

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



ANALYSE FUNKTIONELLER DETERMINANTEN DES INDIVIDUELLEN TUMORRISIKOS IM TIERMODELL: DER EINFLUSS DER IMMUNEFFEKTORZELLEN



JUDITH ANNA-MARIA MARX

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. E. Burkhardt
und
dem Institut für Neuropathologie
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Betreuer: Priv.-Doz. Dr. A. Kindler-Röhrborn

**Analyse funktioneller Determinanten des
individuellen Tumorrisikos im Tiermodell:
der Einfluss der Immuneffektorzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
JUDITH ANNA-MARIA MARX
Tierärztin aus Minden (Westfalen)

Gießen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter/-in: Prof. Dr. E. Burkhardt
Priv.-Doz. Dr. A. Kindler-Röhrborn

Tag der Disputation: 02. April 2008

**Meiner Großmutter
Annemarie Hassenewert**

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
2.	Literaturübersicht.....	4
2.1	Tumorerkrankungen – Vorkommen und Bedeutung.....	4
2.2	Die Kanzerogenese.....	5
2.3	Das BDIV-BDIX-Rattenmodell zur Identifizierung prädisponierender Gene und Effektormechanismen bei der Entstehung von Tumoren des Nervensystems.....	7
2.4	Die Immunantwort als Effektormechanismus für die Tumorresistenz.....	16
3.	Material und Methoden.....	21
3.1	Haltung und Züchtung der BDIV- und BDIX-Inzuchtratten.....	21
3.2	Induktion von Tumoren des Nervensystems mittels N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff.....	21
3.3	Thymektomie von BDIV- und BDIX-Ratten.....	21
3.4	Tötung und Sektion erkrankter Tiere und Präparation der Nn. trigemini.....	23
3.5	Präparation der Lnn. mesenteriales und der Milz.....	25
3.6	Anfertigung und Lagerung von Gefrierschnitten.....	25
3.7	Histologische Färbungen.....	26
3.7.1	Hämatoxilin-Eosin-Färbung der Nn. trigemini.....	26
3.7.2	Versilberung der Retikulinfasern in Tumorgewebschnitten nach Novotny, modifiziert.....	26
3.8	Immunhistochemische Färbungen.....	27
3.8.1	Färbung von CD4-, CD8-, CD18-, ED1-, ED2-, CD161- und α TCR-exprimierenden Zellen.....	27
3.8.2	Färbung S100-positiver Zellen.....	29
3.8.3	Quantifizierung der gefärbten Zellen.....	30
3.8.3.1	Computerunterstützte Auswertung.....	30

3.8.3.2	Auszählung im Mikroskop mit Netzmikrometer.....	30
3.9	Analyse von T-Lymphozyten-Populationen im Blut mittels Durchflusszytometrie.....	33
3.9.1	Blutentnahme.....	33
3.9.2	Isolierung der Leukozyten aus dem Blut.....	33
3.9.3	Färbung der Lymphozyten.....	34
3.9.3.1	Färbung von $\alpha\beta$ T-Lymphozyten.....	34
3.9.3.2	Doppelfärbung von $\alpha\beta$ T-Lymphozyten, CD4-positiven und CD8-positiven Zellen.....	34
3.9.4	Messung im Fluoreszenzaktivierten Zell-Sortierer.....	36
3.9.5	Auswertung.....	36
3.10	Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese zur Ermittlung des Verhältnisses <i>Neu/ErbB-2</i>-mutierter Allele zu Wildtyp-Allelen in malignen Schwannomen.....	37
3.10.1	Gewinnung des Gewebes.....	37
3.10.2	Amplifikation der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	37
3.10.3	Enzymatische Spaltung des Produktes.....	39
3.10.4	Visualisierung des gespaltenen Produktes.....	39
3.11	Statistische Analysen.....	41
3.11.1	Auswertung immunhistochemisch gefärbter CD18-, CD4-, CD8-, ED1- und ED2-exprimierender Zellen in den Nn. trigemini der BDIV- und BDIX-Ratten im Alter von 40 bis 70 Wochen.....	41
3.11.2	Auswertung des Einflusses der neonatalen Thymektomie auf die Entstehung von Tumoren des peripheren Nervensystems....	41
4.	Ergebnisse.....	43
4.1	Detektion von Immuneffektorzellen in den Nn. trigemini.....	43
4.1.1	Detektion von T-Lymphozyten und Makrophagen zu frühen Entwicklungszeitpunkten maligner Schwannome.....	43
4.1.2	Detektion von T-Zell-Rezeptor-exprimierenden Zellen.....	56
4.1.3	Detektion von Natürlichen Killerzellen.....	56

4.2	Der Einfluss der T-Zell-Depletion durch die Thymektomie auf die Entwicklung von EtNU-induzierten malignen Schwannomen in BDIV- und BDIX-Ratten.....	57
4.2.1	Anteil persistierender T-Lymphozyten im Blut der thymektomierten Ratten.....	59
4.2.2	Verhältnis CD8-exprimierender zu CD4-exprimierenden $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Blut thymektomierter Ratten.....	64
4.2.3	Quantifizierung eingewanderter T-Lymphozyten in den Nn. trigemini EtNU-behandelter thymektomierter Ratten und Identifizierung der CD4-exprimierenden Zellen als Makrophagen.....	67
4.2.4	Sektionsbefunde erkrankter thymektomierter und euthymischer Ratten.....	72
4.2.5	Detektion von <i>Neu/ErbB-2</i> -mutierten Zellen in den Schwannomen beider Stämme.....	73
4.2.6	Klassifikation der Tumoren als maligne Schwannome durch die histologische Untersuchung.....	76
4.2.7	Inzidenz maligner Schwannome und Überlebenszeit in beiden BD-Rattenstämmen.....	79
4.2.8	Korrelation zwischen Anteilen verbliebener T-Lymphozyten im Blut und dem Auftreten von Schwannomen.....	84
4.2.9	Histomorphologie der Nn. trigemini thymektomierter BDIV-Ratten ohne Schwannomentwicklung.....	86
5.	Diskussion.....	88
5.1	Die Antwort des Immunsystems auf die Entstehung prämaligner Schwannischer Zellen in den Nn. trigemini von BDIV- und BDIX-Ratten.....	88
5.2	Die Auswirkungen der postnatalen Thymektomie auf die EtNU-induzierte Entstehung maligner Schwannome bei BDIV- und BDIX-Ratten.....	90
5.2.1	Komplikationen während der Thymektomie und postoperativen Phase.....	91

5.2.2	Die Notwendigkeit einer intakten T-Zell-Antwort für die Resistenz der BDIV-Ratte gegenüber der EtNU-induzierten Kanzerogenese im peripheren Nervensystem.....	92
5.2.3	Die unvollständige Elimination der T-Lymphozyten durch die postnatale Thymektomie.....	94
5.2.4	Die Abwesenheit der T-Lymphozyten in den Nn. trigemini thymektomierter BD-Ratten.....	96
5.2.5	Die Entwicklung maligner Schwannome ohne <i>Neu</i> -Mutation in thymektomierten BD-Ratten.....	99
5.3	Das BD-Ratten-Modell im Kontext der Erforschung immunologisch bedingter Tumoresistenz.....	100
6.	Zusammenfassung.....	105
7.	Summary.....	107
8.	Literaturverzeichnis.....	109
9.	Anhang.....	117
9.1	Bezugsquellen für Antikörper.....	117
9.1.1	Antikörper Immunhistochemie.....	117
9.1.1.1	Primär-Antikörper.....	117
9.1.1.2	Sekundär-Antikörper.....	117
9.1.2	Antikörper FACS.....	117
9.2	Bezugsquellen für Reagenzien und Chemikalien.....	118
9.3	Bezugsquellen für Verbrauchsmaterialien.....	120
9.3.1	Verbrauchsmaterialien Thymektomie.....	120
9.3.2	Verbrauchsmaterialien Blutentnahme, Gewebeschnittherstellung, Histologische Färbungen, Immunhistochemie, FACS, PCR, Gelelektrophorese.....	120
9.4	Bezugsquellen für Bestecke und Geräte.....	121
9.4.1	Operationsbesteck.....	121
9.4.2	Geräte Operation und Sektion.....	121

9.4.3	Geräte Blutentnahme, Gewebeschnittherstellung, Histologische Färbungen, Immunhistochemie, FACS, PCR, Gelelektrophorese.....	122
9.5	EDV-Programme.....	123
9.6	Lösungen und Puffer.....	123
9.6.1	Mc Ilvain-Puffer (Citronensäure-Phosphat, pH 6,0).....	123
9.6.2	10-fach-Ladepuffer für Silber- und Agarosegele.....	123
9.6.3	FACS-Puffer.....	123
9.6.4	50-fach TAE-Puffer (pH 8,4).....	123
9.6.5	5-fach TBE-Puffer (pH 8,4).....	124
9.6.6	Paraformaldehyd-Lösung 4%.....	124
9.6.7	dNTP-Lösung 40 mM.....	124
9.6.8	Eosin-Lösung 1%.....	124
9.7	Verzeichnis der Abkürzungen.....	125
9.8	Publikationen.....	126
9.8.1	Paper.....	126
9.8.2	Abstract.....	126
9.9	Danksagung.....	127
9.10	Erklärung.....	128

1. Einleitung

Krebserkrankungen sind in Westeuropa beim Menschen nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache. Auch bei den Haussäugetieren gewinnen sie durch deren verlängerte Lebenserwartung aufgrund guter Haltungsbedingungen und medizinischer Versorgung vor allem bei Kleintieren zunehmend an Bedeutung. Um Maßnahmen der Prävention ergreifen bzw. eine Frühdiagnostik und adäquate Therapien durchführen zu können, ist ein differenziertes Verständnis der Ätiologie und Pathogenese maligner Erkrankungen notwendig. Hierfür ist die Identifizierung prädisponierender und Tumoresistenz vermittelnder Gene essenziell.

Nur ein geringer Anteil (ca. 5%) aller Krebserkrankungen bei Säugetieren ist auf ein einziges defektes Allel eines Tumorsuppressorgens in der Keimbahn der Patienten zurückzuführen (sogenannte Tumorsuszeptibilitätssyndrome, zum Beispiel das erblich bedingte Mammakarzinom oder die hereditären zystischen Nierenkarzinome beim Deutschen Schäferhund). Die mutierten Allele werden dominant vererbt und zeigen eine hohe Penetranz, so dass die familiäre Häufung der entstandenen Tumoren die Identifizierung der Genträger und damit der kausal beteiligten Gene möglich macht.

Der überwiegende Anteil aller Krebserkrankungen entsteht dagegen sporadisch, doch lässt die Tatsache, dass Menschen, die in ähnlichem Umfang krebserregenden Noxen ausgesetzt sind, in unterschiedlichem Maße Tumoren entwickeln, wie zum Beispiel Raucher, den Einfluss des individuellen genetischen Hintergrundes vermuten. Das Ausmaß der individuellen Empfindlichkeit gegenüber der Tumorentstehung wird dabei vermutlich durch das Zusammenspiel funktionell polymorpher Allele verschiedener Gene und unterschiedlicher Umwelteinflüsse determiniert. Aufgrund des polygenen Erbgangs und der niedrigen Penetranz einzelner beteiligter Gene sowie der genetischen Diversität ist es beim Menschen kaum möglich, Genträger zu identifizieren und so familiäre Häufungen als Grundlage für die Kartierung prädisponierender Gene festzustellen.

Ein geeignetes Tiermodell zur Erforschung der Ätiologie von Krebserkrankungen, die auf einen solchen polygenen Erbgang zurückzuführen sind,

ist die durch N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (EtNU) induzierte Kanzerogenese im Nervensystem von Ratten der BD-Stämme. Den Ratten der Inzucht-Stämme BDIV und BDIX wird hierbei am ersten Lebenstag (Postnataltag) eine definierte Dosis des Kanzerogens EtNU appliziert, welches die DNA sämtlicher Körperzellen durch seine alkylierenden Effekte modifiziert.

