). *Krebserkrankungen* In: Koletzko B (Hrsg.) *Kinderheilkunde und Jugendmedizin*. 12. Auflage, Springer Verlag Berlin:348 – 350
- Pabst R (2004) The periarterial space in the lung: its important role in lung edema, transplantation, and microbial or allergic inflammation. *Pathobiology* 71:287-294
- Pretlow TG, Delmoro CM, Dilley GG, Spadafora CG, Pretlow TP (1991) Transplantation of human prostatic carcinoma into nude mice in Matrigel. *Cancer Res* 51: 3814-3817
- Riley RD, Heney D, Jones DR, Sutton AJ, Lambert PC, Abrams KR, Young B, Wailoo AJ, Burchill SA (2004) A systematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 10:4-12
- Schade UM, Nehmann N, Horny HP, Prehm P, Delpech B, Kruger WH, Zander AR, Schumacher U (2006) Hyaluronate and its receptors in bone marrow. *Acta Histochem* 108:141-147
- Rutka JT, Ivanchuk S, Mondal S, Taylor M, Sakai K, Dirks P, Jun P, Jung S, Becker LE, Ackerley C (1999) Co-expression of nestin and vimentin intermediate filaments in invasive human astrocytoma cells. *Int J Dev Neurosci* 17:503-515
- Schumacher U and Adam E (1997) Lectin histochemical HPA-binding pattern of human breast and colon cancers is associated with metastases formation in severe combined immunodeficient mice. *J Histochem* 29:1-8

Schumacher U and Mitchell BS (1997) Use of clinically relevant human-scid-mouse models in metastasis research. *Trends Biotechnol* 15:239-241

Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F (2003) Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 4:472 - 480

Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI (1992) Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:12160-12164

Simon T (2005) Neuroblastom. *Der Urologe* 44:543-555

Simpson MA, Reiland J, Burger SR, Furcht LT, Spicer AP, Oegema TR Jr, McCarthy JB (2001) Hyaluronan synthase elevation in metastatic prostate carcinoma cells correlates with hyaluronan surface retention, a prerequisite for rapid adhesion to bone marrow endothelial cells. *J Biol Chem* 276:17949-17957

Terpe H-J, Christiansen H, Gonzalez M, Berthold F, Lampert F (1995) Differentiation and prognosis of neuroblastoma in correlation to the expression of CD44s. *Eur J Cancer* 31A:549-552

Thies A, Mauer S, Fodstad O, Schumacher U (2007) Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *Br J Cancer* 96:609-616

Thomas SK, Messam CA, Spengler BA, Biedler JL, Ross RA (2004) Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 279:27994-27999

Thompson J, Guichard SM, Cheshire PJ, Richmond LB, Poquette CA, Ragsdale ST, Webber B, Lorsbach R, Danks MK, Houghton PJ (2000) Development, characterization and therapy of a disseminated model of childhood neuroblastoma in scid mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 47:211-221



Underhill C (1992) CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci* 103:293-298

Valentiner U, Hall D, Brooks S, Schumacher U (2005) HPA binding and metastasis formation of human breast cancer cell lines transplanted into severe combined immunodeficient (scid) mice. *Cancer Letters* 219:233-242

Watanabe O, Kinoshita J, Shimizu T, Imamura H, Hirano A, Okabe T, Aiba M, Ogawa K (2005) Expression of a CD44 variant and VEGF-C and the implications for lymphatic metastasis and long-term prognosis of human breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 24:75-82

Xie Y, Chan H, Fan J, Chen Y, Young J, Li W, Miao X, Yuan Z, Wang H, Tam PK, Ren Y (2007) Involvement of Visinin Like Protein-1 (VSNL-1) in Regulating Proliferative and Invasive Properties of Neuroblastoma. *Carcinogenesis* 2007 Jul 5; [Epub ahead of print]

Zaborszky L and Leranthy C (1985) Simultaneous ultrastructural demonstration of retrogradely transported horseradish peroxidase and choline acetyltransferase immunoreactivity. *Histochemistry* 82:529-537

Zavrides HN, Zizi-Sermpetzoglou A, Panousopoulos D, Athanasas G, Elemenoglou I, Peros G (2005) Prognostic evaluation of CD44 expression in correlation with bcl-2 and p53 in colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 43:31-36

## **8. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom März 2004 bis Januar 2008 in der Abteilung für Experimentelle Morphologie des Anatomischen Institutes des Universitätsklinikum Hamburg angefertigt.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. Schumacher für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die unproblematische Bereitstellung aller notwendigen Ressourcen.

Frau Dr. med. Valentiner danke ich für die umfassende Betreuung und den stetigen Nachdruck das Projekt voranzubringen.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für die stets freundliche und kompetente Unterstützung.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

|               |                                 |
|---------------|---------------------------------|
| Name          | Fried-Ulrich Valentiner         |
| Anschrift     | Bondenwald 47c<br>22453 Hamburg |
| Geburtsdatum  | 3. Juni 1961                    |
| Geburtsort    | Schenefeld im Kreis Pinneberg   |
| Eltern        | Friedrich und Gisela Valentiner |
| Familienstand | verheiratet, vier Kinder        |

### Schulische Ausbildung

|           |   |
|-----------|---|
| 1967-1971 | Grundschule Öjendorfer Höhe, Hamburg        |
| 1971-1979 | Gymnasium Billstedt, Hamburg                |
| 1979-1981 | Wirtschaftsgymnasium Wendenstrasse, Hamburg |
| 1981      | Erlangung der Allg. Hochschulreife          |

### Studium

|           |  |
|-----------|--|
| 1981      | Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffiziersanwärter |
| 1981-1987 | Studium der Zahnmedizin am UKE, Hamburg                  |
| 1987      | Staatsexamen mit der Note - sehr gut -                   |
| 1987      | Approbation als Zahnarzt                                 |

### Beruflicher Werdegang

|           |   |
|-----------|---|
| 1987-1996 | Zahnärztliche Tätigkeit als Sanitätsoffizier der Bundeswehr                                 |
| 1996-1997 | Zahnärztliche Tätigkeit als Assistenz Zahnarzt in Norderstedt                               |
| 1997      | Erlangung der Kassenzulassung als Kassenzahnarzt in einer Praxisgemeinschaft in Norderstedt |
| 1999      | Wechsel des Praxissitzes nach Hamburg Eidelstedt  |

## **10. Selbstständigkeitserklärung**

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

Hamburg, den