Während mehr als 85% der BDIX-Ratten darauf maligne Schwannome hauptsächlich der Nervi trigemini (Nn. trigemini) entwickeln, sind BDIV-Ratten fast vollständig resistent. Das wahrscheinlich initiale Ereignis der Entstehung dieser Schwannome ist eine Punktmutation im *Neu/ErbB-2*-Gen, das auf Chromosom 10 lokalisiert ist und für eine Rezeptortyrosinkinase kodiert. Mutierte Zellen proliferieren im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen ungehindert und weisen ein hohes Transformationsrisiko auf. Die Mutation entsteht ausschließlich in den zum Zeitpunkt der Applikation transformationsempfindlichen Schwannschen Zellen und dient als diagnostisches Kriterium für EtNU-induzierte maligne Schwannome. Ein weiterer Vorteil dieses Modells liegt darin, dass auf die Mutation im *Neu/ErbB-2*-Gen folgende Kanzerogenese-Schritte wie der Verlust der Heterozygotie in zwei Genregionen von Tumorsuppressorgenen (auf Chromosom 5 und 10) definiert werden konnten und der Entstehungsort prämaligener Zellen (nahe der Hirn-Nerv-Grenze) bekannt ist. Der hohe Verwandtschaftsgrad der beiden Rattenstämme und die Möglichkeit zur Ausschaltung von Umweltfaktoren durch standardisierte Haltungsbedingungen erleichtern zudem die gezielte Ermittlung einzelner prädisponierender Gene. Es konnten durch Assoziationsanalysen an segregierenden Kreuzungen bereits sieben Genregionen eingegrenzt werden. Die *Neu/ErbB-2*-mutierten prämaligen Zellen können interessanterweise in der frühen Phase der Tumorentstehung in beiden Stämmen nachgewiesen werden. Doch während sich in den suszeptiblen BDIX-Ratten aus ihnen manifeste Tumoren entwickeln, verringert sich ihre Anzahl in den resistenten BDIV-Ratten ab dem Tag 100 nach EtNU-Exposition, bis sie nach ca. 180 Tagen weder nahe der Hirn-Nerv-Grenze noch in der Peripherie nachweisbar sind. Denkbar für diesen Eliminationsvorgang wäre eine durch die Zellen wegen der Anhäufung genetischer Schäden selbst initiierte oder durch den Entzug von essenziellen

Wachstumsfaktoren während der Reifung der Nerven ausgelöste Apoptose. Eine andere Möglichkeit bestände darin, dass Effektorzellen des Immunsystems, wie Makrophagen, T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen durch ihre Interaktion mit den prämaligen Zellen ein Zugrundegehen verursachen.

Die Fähigkeit solcher Effektorzellen, prämalige und maligne Zellen erkennen, beseitigen und damit die Entstehung von Tumoren verhindern zu können, ist dabei eine bis in dieses Jahrtausend kontrovers diskutierte Hypothese. Während ein hemmender Einfluss solcher Zellen auf die Entstehung verschiedener Tumoren nachgewiesen werden konnte, ist eine vollständige Remission manifester Tumoren, die eine Infiltration von Effektorzellen aufwies, bislang in keinem Fall beobachtet worden.

Immunhistochemische Experimente zeigten, dass es in den Nn. trigemini 80 bis 250 Tage alter EtNU-behandelter BDIX- und BDIV-Ratten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollratten beider Stämme zu einer massiven Invasion von Makrophagen und T-Lymphozyten kommt. Da nahezu keine stammspezifischen Unterschiede gefunden wurden, blieb offen, ob diese Effektorzellen an der Elimination der prämaligen Zellen in den BDIV-Ratten beteiligt und im Falle einer Beteiligung in beiden Stämmen in unterschiedlichem Maße funktionsfähig sind.

Diese Fragestellung war in meiner Arbeit zu klären. Durch die Entfernung des Thymus bei neonatalen EtNU-behandelten BD-Ratten wurde die Reifung der T-Lymphozyten unterbunden, so dass keine Ausbildung einer funktionsfähigen T-Zell-Antwort möglich war. Falls T-Lymphozyten an der Elimination der prämaligen Zellen beteiligt sind, sollte den prämaligen Zellen in Abwesenheit der T-Lymphozyten in den BDIV-Ratten die Möglichkeit zur Progression zu einem vollständigen malignen Phänotyp gegeben sein. Die Tumorentstehung in den BDIX-Ratten könnte zudem beschleunigt werden oder präferentiell in beiden Nerven stattfinden. Immunhistochemische Färbungen der Nn. trigemini junger behandelter und unbehandelter BD-Ratten zur Detektion der T-Lymphozyten und Makrophagen sollten zudem zeigen, zu welchem Zeitpunkt während der Kanzerogenese die Immunantwort hervorgerufen wird.

2. Literaturübersicht

2.1 Tumorerkrankungen – Vorkommen und Bedeutung

Krebserkrankungen sind in der Humanmedizin von großer Bedeutung, da sie in Deutschland und anderen westeuropäischen Ländern die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (Europäischer Gesundheitsbericht 2005, WHO) darstellen und bei Menschen mittleren Alters (den 25- bis 64-Jährigen) in Deutschland sogar die häufigste Todesursache (Atlas of health in Europe, 2004, WHO) sind.

Bei den einzelnen Haussäugetieren ist die Empfindlichkeit gegenüber der Entstehung von Tumoren unterschiedlich stark ausgeprägt: In Deutschland wird das Auftreten von Tumoren bei Hunden und Katzen am häufigsten beobachtet, gefolgt von Rindern und Pferden. Dagegen sind solche Erkrankungen bei Schweinen und den kleinen Wiederkäuern weniger von Bedeutung. Zudem variiert auch das Verhältnis von malignen und benignen Tumoren. So ist zum Beispiel die Mehrzahl aller Tumoren beim Hund gutartig, während bei der Katze bösartige Tumoren anteilmäßig überwiegen (STÜNZI and WEISS, 1990).

Letztendlich verfehlt aber eine solche übergreifende Aussage über die Bedeutung von Tumorerkrankungen bei einer Tierart das Ziel, Angaben über individuelle Risiken machen zu können, da innerhalb einer Tierart die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Rasse oder Linie einer Rasse die Wahrscheinlichkeit, an bestimmten Tumoren zu erkranken, erheblich beeinflussen kann. Solche Dispositionen innerhalb einer Rasse bzw. Zuchtlinie sind zum Beispiel beim Hund beschrieben worden und lassen sich auf eine Anreicherung einzelner prädisponierender Allele zurückführen, verursacht durch eine zu kleine Population der für die Züchtung einer neuen Rasse verpaarten Elterntiere oder durch eine nachträgliche starke Inzucht innerhalb einer Rasse (SUTTER and OSTRANDER, 2004). Ein Beispiel hierfür wäre die polygen vererbte maligne Histiozytose, deren gehäuftes Auftreten beim Berner Sennenhund beschrieben wurde (ROSIN et al., 1986).

2.2 Die Kanzerogenese

Die Entstehung eines Tumors ist als ein mehrstufiger Prozess anzusehen, bei dem die betroffenen Zellen schrittweise genetische Modifikationen erfahren. Die auslösenden Ursachen und einzelnen Ereignisse sind heute für die meisten Tumoren nur teilweise bekannt. Fearon und Vogelstein konnten mit Hilfe einer Querschnittsstudie an Kolonpolypen und Kolontumoren verschiedener Differenzierungsgrade zeigen, dass bestimmte genetische Veränderungen mit den verschiedenen Stadien der Entstehung des Kolontumors assoziiert sind und dadurch die Reihenfolge der Mutationsereignisse festlegen (FEARON and VOGELSTEIN, 1990).

Die Auslösung der Kanzerogenese erfolgt in den meisten Fällen durch das Zusammenspiel der individuellen genetischen Konstitution, beeinflusst von einer Rasse-, Familien- oder Geschlechtszugehörigkeit und dem Einwirken exogener Faktoren, wie chemischer Agenzien, radioaktiver und ultravioletter Strahlung sowie viraler und parasitärer Infektionen.

Betrifft die durch das Einwirken einer Noxe auf die DNA ausgelöste Modifikation ein Tumorsuppressorgen oder Protoonkogen und führt dies zu dessen Inaktivierung bzw. Aktivierung (BROWN, 1997; HABER and FEARON, 1998), so stellt sie ein Risiko zur Entartung der Zelle dar.

Viele der DNA-Schäden können durch Reparaturmechanismen wieder behoben werden. Fehlen diese aber oder sind sie nur unvollständig, wird die Mutation durch Weitergabe an die somatischen Tochterzellen im Genom verankert. Falls die mutierten Zellen nicht eliminiert werden, kann nach einer unterschiedlich langen Latenzperiode ein Tumor manifest werden.

Heute kennt man eine Vielzahl an Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen sowie auch deren Funktionen.

Protoonkogene kodieren für unterschiedliche Proteine, wie Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Komponenten der zellinternen Signalübertragungssysteme wie Guaninnukleotid-bindende Proteine, DNA-bindende nukleare Proteine einschließlich Transkriptionsfaktoren, Faktoren, die die Progression durch den Zellzyklus fördern, sowie Hormonrezeptoren, welche wachstums- und differenzierungsfördernd auf die Zelle wirken.

Ereignisse, wie Punktmutationen, Insertionen, Translokationen, Genamplifikationen und Deletionen können die Aktivierung der Protoonkogene bewirken. Die Modifikation eines der beiden kodierenden Allele ist dabei ausreichend im Gegensatz zu den Tumorsuppressorgenen wie dem *TP53*-Gen, dessen regulierender Einfluss auf Proliferationsprozesse erst durch die Veränderung beider Allele ausgeschaltet oder in seiner Funktion geändert wird. In den meisten Fällen führt eine Punktmutation in einem Allel, gefolgt vom Wegfall des anderen Alleles durch eine Deletion oder mitotische Rekombination und einem daraus resultierenden Heterozygotie-Verlust, zur Inaktivierung der Tumorsuppressorgene (CAVENEY et al., 1983). Einige Tumorsuppressorgene sind auch an Prozessen, wie der DNA-Reparatur und dem programmierten Zelltod, beteiligt.

Die bis jetzt bekannten hereditären Krebserkrankungen beruhen meist auf einem Defekt in lediglich einem Allel eines Tumorsuppressorgens in der Keimbahn. Beispiele für diese so genannten Tumorsuszeptibilitätssyndrome sind beim Menschen vorkommende erbliche Retinoblastome, welche durch die Mutation im *Rb*-Gen hervorgerufen werden (CAVENEY et al., 1983; KNUDSON, 1971), die Mammakarzinome, ausgelöst zum Beispiel durch eine Mutation im Gen *BRCA1* oder *BRCA2* (WALSH and KING, 2007), oder die dominant vererbten, mit einer generalisierten nodulären Dermatofibrose einhergehenden zystischen Nierenkarzinome beim Deutschen Schäferhund (KRIEGER-HUBER and FAUSSNER, 1985; MOE and LIUM, 1997), deren ursächliche Mutation im für das Protein Folliculin kodierenden Gen erst vor vier Jahren entdeckt wurde (LINGAAS et al., 2003).

Da Genträger aufgrund der familiären Häufung bei einem solchen autosomal dominanten Erbgang leicht zu ermitteln waren, gelang es bei vielen dieser Krebserkrankungen, durch Kopplungs-Analysen das jeweils beteiligte mutierte Gen zu identifizieren. Bis heute sind schon über 100 derartige Gene bekannt. Der Anteil der im Zusammenhang mit Tumorsuszeptibilitätssyndromen entstandenen Tumoren ist aber mit 1-5% relativ gering (PONDER, 1990).

Die meisten Tumoren treten dagegen sporadisch, ohne eine offensichtliche familiäre Häufung auf. Doch dass zum Beispiel die Empfindlichkeit

unterschiedlicher Patienten gegenüber denselben Noxen, wie zum Beispiel dem Rauchen, stark variiert (BALMAIN and NAGASE, 1998) oder dass nicht monogen bedingte Mammakarzinome oft zu einem späteren Zeitpunkt auch in der kontralateralen Brust einer betroffenen Patientin entstehen (BALMAIN et al., 2003), spricht auch bei diesen Erkrankungen dafür, dass die individuelle genetische Prädisposition über das Ausmaß der Tumorentwicklung entscheidet. Wahrscheinlich beeinflussen allelische Variationen einer Vielzahl von Gene, die auf unterschiedlichen Ebenen agieren, das individuelle Krebsrisiko. Denkbar wären Gene, die auf Proliferations- und Differenzierungsvorgänge oder die Expression anderer Gene Einfluss nehmen bzw. DNA-Reparaturmechanismen und Signaltransduktionen modifizieren.

Die Suche einzelner bei einem solchen komplexen Prozess beteiligter Gene ist beim Menschen schwierig, da ihre niedrige Penetranz die Feststellung familiärer Häufungen nicht zulässt und das Ausmaß einflussnehmender Umweltfaktoren nicht abgeschätzt werden kann (BALMAIN and NAGASE, 1998).

2.3 Das BDIV-BDIX-Rattenmodell zur Identifizierung prädisponierender Gene und Effektormechanismen bei der Entstehung von Tumoren des Nervensystems

Die Forschung an kontrolliert entstandenen Tumoren ingezüchteter Nagetiere als Äquivalente zu komplexen Krebserkrankungen des Menschen und der Haussäugetiere stellt eine wertvolle Alternative zu Studien an Patienten und an deren Gewebe dar.

Aufgrund der hohen Reproduktionsrate von Nagetieren, der umfangreichen Sammlung physiologischer Daten (besonders bei Ratten) und der Möglichkeit, viele Tiere wegen ihrer geringen Körpergröße gleichzeitig halten zu können, sind Nagetiermodelle besonders im Hinblick auf genetische Studien anderen weit überlegen. Zudem erlauben Inzuchtstämme, durch Kreuzungsversuche Hinweise auf die Erbgänge bestimmter Merkmale zu erhalten und einzelne Effekte betrachten zu können.

Wegen der Vielzahl von Analogien zwischen Mensch und Nagetier sind aus solchen Modellen gewonnene Daten teilweise oder vollständig übertragbar (BALMAIN and HARRIS, 2000).

Die unterschiedlich ausgeprägten Empfindlichkeiten der einzelnen Nagetierstämme gegenüber der durch ein bestimmtes Kanzerogen induzierten Tumorentstehung ermöglichen zudem vergleichende genetische Studien (BALMAIN and NAGASE, 1998).

Bis heute konnten schon viele Genregionen, in denen Suszeptibilitäts- oder Resistenzgene vermutet werden, in Nagetieren eingegrenzt werden (BALMAIN and NAGASE, 1998; HSU et al., 1994; SHEPEL et al., 1998). Diese noch großen Regionen beinhalten eine Vielzahl von Genen, deren Funktionen oft nicht oder nur teilweise bekannt sind. Deshalb erscheint das Ermitteln von Genen, die an der Tumorentstehung beteiligt sind, erst durch die Kenntnis der Effektormechanismen kurzfristiger realisierbar.

Für die Erforschung der Gene, die das Tumorrisiko determinieren, bieten die Inzuchtstämme BDIV und BDIX einen großen Vorteil: Die Stämme sind sehr eng miteinander verwandt, ihre Empfindlichkeit gegenüber der chemisch induzierten Kanzerogenese mittels perinataler N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff-Applikation (EtNU) variiert aber enorm. EtNU zerfällt in wässriger Lösung zu einem hochreaktiven Ethyldiazonium-Ion-Intermediat, das in allen Körperzellen durch Alkylierungsreaktionen mit der DNA verschiedene Mutationen bewirkt.

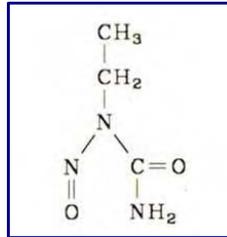
So sind BDIX-Ratten hoch empfindlich gegenüber der Entstehung von Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems, während nur ein Teil der Ratten des Stammes BDIV solche Tumoren entwickelt. Die durchschnittliche Latenzzeit der BDIV-Ratten übersteigt darüber hinaus die der BDIX-Ratten erheblich (DRUCKREY et al., 1970; RAJEWSKY et al., 1977). Wird den Ratten beider Stämme die Dosis von 80 µg/g Körpermasse subkutan am ersten Postnataltag injiziert, besteht die größte Diskrepanz hinsichtlich der Empfindlichkeit der beiden Stämme: Während mehr als 85% der Ratten des Stammes BDIX maligne Schwannome meist in einem der zwei Nn. trigemini entwickeln, erweisen sich die BDIV-Ratten als fast vollständig resistent (ca. 2-3 Fälle pro 1.000 behandelte Ratten) (Abbildung 2-1).

Dieser Unterschied in der Empfindlichkeit ist ein großer Vorteil des Modells für vergleichende genetische und funktionelle Analysen (DRUCKREY et al., 1970; KINDLER-ROHRBORN et al., 1999). Durch eine genomweite Assoziationsanalyse an 270 EtNU-behandelten (BDIV x BDIX) F₂ Rattenhybriden wurden sieben Genorte gefunden (Mss1 bis Mss7), die mit Suszeptibilität und Resistenz gegenüber der EtNU-induzierten PNS Kanzerogenese assoziiert sind. Kandidatengene können auf der Basis ihrer Position und Funktion ausgewählt werden. Eine Voraussetzung für die Anwendung funktioneller Kriterien ist jedoch eine gründliche Untersuchung der Effektormechanismen, die Suszeptibilität und Resistenz gegenüber der Tumorentstehung vermitteln.

Die EtNU-induzierten malignen Schwannome der BDIX-Ratten sind hauptsächlich im intrakranialen Anteil der Nn. trigemini nahe der Hirn-Nerv-Grenze lokalisiert und entstehen dagegen selten in anderen Nerven (Abbildung 2-1 b). Sie zeichnen sich durch ein rasantes und invasives Wachstum aus. Entstehen sie in Nerven, deren Umgebung ein raumforderndes Wachstum zulässt, können sich auch große von einer Pseudokapsel umgebene Tumoren bilden, die von mit roter Flüssigkeit gefüllten Hohlräumen durchsetzt sind. Bei betroffenen Ratten führen sie zur Ausbildung typischer Symptome, die auf den Ausfall des betroffenen Nervs oder den vermehrten Druck auf das Gehirn zurückzuführen sind: Dazu zählen Kachexie (durch die Lähmung der Kaumuskulatur), Kopfschiefhaltung und Orientierungsverlust, Paralysen und das Hervorquellen eines Auges. Hat sich ein malignes Schwannom im N. trigeminus entwickelt, so sterben die betroffenen Ratten innerhalb weniger Tage.

Histologisch stellen sich prä-maligne Schwannsche Zellen als Zellhaufen oder straßenähnliche Formationen kleiner Zellen mit abgerundeten Zellkernen und einem erhöhten Kern-Plasma-Verhältnis dar. Im weiteren Verlauf der Kanzerogenese bilden sich große Zellhaufen mit dazwischen gelegenen Hohlräumen, die mit Zelltrümmern und Flüssigkeit gefüllt sind.

Subkutane Injektion des Kanzerogens N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff
am ersten Postnataltag



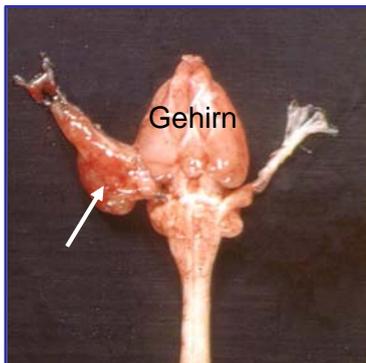
BDIX-Ratte



BDIV-Ratte



> 85% der Ratten entwickeln
maligne Schwannome vor allem
des N. trigeminus nahe der
Hirn-Nerv-Grenze (weißer Pfeil)



nahezu vollständige Resistenz
gegenüber der Entstehung
maligner Schwannome



Abbildung 2-1
Auswirkungen der EtNU-Applikation am ersten Postnataltag auf die Entwicklung von Tumoren
des peripheren Nervensystems der eng miteinander verwandten Rattenstämme BDIV und
BDIX.

Bis heute ist nur ein Teil aller zur Entstehung maligner Schwannome in der BDIX-Ratte beitragenden Mechanismen bekannt. Als ein frühes, wenn nicht das initiale Ereignis der Tumorentstehung gilt eine durch das Kanzerogen EtNU ausgelöste T:A → A:T Transversionsmutation des Nukleotids 2012 (bei der Ratte auf Chromosom 10 lokalisiert) im *Neu/ErbB-2*-Gen, das für eine Rezeptortyrosinkinase (ein membrangebundener Wachstumsfaktorrezeptor) kodiert (BARGMANN et al., 1986). Da diese Mutation bislang in allen EtNU-induzierten malignen Schwannomen der BDIX-Ratten beobachtet werden konnte, wird ihre Notwendigkeit für die Entstehung vermutet.

Die von einer *Neu*-mutierten Zelle exprimierte Rezeptortyrosinkinase weist einen Aminosäureaustausch in der Transmembrandomäne auf und ist auch ohne die Bindung eines Wachstumsfaktors aktiviert (eventuell aufgrund einer aus der Proteinveränderung resultierenden Homodimerisierung des Rezeptors). Die Folge der Aktivierung ist eine unregulierte Übermittlung von proliferationsfördernden Signalen an den Zellkern (Abbildung 2-2).

Die *Neu*-Mutation lässt sich ausschließlich in den Schwannschen Zellen, den Gliazellen der Nerven, feststellen - je nach Detektionssystem frühestens am Tag 7 nach EtNU-Exposition (NIKITIN et al., 1991) - und bedeutet für diese dadurch in einer frühen Differenzierungsphase verharrenden mutations-tragenden Vorläuferzellen mit ihrer hohen Teilungsrate (proliferierenden statt sich differenzierenden Zellen) ein erhöhtes Risiko, zu entarten. *Neu/ErbB-2*-mutierte Zellen befinden sich hauptsächlich nahe der Hirn-Nerv-Grenze der Nn. trigemini. Die Kenntnis der Entstehungsregion bietet die Chance, zum Zeitpunkt noch nicht vorhandener histomorphologischer Veränderungen prä-maligne Zellen identifizieren zu können, und macht damit dieses Tumor-Modell anderen überlegen.

In welchem Stadium der Tumorentstehung Mechanismen einsetzen, die in den resistenten BDIV-Ratten nach der EtNU-Exposition am ersten Postnataltag die Ausbildung eines malignen Schwannoms verhindern, war bis Mitte der 90er-Jahre nicht klar.

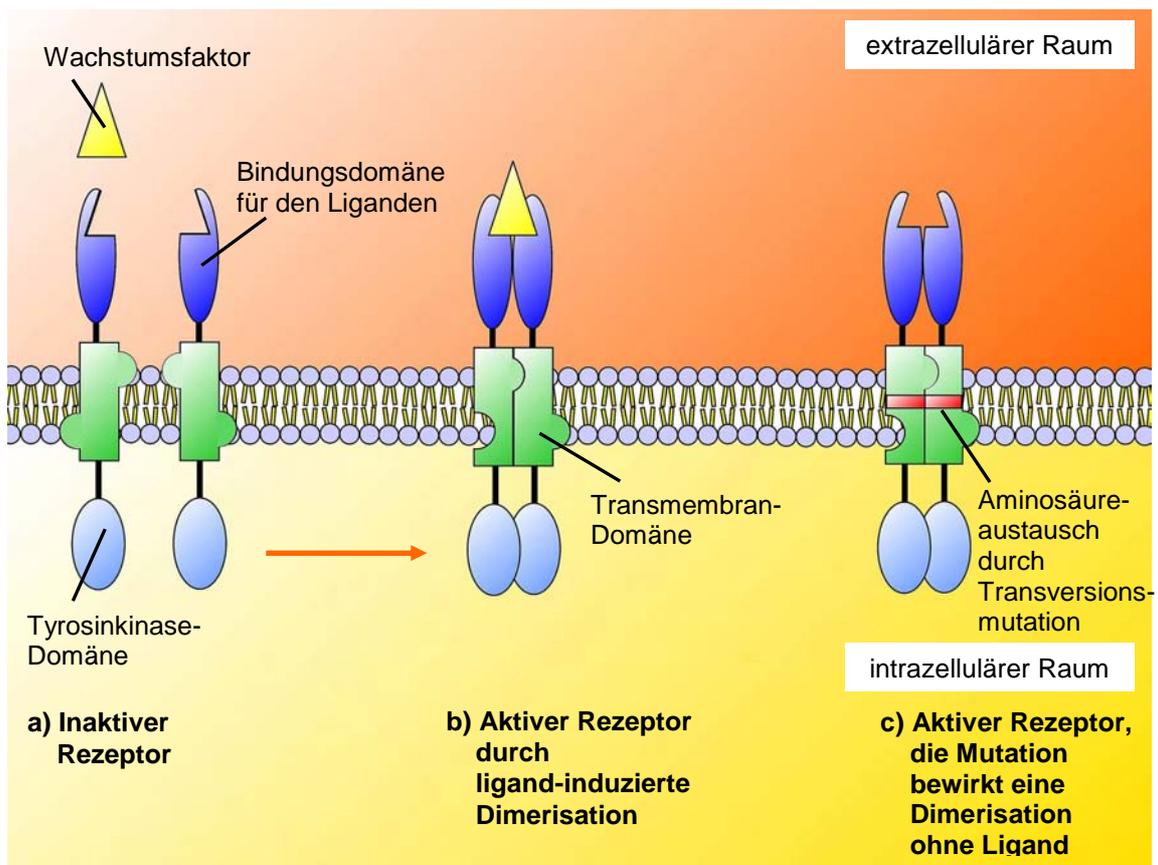


Abbildung 2-2

Schematische Darstellung eines membrangebundenen Wachstumsfaktor-Rezeptors. Eine Punktmutation im kodierenden Gen führt zu einem Aminosäure-Austausch in der Transmembrandomäne. Dadurch kommt es auch ohne die Liganden-Bindung zu einer Dimerisierung und einer daraus folgenden Aktivierung des Rezeptors.

Zunächst wurde vermutet, dass entweder die Schwannschen Zellen der BDIV-Ratten zur Zeit der EtNU-Exposition weniger differenziert und somit unempfindlicher sind, wodurch die Mutation im *Neu/ErbB-2*-Gen nicht oder nur in geringem Maße entstehen kann, oder DNA-Reparaturmechanismen in den BDIV-Ratten in der Lage sind, die entstandenen Schäden im *Neu/ErbB-2*-Gen sofort zu beheben und damit die Weitergabe der Mutationen an die Tochterzellen zu verhindern. Denkbar war aber auch, dass die Proliferationsrate mutierter Zellen EtNU-behandelter BDIV-Ratten zu niedrig ist, um vor Lebensende ein Schwannom entstehen zu lassen, oder dass ein Abbruch der Kanzerogenese während eines frühen Stadiums stattfindet, wie es bei Mammatumoren in Cop-Ratten (KORKOLA and ARCHER, 1999) und bei Kolon-Tumoren in C57BL/6Ha-Mäusestämmen (JACOBY et al., 1994) beobachtet worden war.

Bei der vergleichenden Analyse *Neu/ErbB-2*-mutierter prämaligener Zellen in den nahe der Hirn-Nerv-Grenze lokalisierten Nn. trigemini-Abschnitten unterschiedlich alter EtNU-behandelter BDIX- und BDIV-Ratten stellte sich aber heraus, dass *Neu*-mutierte Allele in beiden Stämmen vorhanden sind.

Doch während der Anteil mutierter Allele in den BDIV-Ratten nach dem Tag 100 langsam kleiner wird und nach dem Tag 260 keine mutierten Allele mehr zu detektieren sind, steigt der Anteil mutierter Allele in den BDIX-Ratten bis zum Tag 180 an. Nach dem Tag 260 waren alle Ratten aufgrund der Ausbildung von Schwannomen getötet worden (Abbildung 2-3).

Die starke Verschiebung des Verhältnisses in den BDIX-Ratten ab dem Tag 70 zugunsten der mutierten Allele resultiert aus dem Verlust des Wildtyp-Alleles (Loss of heterozygosity) während des Prozesses der malignen Transformation (KINDLER-ROHRBORN et al., 1999).

Histomorphologische Untersuchungen der Nn. trigemini bestätigten den Verlust der mutierten Schwannschen Zellen: Während sich in den BDIX-Ratten maligne Schwannome entwickeln, verschwinden die prämaligen Zellen in den BDIV-Ratten wieder, so dass am Tag 180 die Nervenstruktur denen der unbehandelten BDIX-Ratten gleicht (Abbildung 2-4).

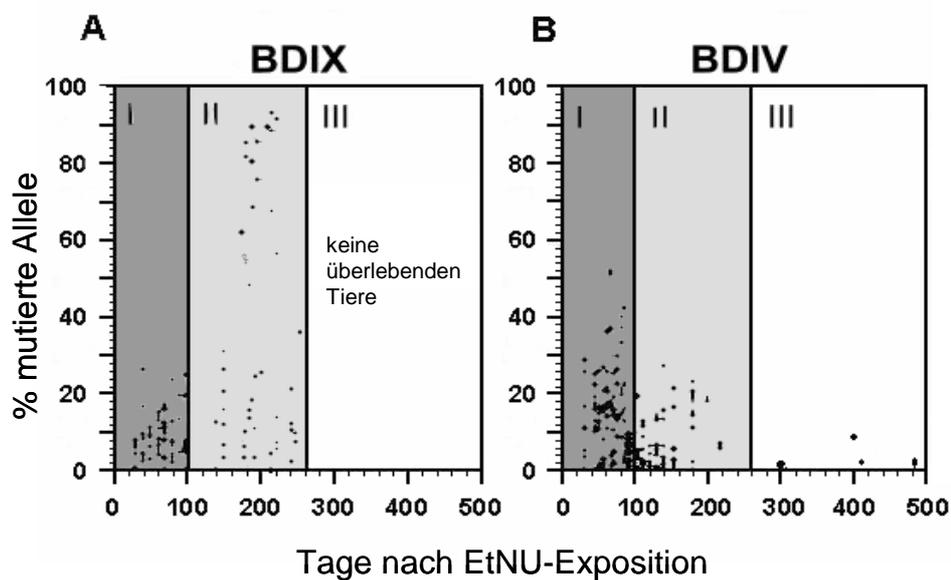


Abbildung 2-3

Anteile mutierter Allele im intrakranialen Anteil der Nn. trigemini von BDIX- (A) und BDIV-Ratten (B) als Funktion der Zeit nach EtNU-Exposition.

Die Zeitachse wurde willkürlich in die Phasen I, II, und III eingeteilt.

A: Alle BDIX-Ratten entwickelten maligne Schwannome und wurden nicht älter als höchstens 260 Tage.

B: Keine der BDIV-Ratten entwickelte maligne Schwannome bis zum Tag 500.

(KINDLER-ROHRBORN et al., 2000)

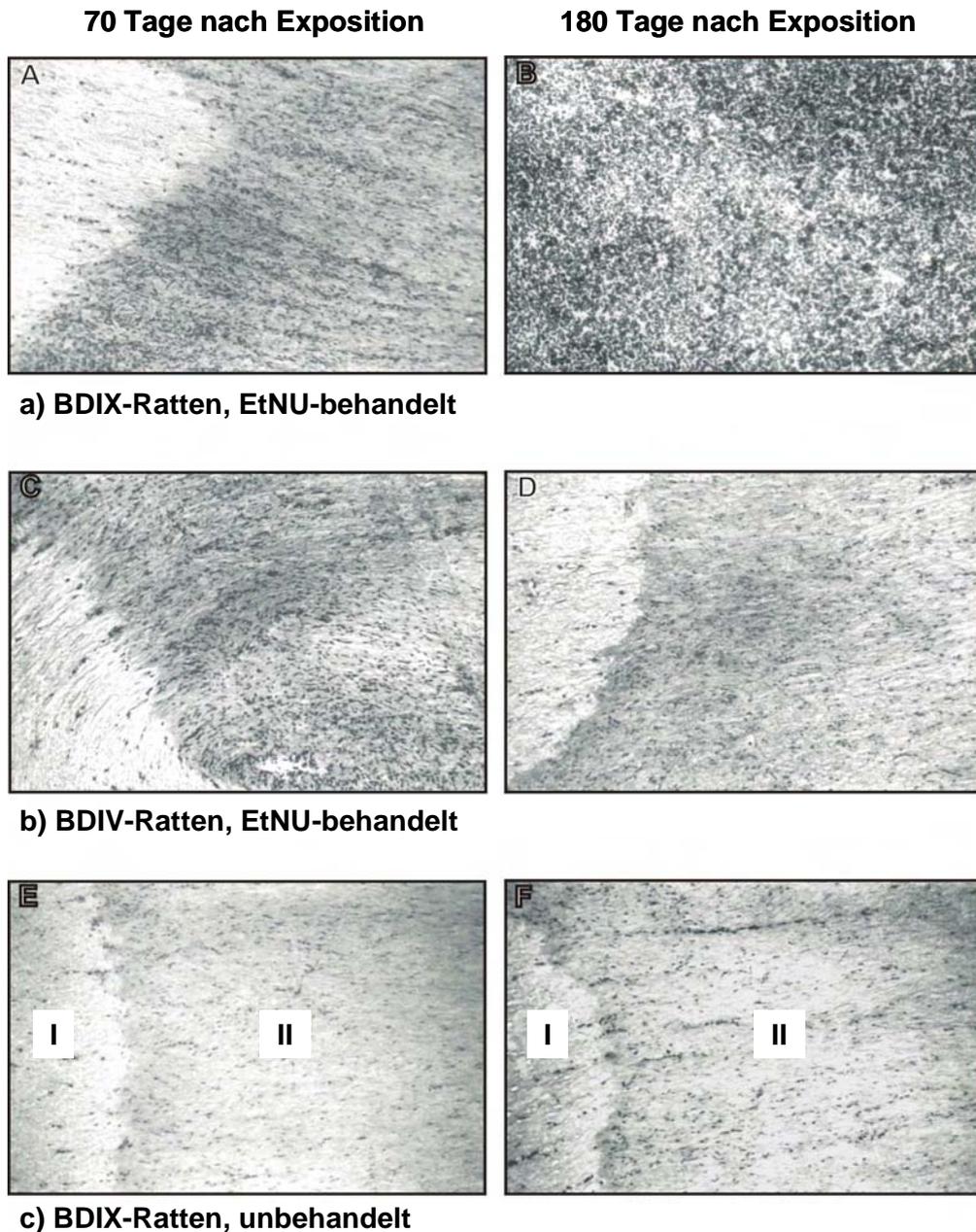


Abbildung 2-4

Morphologie der Nn. trigemini von BDIX-(a) und BDIV-Ratten (b) am 70. bzw. 180. Tag nach EtNU-Exposition und unbehandelten BDIX-Ratten als Kontrollen (c) gleichen Alters.

Die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gefrierschnitte entstammen den intrakranialen Anteilen der Nerven einschließlich der Hirn (I)-Nerv (II)-Grenze.

Sowohl im Nerv der BDIX- als auch der BDIV-Ratte ist am 70. Tag eine erhöhte Kerndichte im Vergleich zum Nerv der unbehandelten Ratte zu erkennen.

Am 180. Tag besitzt der Nerv der EtNU-behandelten BDIX-Ratte das volle Erscheinungsbild eines malignen Schwannoms, während der Nerv der BDIV-Ratte dem der unbehandelten Ratte gleicht.

(KINDLER-ROHRBORN et al., 2000)

Aus diesen Beobachtungen war zu folgern, dass Mechanismen, die der BDIV-Ratte ihre Resistenz verleihen, erst in einer späteren Phase operieren (KINDLER-ROHRBORN et al., 2000).

Bei der Untersuchung der gesamten Nn. trigemini älterer EtNU-behandelter BDIV-Ratten wurden keine mutierten Zellen gefunden. Ein Abwandern der mutierten Zellen in die Peripherie der Nerven als auch die Differenzierung prämaligner Zellen, wie sie in der Leber von Cop-Ratten beobachtet worden war (WOOD et al., 1997), konnten somit als Ursache für das Verschwinden ausgeschlossen werden. Daher kamen nur Effektormechanismen in Frage, die die Beseitigung der prämaligen Zellen aus den Nerven bewirken. Möglich wäre die Einleitung der Apoptose durch zellintrinsische Mechanismen, zum Beispiel infolge der Anhäufung genetischer Schäden oder des Entzugs essentieller Wachstumsfaktoren oder vermittelt durch Wirtsfaktoren wie bestimmten Zellen des Immunsystems (zytotoxische T-Lymphozyten oder Natürliche Killerzellen).

2.4 Die Immunantwort als Effektormechanismus für die Tumoresistenz

Der Verdacht, dass Effektorzellen des Immunsystems befähigt sein könnten, Tumorzellen zu erkennen und zu beseitigen, wurde schon Ende der 50er-Jahre formuliert (BURNET, 1957; THOMAS, 1959). Dabei wurde angenommen, dass transformierte Zellen tumorspezifische Antigene besitzen, die eine Immunantwort auslösen. Da für den Beweis einer Überwachung des Organismus durch das Immunsystem jedoch zu dieser Zeit noch die Möglichkeiten fehlten, geriet diese Theorie in Vergessenheit (DUNN et al., 2002). Noch in dem im Jahr 2000 veröffentlichten Artikel über die „Kennzeichen von Krebs“, der die sechs kritischen Hürden beschreibt, die ein sich entwickelnder Tumor nehmen muss, blieb das Immunsystem unerwähnt (HANAHAN and WEINBERG, 2000).

Mit der Etablierung von Inzucht-Knock-Out-Mäusen erhielt man erste Hinweise auf die überwachende Funktion von Immuneffektorzellen; zum Beispiel entwickelten IFN- γ -defiziente C57BL/6-Mäuse und BALB/c-Mäuse vermehrt Lymphome bzw. Adenokarzinome in der Lunge (STREET et al., 2002).

Bei RAG-2-defizienten Mäusen, denen ein für die Reparatur von DNA-Brüchen benötigtes Enzym fehlt, wodurch das Rearrangement von Lymphozyten-Antigenrezeptoren unmöglich ist, wurde ein vermehrtes Auftreten spontan entstandener epithelialer Tumoren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtet (SHANKARAN et al., 2001).

Auch sprach die Tatsache, dass für eine Transplantation immunsupprimierte Patienten und immundefiziente Menschen vermehrt Tumoren entwickeln, für die Relevanz des Immunsystems bei der Verhinderung der Tumorbildung (GATTI and GOOD, 1971; PENN, 1970).

In vielen Tumoren wurde das Einwandern von Immuneffektorzellen wie CD4-positiven T-Helfer-Zellen, CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, Makrophagen und Natürliche Killerzellen beobachtet (BISSELL and RADISKY, 2001). Welche Funktionen ihnen in den verschiedenen Tumoren zukommen, ist oft noch unklar. Bei einigen Tumorentitäten, zum Beispiel den kutanen Melanomen, scheint die vermehrte Präsenz von Lymphozyten mit der Länge der Überlebenszeit zu korrelieren (CLEMENTE et al., 1996).

Es war bereits gezeigt worden, dass sich im normalen peripheren Nervensystem der Ratte wenige ED1-, ED2-, CD4- und MHC-exprimierende Makrophagen befinden (MONACO et al., 1992). Vergleichende immunhistochemische Untersuchungen der Nn. trigemini EtNU-behandelter BDIV- bzw. BDIX-Ratten und unbehandelter Kontrollratten sollten daher aufdecken, ob Immuneffektorzellen nach der EtNU-Exposition in erhöhter Anzahl in die Nerven nahe der Hirn-Nerv-Grenze einwandern, und dadurch Aufschluss über eine Beteiligung des Immunsystems bei der Beseitigung der prämaligen Schwannschen Zellen geben. Es stellte sich heraus, dass verschiedene Immuneffektorzellen in signifikant erhöhter Anzahl in den Nerven beider EtNU-behandelter Rattenstämme vorkamen, während die Nerven der unbehandelten Kontrollratten nur vereinzelt solche Zellen enthielten. Hierbei handelte es sich um CD18-exprimierende Leukozyten, CD4-exprimierende Makrophagen und T-Helfer-Zellen, CD8-exprimierende zytotoxische T-Lymphozyten und ED1-exprimierende Makrophagen (Abbildung 2-5).

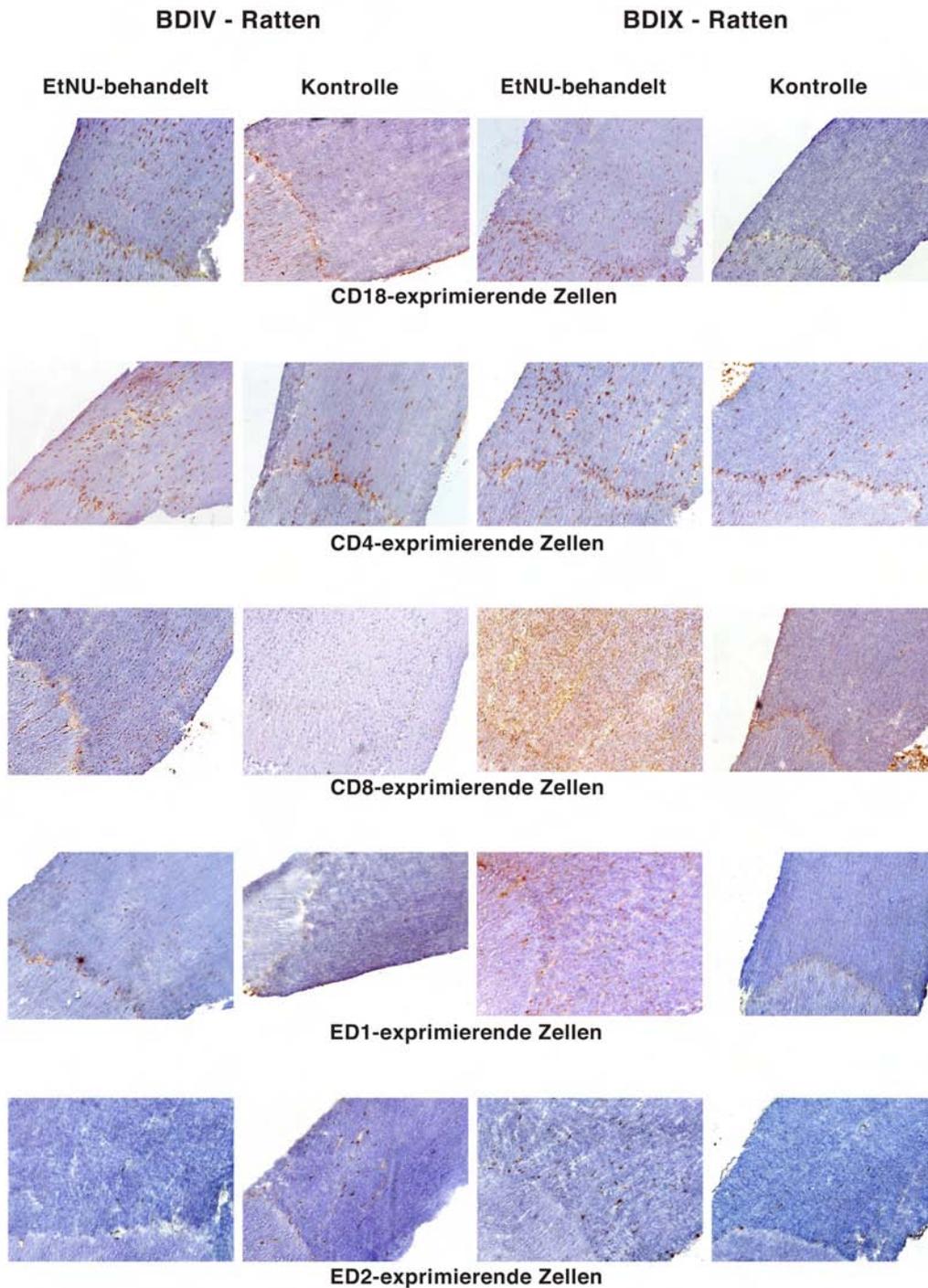


Abbildung 2-5

Immunohistochemisch gefärbte Nn. trigemini 80–250 Tage alter EtNU-behandelter BDIV- und BDIX-Ratten und unbehandelter Kontrollratten beider Stämme.

Während sich in den Nerven EtNU-behandelter Ratten viele CD18-exprimierende Lymphozyten, CD4-exprimierende Makrophagen und T-Helfer-Zellen, CD8-exprimierende zytotoxische T-Zellen und ED1-exprimierende Makrophagen mit DAB anfärben ließen, konnten in den Kontrollratten keine oder nur wenige positive Zellen detektiert werden. ED2-exprimierende Makrophagen kamen nur in den BDIX-Ratten in vermehrter Anzahl im Vergleich zu den Kontrollratten vor.

(GERING et al., 2006, modifiziert)

Der einzige stammspezifische Unterschied betraf die ED2-exprimierenden Makrophagen: Diese Makrophagen waren in den Nerven EtNU-behandelter BDIX-Ratten in signifikant erhöhter Anzahl im Vergleich zu den unbehandelten Tiere des gleichen Stammes zu detektieren, während die Nerven der BDIV-Ratten nach der EtNU-Applikation keinen Anstieg dieser Zellen zeigten. Durch die sich anschließende automatisierte Quantifizierung der gefärbten Zellen und die statistische Auswertung der damit berechneten Zellzahlen pro Flächeneinheit ließ sich der Befund bestätigen (Abbildung 2-6) (GERING et al., 2006).

Die Anzahl *Neu*-mutierter Zellen verringerte sich - nach einer anfänglich starken Zunahme zwischen Tag 30 und 80 in beiden Stämmen - bei der tumor-resistenten BDIV-Ratte zwischen Tag 80 und 90. Da die T-Lymphozyten und Makrophagen in diesem Zeitraum bereits anwesend waren, war eine durch sie vermittelte Elimination mutierter Zellen vorstellbar. Welcher Mechanismus dabei aber die stammspezifische Tumorempfindlichkeit vermittelte, ließ sich aus diesen Beobachtungen nicht schlussfolgern. Unterschiede zwischen den zwei Stämmen könnten darin liegen, dass Immuneffektorzellen in unterschiedlichem Maße funktionsfähig sind. Die prä-malignen Zellen der BDIX-Ratten könnten aber auch befähigt sein, die Immunzellen zu hemmen oder sich ihrem Angriff zu entziehen, wie es für eine Vielzahl von Tumoren bereits beschrieben wurde. Die Präsenz ähnlicher Mengen von Immuneffektorzellen in den Nn. trigemini tumorsuszeptibler BDIX-Ratten konnte jedoch auch zu dem Schluss führen, dass die Immuneffektorzellen das Gewebe zwar invadieren, für die Beseitigung der prä-malignen Zellen in den BDIV-Ratten aber nicht verantwortlich sind.

Offen blieb nach dieser Untersuchung auch, zu welchem Zeitpunkt die Immuneffektorzellen in die Nn. trigemini einwandern, da sie am Tag 80 schon in erhöhter Zahl vorhanden waren. Diese Kenntnis könnte Hinweise auf zeitliche Abfolgen in der Tumorentstehung und Tumorbekämpfung geben.

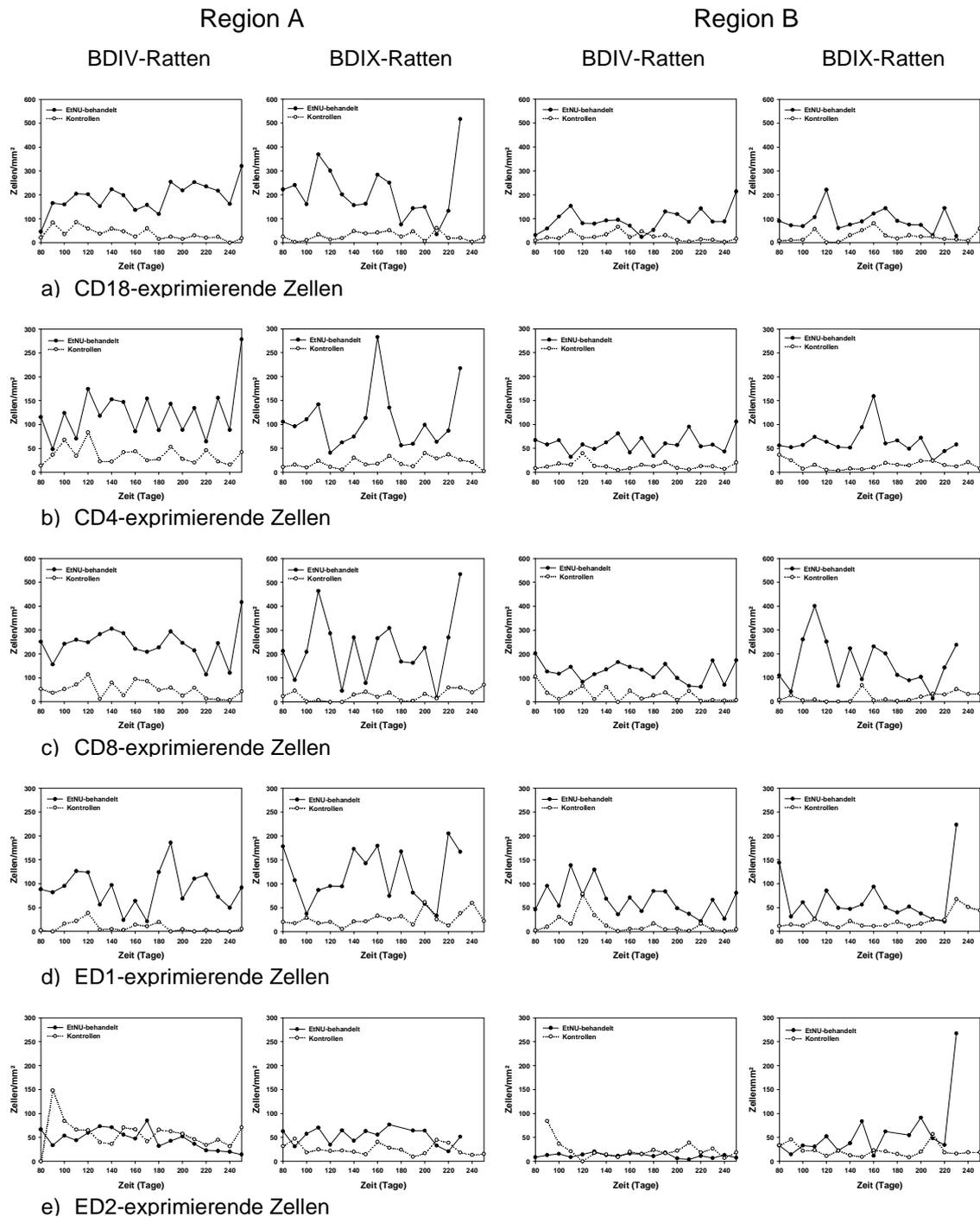


Abbildung 2-6

Anzahl detektierter Zellen des Immunsystems pro mm^2 in den Nn. trigemini-Regionen A (nahe der Gehirn-Nerv-Grenze) und B (restlicher intrakranialer Anteil) unterschiedlich alter Ratten. Die Zellzahlen der EtNU-behandelten Ratten (durchgezogene Kurven) wurden mit denen der unbehandelten Kontrollratten (gestrichelte Kurven) gleichen Stammes verglichen. CD18-, CD4-, CD8- und ED1-exprimierende Zellen (a - d) sind in den Nerven sowohl der BDIX- als auch der BDIV-Ratten zu allen untersuchten Zeitpunkten nach EtNU-Applikation in deutlich erhöhter Zahl zu detektieren. Dagegen kommen ED2-exprimierende Zellen (e) nur in den Nerven der EtNU-behandelten BDIX-Ratten in signifikant erhöhter Zahl vor. (GERING et al., 2006, modifiziert)

3. Material und Methoden

3.1 Haltung und Züchtung der BDIV- und BDIX-Inzuchtratten

Die Ratten der Inzuchtstämme BDIV und BDIX (DRUCKREY, 1971) wurden in der SPF-Tierversuchsanlage des Instituts für Zellbiologie in Essen unter 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus bei 55% (\pm 5%) Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 21°C (\pm 1°C) gehalten. Sie erhielten standardisierte Nahrung (Ratte-Maus-Zuchtfutter 1314, Altromin) und filtriertes und mit Salzsäure angesäuertes Wasser ad libitum.

Die Tiere wurden für 24 Stunden verpaart. Um den Geburtszeitpunkt möglichst genau festlegen zu können, wurden die trächtigen Weibchen mehrmals täglich kontrolliert.

3.2 Induktion von Tumoren des Nervensystems mittels N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff

Den Jungtieren beider Stämme wurde am ersten Postnataltag eine einmalige Dosis N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (EtNU; 80 μ g/g Körpermasse), gelöst in Mc Ilvaine-Puffer (1 mg/ml), im Bereich der Rückenhaut subkutan appliziert.

3.3 Thymektomie von BDIV- und BDIX-Ratten

Um hinsichtlich der T-Zell-Antwort immunologisch inkompetente Ratten zu erhalten, wurde neugeborenen Tieren der Thymus entnommen und somit die Reifung der T-Lymphozyten verhindert.

Die Thymektomie fand in der Tierversuchsanlage des Instituts für Zellbiologie in Essen statt. Sie wurde in Anlehnung an die in „Experimental and surgical technique in the rat“ von H.B. Waynforth und P.A. Flecknell (WAYNFORTH, 2001) beschriebene Methode für neonatale Ratten durchgeführt. Etwa zwei Stunden nach der EtNU-Applikation wurden die Ratten beider Stämme mittels Unterkühlung narkotisiert, indem sie für ca. 5 Minuten auf gestoßenes Eis (0 bis 4°C) gelegt sowie damit bedeckt wurden. Sobald sich die Ratten nicht mehr bewegten, wurden sie mit einem Tupfer trocken gerieben, auf einen auf Eis gelagerten und von einer sterilen Folie bedeckten Metallblock unter ein Stereo-Operationsmikroskop mit 75-facher Vergrößerung in Rückenlage mit zum

Operateur zeigendem Kopf mit drei aus Operationsfolie geschnittenen Klebestreifen fixiert, welche über das Kinn und die beiden Vordergliedmaßen geklebt wurden.

Die Hautinzision erfolgte nach großzügiger Desinfektion des Operationsfeldes in der Medianen von kaudal nach kranial durch einen ca. 1,5 cm langen Schnitt mit einem Skalpell über dem kranialen Teil des Brustbeins. Das sich kranial des Manubrium sterni befindende Unterhautbindegewebe wurde kopfwärts geschoben, so dass der Brusthöhleneingang sichtbar wurde. Darauf wurden die Mm. pectorales, einer der Mm. sternohyoidei, die Clavicula und ersten zwei bis drei Rippen mit einer gebogenen Pinzette erfasst und mittels einer spitzen Irisschere links oder rechts nahe dem Brustbein durchtrennt. Als Spreizer wurde eine Mikropinzette vom Uhrmachertyp verwandt, deren Spitzen zuvor nach außen gebogen worden waren und deren Griff zwischen den zwei Armen eines stumpfen Wundspreizers nach Alm mit Klebestreifen fixiert wurde, um eine Auflagefläche zu schaffen. Dieser wurde so eingesetzt, dass der ganze Thymus sichtbar wurde und die kranialen Ränder der Lungenlappen und des Herzens noch zu erkennen waren. Um den Thymus ergreifen zu können, wurde in einem Braunülenschlauch, der über einen Infusionsschlauch und ein als Schleimfalle dienendes Trachea-Sekretprobenset an eine Pumpe angeschlossen war, ein Unterdruck erzeugt. So konnte der Thymus durch Ansaugen erfasst und unter Schonung der dorsal des Thymus gelegenen großen Gefäße durch leichten Scherenschlag mit einer Mikro-Federschere nach Jacobson vom umliegenden Bindegewebe befreit und herausgenommen werden.

Nachdem der Spreizer entfernt worden war, erfolgte der Verschluss der Inzision durch eine fortlaufende Naht nach Kürschner mit resorbierbarem monofilen 6/0 Polydioxanon-Nahtmaterial und einer runden Nadel, wobei Haut, Unterhaut und Brustmuskulatur gleichzeitig erfasst wurden. Anschließend wurde die Naht mit Gewebekleber bestrichen.

Die Körpertemperatur der Ratten wurde danach unverzüglich wieder erhöht, indem die Tiere auf ein Wärmekissen gelegt und zusätzlich mit einer Rotlichtlampe bestrahlt wurden. Die Umgebungstemperatur lag dort bei ca. 40°C und wurde ständig mit einem Thermometer überprüft. Setzte die Atmung

verzögert ein, wurden die Ratten zusätzlich durch eine leichte Massage des Brustkorbes zum Atmen animiert. Sobald die Tiere regelmäßig atmeten und eine Körpertemperatur von ungefähr 38°C erreicht hatten, wurden sie für ein bis zwei Stunden auf eine zweite Wärmematte mit einer Umgebungstemperatur von ca. 37°C gelegt, bevor sie in der sich im Käfig des Muttertieres befindenden benutzten Streu gewälzt und dann zum Muttertier zurückgegeben wurden. In Abbildung 3-1 sind Bilder der Thymektomie zusammengestellt.

3.4 Tötung und Sektion erkrankter oder zur Gewebeentnahme gehaltener Tiere und Präparation der Nn. trigemini

Die unter Langzeitbeobachtung stehenden Ratten beider Stämme wurden in einem Plexiglas-Behälter mit Kohlendioxid getötet, sobald sie Erkrankungsmerkmale aufwiesen. Sie wurden daraufhin unter besonderer Berücksichtigung der Nn. trigemini, des Gehirns, des Rückenmarks und der abgehenden Nerven, der abdominal gelegenen Nerven und eventuell vorhandener Tumoren im gesamten Körper seziiert. Bestand bei einem Tumor der Verdacht, dass es sich um ein Schwannom handelte, wurde das Gewebe für die weitere Untersuchung vorsichtig freipräpariert.

Die Ratten, deren Nn. trigemini für histologische Untersuchungen bestimmt waren, wurden auf dieselbe Art zu den entsprechenden Zeitpunkten getötet, woraufhin die Nn. trigemini herauspräpariert wurden. Erkrankten die Tiere vor dem geplanten Tötungszeitpunkt, so wurden sie getötet und zusätzlich auf ihre Erkrankungsursache hin untersucht.

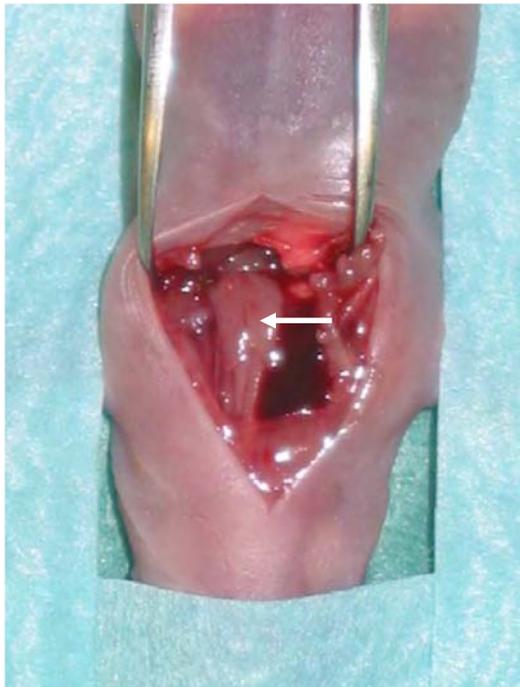
Der intrakraniale Anteil der Nn. trigemini wurde unter dem Stereo-Operationsmikroskop bei einer 75-fachen Vergrößerung herauspräpariert. Zuvor waren das Gehirn nach Absetzen des Kopfes und Eröffnung der Schädelhöhle mit einer Knochenschere sowie die Nn. trigemini bedeckenden Meningen mittels Kanülen vorsichtig entfernt worden. Die Nerven wurden dabei am distalen Ende des intrakranialen Anteils mit einer Mikro-Pinzette gefasst und mit einer gebogenen Mikro-Federschere herausgeschnitten.



a)



b)



c)



d)

Abbildung 3-1

- a) Operationsbesteck
- b) Fixation der Ratte
- c) Eröffnete Brusthöhle mit freigelegtem Thymus (Pfeil)
- d) Verschluss der Inzision durch eine fortlaufende Naht und Gewebekleber

Anschließend wurden die Nerven entweder in 4%iger Formaldehydlösung fixiert oder in Kryoröhrchen überführt, in Flüssigstickstoff schockgefroren, in Trockeneis transportiert und schließlich bei -80°C gelagert.

3.5 Präparation der Lnn. mesenteriales und der Milz

Für die Präparation der Lnn. mesenteriales und der Milz wurden die getöteten Ratten in Rückenlage gebracht, mit Kanülen fixiert und die Bauchhöhle eröffnet. Anschließend wurde das Dickdarmgekröse zwischen Caecum und Duodenum aufgesucht und die sich dort befindenden Lnn. mesenteriales aus dem Fettgewebe freipräpariert oder die Milz von ihrer Aufhängung gelöst und entnommen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C in Kryoröhrchen, nachdem das Gewebe in Flüssigstickstoff schockgefroren und in Trockeneis transportiert worden war.

3.6 Anfertigung und Lagerung von Gefrierschnitten

Die Herstellung der Gefrierschnitte erfolgte an einem Microm-Kryostat. Nach dem Auffrieren der Gewebestücke auf einem vorgekühlten Metallblock mit Tissue-Tek entstanden durch Schneiden bei -22°C $8\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte, die auf SuperFrost-Objektträger aufgezogen wurden.

Handelte es sich bei dem zu schneidenden Gewebe um Nerven, so wurden diese longitudinal angeschnitten und je zwei Schnitte quer auf einem Objektträger platziert.

Nach einer Lufttrocknung über Nacht wurden die Schnitte in Alufolie verpackt und bei -80°C gelagert.

3.7 Histologische Färbungen

3.7.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung der Nn. trigemini

Die Färbung erfolgte durch Eintauchen der Gefrierschnitte in folgende Reagenzien:

Protokoll 3-1

Schritt	Lösung	Bedingung
Fixierung	Aceton-Methanol-Gemisch (1:1)	15 Sekunden
Färbung	Hämatoxilinlösung	1 Minute
Spülung und Bläuung	fließendes Leitungswasser	1 Minute
Färbung	Eosin-Lösung, 1%ig	1 Minute
Entfärbung und Entwässerung	100% Alkohol	2 x 10 Sekunden
	Isopropanol	2 x 10 Sekunden
	Xylol	2 x 1 Minute

Darauf wurden die Gefrierschnitte mit Corbitbalsam eingedeckt.

3.7.2 Versilberung der Retikulinfasern in Tumorgewebsschnitten nach Novotny, modifiziert

Die Gefrierschnitte wurden für 10 Minuten in Aceton bei 4°C fixiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurden sie nach folgendem Protokoll gefärbt:

Protokoll 3-2

Schritt	Lösung	Bedingung
Oxidation	Kaliumpermanganat	10 Minuten
	dest. Wasser	1 Minute
	1%ige Oxalsäure-Lösung	2 Minuten
	dest. Wasser	1 Minute
	fließendes Wasser	5 Minuten
Vorbehandlung	dest. Wasser	1 Minute
	2,5%ige Eisenalaun-Lösung	10 Minuten
	dest. Wasser	1 Minute
	fließendes Wasser	5 Minuten

Protokoll 3-2, Fortsetzung

Imprägnation	A. bidest	2 x 2 Minuten
	Ammoniakalische Silberlösung (Silber gelöst in A. bidest und Ethanol)	15 Minuten
	Absolutes Ethanol	10 Sekunden
Reduktion	Reduktionslösung (Formalin, A. bidest, Ethanol, 1%ige Essigsäure)	kräftig Spülen
	Reduktionslösung	10 Minuten
	fließendes Wasser	5 Minuten
Vergoldung	A. bidest	2 x 2 Minuten
	0,1-0,2%ige Goldchloridlösung	10 Minuten
	dest. Wasser	1 Minute
Fixieren	5%ige Natriumthiosulfatlösung	5 Minuten
	fließendes Wasser	5-10 Minuten
Kernfärbung	Kernechtrot	3 Minuten
Spülung	dest. Wasser	kräftig

Danach wurden die Gefrierschnitte in Xylol entwässert und mit Corbitbalsam eingedeckt.

3.8 Immunhistochemische Färbungen

3.8.1 Färbung von CD4-, CD8-, CD18-, ED1-, ED2-, CD161- und $\alpha\beta$ TCR-exprimierenden Zellen

Es wurden Gefrierschnitte verwendet, die aus ähnlichen Schnittebenen der N. trigemini stammten. Bei jeder Färbung wurde die Fähigkeit des Antikörpers, spezifisch zu binden, auf Mesenteriallymphknoten- oder Milz-Gewebe von BDIV- oder BDIV-Ratten überprüft. Als Negativkontrolle wurden Nerven mit Antikörper-Verdünner statt eines Primärantikörpers inkubiert. Der Kontrollantikörper war gegen das Filament-Protein Vimentin gerichtet, der in Schwanschen Zellen exprimiert wird.

Die bei -80°C gelagerten Gefrierschnitte wurden 10 Minuten an die Raumtemperatur adaptiert und nach nachfolgendem Protokoll gefärbt. Sämtliche Inkubationen und die Entwicklung erfolgten dabei in einer feuchten dunklen Kammer.

Protokoll 3-3

Schritt	Reagenz	Reaktionsbedingung
Fixierung	Aceton	10 Minuten, Raumtemperatur
Trocknung		5 Minuten, Raumtemperatur
Eingrenzung des Gewebes	Fettstift (DAKO-Pen)	
Blockierung der unspezifischen Bindungen	5%iges bovines Serum Albumin in PBS	20 Minuten, Raumtemperatur, Abschütten
Antikörper-Inkubation (Primär-Antikörper)	Anti-CD18-, -CD4-, -CD8-, -ED1-, -ED2-, - α β TCR-, -Vimentin-, -CD161-Antikörper	1 Stunde, Raumtemperatur bzw. über Nacht, 4°C (CD161)
Waschung	PBS	3 x 5 Minuten
Antikörper-Inkubation (Sekundär-Antikörper)	Biotin-konjugierter Ratte-anti-Maus-IgG-Antikörper	40 Minuten, Raumtemperatur
Waschung	PBS	3 x 5 Minuten
	AB-Komplex	30 Minuten Raumtemperatur
Waschung	PBS	3 x 5 Minuten
Entwicklung	DAB	8 Minuten, Raumtemperatur
Waschung	Leitungswasser	5 Minuten
Gegenfärbung	Hämatoxilin	20 Sekunden
Spülung und Bläuung	fließendes Leitungswasser	5 Minuten
Entwässerung	70% Alkohol	1 x 2 Minuten
	90% Alkohol	2 x 2 Minuten
	100% Alkohol	2 x 2 Minuten
	Isopropanol	5 Minuten
	Xylol	2 x 2 Minuten
Eindecken	Corbitbalsam, Deckgläschen	1 Tropfen pro Schnitt

Die Antikörper wurden mit 1%igem fetalen Kälberserum in PBS verdünnt und in einer Menge von ca. 100-200 μ l auf die Gefrierschnitte aufgetragen. Der Avidin-Biotin-Komplex wurde nach Anweisung des Herstellers 30 Minuten zuvor in der Verdünnung 1:100 angesetzt und bei 4°C gelagert, die Tabletten des DAB-Peroxidase-Tabletten-Sets nach Angaben des Herstellers 20 Minuten vor Gebrauch in 1 ml Aqua bidest durch Schütteln gelöst.

3.8.2 Färbung S100-positiver Zellen

Gefärbt wurden Gefrierschnitte von Tumoren nach folgendem Protokoll. Als Kontrollgewebe dienten Trigemiusnerven, die statt mit Paraformaldehyd mit Aceton für 10 Minuten fixiert und nicht mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden. Diese wurden darauf sowohl mit als auch ohne Primärantikörper inkubiert.

Protokoll 3-4

Schritt	Reagenz	Reaktionsbedingung
Fixierung	4%iges Paraformaldehyd	über Nacht, 4°C
Waschung	PBS	3 x 5 Minuten
Blockierung der endogenen Peroxidase	30%iges Wasserstoffperoxid + Methanol + A. bidest. (1:1:8)	30 Minuten, Raumtemperatur
Waschung	PBS	3 x 5 Minuten
Eingrenzung des Gewebes	Fettstift (DAKO-Pen)	
Blockierung der hydrophoben Bindungen	5%iges bovines Serum Albumin in PBS	20 Minuten, Raumtemperatur
Antikörper-Inkubation (Primär-Antikörper)	Anti-S100-Antikörper	1 Stunde, Raumtemperatur
Waschung	PBS	3 x 5 Minuten
Antikörper-Inkubation (Sekundär-Antikörper)	Biotin-konjugierter Ziegen-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	40 Minuten, Raumtemperatur
Waschung	PBS	3 x 5 Minuten
	AB-Komplex	30 Minuten Raumtemperatur
Waschung	PBS	3 x 5 Minuten
Entwicklung	DAB	8 Minuten, Raumtemperatur
Waschung	Leitungswasser	5 Minuten
Gegenfärbung	Hämatoxilin	20 Sekunden
Spülung und Bläuung	fließendes Leitungswasser	5 Minuten
Entwässerung	70% Alkohol	1 x 2 Minuten
	90% Alkohol	2 x 2 Minuten
	100% Alkohol	2 x 2 Minuten
	Isopropanol	5 Minuten
	Xylol	2 x 2 Minuten
Eindecken	Corbitalsam, Deckgläschen	1 Tropfen pro Schnitt

3.8.3 Quantifizierung der gefärbten Zellen

3.8.3.1 Computerunterstützte Auswertung

Eine automatisierte Zählung der immunhistochemisch gefärbten Zellen in den Nn. trigemini erfolgte mit Hilfe des ACAS ICH-Systems (Dr. Olaf Ahrens), welches aus einem Leitz Orthoplan Mikroskop mit 20er Plan-Objektiv, einer CCD Kamera (JVC TK 870), einem elektrisch bedienbaren Objektträgertisch und der computergestützten ICH-Software bestand.

Mit dem System konnten sowohl die absoluten Zellzahlen als auch die Flächen der Nervenanschnitte gemessen und somit die Zellen pro Flächeneinheit bestimmt werden.

Der Objektträger jedes Nervenschnitts wurde in gleicher Weise auf dem Objektträgertisch befestigt, so dass der longitudinal angeschnittene Nerv im mikroskopischen Bild von oben nach unten reichte und der Gehirnrest an der Hirn-Nerv-Grenze nach unten zeigte. Um ein Bild des gesamten Nervs in einer Vergrößerung zu erhalten, die zur Erfassen der gefärbten Zellen geeignet war, wurde der Nerv stückweise mit dem Scanner eingelesen, indem der Objektträgertisch sich mitsamt des Nervs softwaregesteuert unter dem Mikroskop bewegte und die Kamera dabei 240 Bilder machte. Diese wurden dann mit Hilfe der Software zu einem Bild zusammengesetzt.

Der Nerv wurde willkürlich in zwei Regionen geteilt, welche als zu messende Flächen in dem ICH-Auswertungsprogramm mit Linien eingegrenzt wurden. Dabei war Region A die Fläche, die von der Hirn-Nerv-Grenze 354 μm in die Peripherie reichte (zwei Kameraeinstellungen). Region B wurde definiert als der restliche intrakranial gelegene Anteil des Nervs unter Aussparung der Ganglien und des Seitenastes (Abbildung 3-2 a).

Die Flächen der Regionen wurden in Pixel bestimmt und auf mm^2 umgerechnet. Dann wurden alle Pixel in einer Region summiert, die wegen ihres für gefärbte Zellen zuvor definierten Farbtons (brauner Niederschlag des DAB-Reagenz) vom Programm als positiv erkannt worden waren. Die Gesamtpixelzahl positiver Zellen einer Region wurde darauf durch die Durchschnittspixelzahl einer gefärbten Zelle geteilt. Diese war zuvor für jede Zellart bestimmt worden, indem die Flächenpixel von jeweils 100 Zellen gemessen worden waren und daraus

der Mittelwert berechnet worden war. So erhielt man die Anzahl gefärbter Zellen in einer Region und nach Umrechnung pro Flächeneinheit.

Nachdem die Zellzahlen pro Region und Nerv bestimmt worden waren, wurden die Mittelwerte pro Tier (beider Nn. trigemini) und anschließend die Mittelwerte von Ratten gleichen Alters, Stammes und gleicher Behandlung gebildet.

3.8.3.2 Auszählung im Mikroskop mit Netzmikrometer

Durch die Auszählung der in einem Raster gelegenen gefärbten Zellen in einem Gewebeschnitt konnte deren Anzahl auf eine definierte Fläche und nach Umrechnung auf die Flächeneinheit (mm^2) bezogen werden.

Das verwendete Mikroskop besaß ein Okular mit Netzmikrometer, dessen Raster aus einem Großquadrat (12,5 mm x 12,5 mm) und 10 x 10 Kleinquadraten (1,25 mm x 1,25 mm) bestand. Bei der verwendeten 200fachen Vergrößerung mit einem 20er Objektiv entsprach der im Raster zu betrachtende Gewebeabschnitt damit einer Fläche von 0,625 mm x 0,625 mm.

Die Objektträger wurden so auf dem Tisch des Mikroskops platziert, dass die Nervenanschnitte von oben nach unten zeigten. Die Nerven wurden in die Regionen A und B (Definition siehe 3.8.3.1) geteilt, indem mit Hilfe des Rasters eine Länge von 350 μm abgeschätzt wurde. Das Raster wurde auf allen Nerven an den gleichen Stellen durch eine Orientierung an den seitlichen Nervrändern platziert - in Region A einmal und in Region B zweimal (Abbildung 3-2 b) - um sich zufällig im Raster befindende Zellen auszuwählen. Ausgezählt wurden in Region A 50 ganze und 10 halbe und in Region B 200 Kleinquadrate. Die in diesen Quadraten gezählten Zellen wurden umgerechnet auf eine Fläche von einem mm^2 . Nach der Bestimmung des Mittelwertes aus den Werten beider Nerven einer Ratte wurde wiederum der Mittelwert aller Ratten gleichen Alters berechnet.

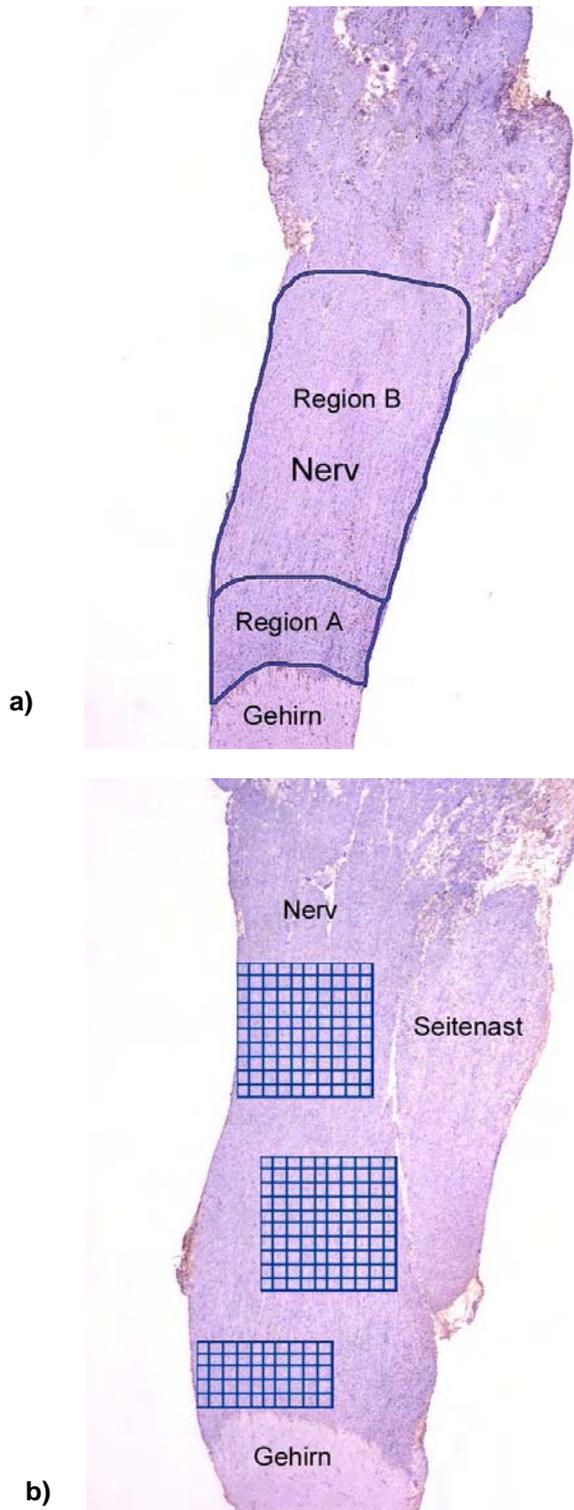


Abbildung 3-2

- a) Einteilung des intrakranialen Anteils eines N. trigeminus in die Regionen A und B.
- b) Positionierung des Rasters über den zwei Regionen des N. trigeminus.

3.9 Analyse von T-Lymphozyten-Populationen im Blut mittels Durchflusszytometrie

Die Detektion des Anteils peripherer T-Lymphozyten an der Gesamtleukozytenzahl im Blut erfolgte durch die Isolierung der Leukozyten, anschließende Färbung der T-Lymphozyten mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern und Zählung der fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Zellen im Fluoreszenzaktivierten Zell-Sortierer (FACS).

3.9.1 Blutentnahme

Für die Entnahme wurden die Tiere durch die Inhalation eines Gasgemisches aus Isofluran, Lachgas und Sauerstoff zuerst in einem Plexiglas-Behälter und anschließend mit einer Narkosemaske in Form einer 50 ml-Spritze narkotisiert. Sobald eine ausreichende Narkosetiefe erreicht worden war, wurde mit einer heparinbeschichteten Glaskapillare der Plexus ophthalmicus punktiert und die Menge von ca. 1,5 ml Blut pro Tier entnommen. Das so gewonnene Blut wurde in Heparin-Röhrchen aufgefangen und auf Eis transportiert.

3.9.2 Isolierung der Leukozyten aus dem Blut

Die verschiedenen im peripheren Blut vorkommenden Zellen des hämatopoetischen Systems lassen sich durch eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Paque-Plus-Lösung auftrennen. Dabei wird die Ficoll-Lösung mit einer Blutprobe überschichtet und zentrifugiert. Lymphozyten, Thrombozyten und Monozyten befinden sich wegen ihrer geringen Dichte an der Grenze von Blutserum zu Ficoll-Lösung, während Erythrozyten und Granulozyten auf den Boden des Gefäßes sinken.

Das Blut jedes Tieres wurde mit 1,5 ml PBS-Puffer gemischt und vorsichtig in ein 5 ml-Polystyren-Röhrchen, in dem sich 2 ml Ficoll-Reagenz befanden, pipettiert. Dann wurden die Proben aller Tiere bei 400 x g und 18°C für 40 Minuten in der Zentrifuge aufgetrennt. Die oberste Schicht wurde vorsichtig abpipettiert und die darunter liegende, die Lymphozyten enthaltende Schicht in ein 15 ml-Polystyren-Röhrchen überführt. Die isolierten Zellen wurden jeweils mit 6 ml PBS gewaschen und bei 100 x g für 10 Minuten zentrifugiert.

Ein zweiter Waschschrift erfolgte auf dieselbe Art. Nach Abgießen des Überstandes wurde vorsichtig noch soviel Puffer abpipettiert, dass sich ca. 50 µl in jedem Röhrchen befanden. Die Zahlen der Leukozyten pro Röhrchen wurden in einer Neubauer-Kammer bestimmt und die Proben auf die benötigte Leukozytenzahl eingestellt.

3.9.3 Färbung der Lymphozyten

3.9.3.1 Färbung von $\alpha\beta$ T-Lymphozyten

Die Zellen (ca. 1,5 Millionen pro Röhrchen) wurden in jeweils 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Zu den Proben der thymektomierten Ratten sowie zwei Proben euthymischer Kontroll-Ratten wurde jeweils 1 µl des monoklonalen R-Phycoerythrin-konjugierten Maus-anti-Ratten- $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor-Antikörpers hinzu pipettiert. Die Probe einer euthymischen Ratte erhielt stattdessen 1 µl der R-Phycoerythrin-konjugiertes Maus-IgG1,k als Isotypenkontrolle und eine weitere keinen Antikörper. Die Zellen wurden bei 4°C für 30 Minuten inkubiert und anschließend zweimal mit je 3 ml FACS-Puffer gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation bei 1200 U/min und 4°C für 10 Minuten wurden die Überstände abgeschüttet und aus jedem Röhrchen der noch verbliebene Überstand abpipettiert. Zuletzt wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer und 100 µl 4%igem Paraformaldehyd aufgenommen.

3.9.3.2 Doppelfärbung von $\alpha\beta$ T-Lymphozyten, CD4-positiven und CD8-positiven Zellen

Für die Doppelfärbung wurde die Zellzahl auf ca. 700000 Zellen pro Röhrchen eingestellt. Diese wurden in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Es folgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen durch die Zugabe von je 10 µg Maus-IgG für 10 Minuten bei 4°C. Dann wurden die Zellen in 2 ml FACS-Puffer gewaschen, bei 1200 U/min und 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert, so dass noch ca. 100 µl in jedem Röhrchen verblieben. Hierzu wurden die Antikörper nach dem unten dargestellten Schema pipettiert und die Zellen eine Stunde bei 4°C inkubiert.

Protokoll 3-5 a

Proben	Monoklonale Antikörper		
	R-Phycoerythrin-konjugiert, Maus-anti-Ratte- $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor	Fluorescein-Isothiocyanate-konjugiert, Maus-anti-Ratte-CD4	Biotin-konjugiert, Maus-anti-Ratte-CD8b
Kontrollratte 1	-	-	-
Kontrollratte 2	-	-	-
Kontrollratte 3	2,5 μ l	-	-
Kontrollratte 4	-	1 μ l	-
Kontrollratte 5	-	-	1,5 μ l
Kontrollratte 6	2,5 μ l	1 μ l	1,5 μ l
Zu analysierende Ratten	2,5 μ l	1 μ l	1,5 μ l

Die Zellen wurden durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer und Zentrifugieren bei 4°C und 1200 U/min für 10 Minuten gewaschen. In jedem Röhrchen verblieben mit den Zellen noch ca. 100 μ l Puffer, zu dem gegebenenfalls das Sekundär-Reagenz Streptavidin-A647 in der Verdünnung 1:500 hinzugefügt und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert wurde.

Protokoll 3-5 b

Proben	Menge
Kontrollratte 2	0,2 μ l
Kontrollratte 5	0,2 μ l
Kontrollratte 6	0,2 μ l
Zu analysierende Ratten	0,2 μ l

Die Zellen wurden erneut gewaschen und in 500 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Darauf wurden die Zellsuspensionen durch eine Filtrier-Folie in FACS-Röhrchen überführt und die Proben wie unten beschrieben gemessen.

Nachdem alle Proben untersucht worden waren, wurden zu jeder Probe 2,5 μ l des 1:10 vorverdünnten Propidiumiodids zur Markierung toter Zellen (Endverdünnung 1:2000) zugegeben und die Proben nach 5 Minuten erneut gemessen.

3.9.4 Messung im Fluoreszenzaktivierten Zell-Sortierer

Die Zellsuspensionen wurden mit Hilfe des Fluoreszenzaktivierten Zell-Sortierers FACS-Calibur™ Flow Cytometer und der Software CellQuest™ Pro untersucht.

Durch die Einstellung der Laser mit den einfach oder nicht gefärbten Proben der euthymischen Kontrollratten wurde die differenzierte Betrachtung der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe möglich, so dass neben der Messung aller sich in der Suspension befindenden Zellen die Intensitäten der zellassoziierten Fluoreszenzen bestimmt werden konnten.

3.9.5 Auswertung

Die Messwerte der, wie unter Abschnitt 3.10.2 beschrieben, einfach gefärbten Lymphozyten wurden mit Hilfe der Software CellQuest™ Pro ausgewertet.

Aufgrund ihrer spezifischen Größe und Granularität streuten die Zellpopulationen und andere in der Suspension enthaltenen Partikel auftreffende Laserstrahlen in unterschiedlichem Maße. Die Darstellung dieser Parameter jeder einzelnen Zelle ermöglichte die Eingrenzung der zu analysierenden Zellpopulation. Schließlich konnte durch die Visualisierung der Fluoreszenzintensität jeder Zelle die Fraktion der fluoreszierenden Zellen bestimmt werden.

Mit Hilfe der Software FlowJo wurden die Messwerte der Blutproben aus der Doppelfärbung ausgewertet. Die zu analysierenden Zellpopulationen wurden wie bei der einfachen Färbung definiert. Deren Anteil an toten Zellen, der durch die Zugabe von Propidiumjodid markiert und sichtbar gemacht worden war, wurde subtrahiert. Von den verbliebenen lebenden Zellen einer Probe konnten darauf die Fraktionen von Zellen berechnet werden, die nicht, einfach oder doppelt markiert worden waren und deshalb unterschiedliche Fluoreszenzen aufwiesen.

3.10 Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese zur Ermittlung des Verhältnisses *Neu/ErbB-2*-mutierter Allele zu Wildtyp-Allelen in malignen Schwannomen

3.10.1 Gewinnung des Gewebes

Die Anteile *Neu/ErbB-2*-mutierter Allele im Verhältnis zu Wildtyp-Allelen wurden in Gewebeproben untersucht, die von Schwannomen der Nn. trigemini, Tumoren anderer Körperregionen, die die Erscheinungsmerkmale eines malignen Schwannoms aufwiesen, sowie von einigen makroskopisch unveränderten Nn. trigemini als Kontrollen stammten.

Um Gewebe zu erhalten, das bei Schwannomen der Nn. trigemini aus der Region nahe der Hirn-Nerv-Grenze und bei den anderen Tumoren aus zellreichen Regionen stammte, wurden die Zellen unter Sichtkontrolle mit Hilfe eines Binokulars von den zuvor angefertigten Gefrierschnitten entnommen. Hierzu wurde das Gewebe entweder mit einer sterilen Kanüle durch Kratzen vom Objektträger entfernt oder durch Aufbringen von ca. 2 µl Ampuwa-Wasser mittels Pipette, vorsichtiges Lösen der Zellanteile durch Mischen mit der Pipettenspitze und anschließendes Aufsaugen mit der Pipette gewonnen und in Reaktionsgefäße überführt. War das Gewebe mit Wasser aufgenommen worden, so wurde dieses vor der Weiterverarbeitung durch Erwärmen der offenen Reaktionsgefäße auf 37°C im Thermocycler verdampft.

3.10.2 Amplifikation der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde ein 129 bp langes DNA-Fragment amplifiziert, das für einen Teil der Transmembranregion der *Neu/ErbB-2*-Rezeptor-Tyrosinkinase kodiert.

Die Gewebeproben wurden in jeweils 10 µl Ampuwa-Wasser aufgenommen und für eine Minute zentrifugiert.

Folgende Reagenzien wurden in den für jede Probe angegebenen Mengen zum PCR-Mix gemischt und zu den Gewebeproben gegeben:

Protokoll 3-6 a

Reagenz	Menge
Taq-Polymerase 5U/µl	0,125 µl/ Probe
Primer 1 (402E)	0,875 µl/ Probe
Primer 2 (412)	0,875 µl/ Probe
dNTP's (40 mM)	0,5 µl/ Probe
10x Taq-Puffer	2,5 µl/ Probe
Ampuwa-Wasser	10 µl/ Probe

Nach dem Bedecken der Proben mit 2 Tropfen Mineralöl wurden diese unter folgenden Bedingungen im Thermocycler amplifiziert:

Protokoll 3-6 b

Schritt	Bedingungen	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	3 Minuten, 94°C	1
Denaturierung	50 Sekunden, 94°C	45
Anlagerung	1 Minute, 65°C	
Extension	1 Minute, 72°C	
Extension	10 Minuten, 72°C	1

Um zu prüfen, ob die DNA in ausreichender Menge amplifiziert worden war, wurden 10 µl jeder PCR-Probe auf ein 3%iges Agarose-Gel aufgetragen. Hierfür wurde ein Gel-Mix aus folgenden Reagenzien im Glaskolben gemischt und in einem Mikrowellenherd zum Kochen gebracht:

Protokoll 3-6 c

Reagenz	Menge
Agarose	2,4 g
50-fach TAE-Puffer	1,6 ml
A. bidest	ad 80 ml

Nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromidlösung wurde die Mischung in einen Agarosegel-Gießrahmen gegossen. Die vor dem Erkalten eingelegten und nach dem Erkalten wieder entfernten Kämmen sorgten für die Ausbildung von Taschen, in die die Proben, verdünnt mit 6-fach-Ladepuffer (5:1), und ein Längenstandard pipettiert wurden. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 30 Minuten bei 80 Volt. Danach konnten die so aufgetrennten Fragmente aufgrund

der Interkalation des Ethidiumbromids zwischen den DNA-Doppelsträngen mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht werden.

3.10.3 Enzymatische Spaltung des Produktes

Die PCR-Produkte von *Neu/ErbB-2*-mutierter und nicht mutierter DNA waren beide gleich lang (129 bp). Um sie identifizieren zu können, mussten sie deshalb mittels des Restriktionsenzym Mnl1 (Erkennungssequenz: 5'-CCTC(N)₇) verdaut werden. Dieses Enzym erkennt die T:A→A:T-Mutation im *Neu/ErbB-2*-Gen und schneidet das Produkt in zwei unterschiedlich große Teile (104 bp und 25 bp).

1 µl des PCR-Produkts wurde mit 0,1 µl Mnl1 und 1 µl dazugehörigem 10-fach-Puffer in 7,9 µl Ampuwa-Wasser verdünnt und für 2 Stunden bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Zur Denaturierung des Enzyms wurden die Proben anschließend für 10 Minuten auf 72°C erhitzt.

3.10.4 Visualisierung des gespaltenen Produktes

Die Produkte wurden nach ihrer enzymatischen Spaltung durch die Trennung auf einem 6%igen Polyacrylamid-Gel und eine Silberfärbung sichtbar gemacht. Dazu wurden zunächst jeweils 5 µl der Proben mit 1 µl 6-fach-Ladepuffer versetzt.

Die zum Gießen des Polyacrylamidgels benötigte Lösung wurde aus folgenden Reagenzien hergestellt:

Protokoll 3-7 a

Reagenz	Menge
40%iges Bisacrylamid/Acrylamid (19:1)	150 ml
5-fach TBE-Puffer	200 ml
A. bidest	ad 1000 ml

Mittels Abstandhalter und Gießrahmen wurden die gereinigten Platten so aufeinander fixiert, dass ein 0,4 mm breiter Hohlraum entstand. Dieser wurde mit 70 ml der Polyacrylamidgellösung, versetzt mit 124 µl 10%igem APS und 70 µl TEMED, gefüllt und ein Haifischzahnkamm mit der stumpfen Seite

zwischen die Platten geschoben. Nachdem das polymerisierte Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt worden war, wurden die Reservoirs mit 1xTBE aufgefüllt. Die Gelkante wurde gespült und der Haifischzahnkamm mit den Spitzen in das Gel gedrückt, so dass Taschen zum Beladen entstanden.

Jeweils 5 µl der verdauten Produkte wurden mit 1 µl 6-fach Ladepuffer versetzt und zusammen mit 1 µl Längenstandard (1:6 verdünnt) in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 75 Watt für etwa 90 Minuten durchgeführt.

Die kleine Glasplatte wurde abgeschoben, so dass die größere geltragende Glasplatte in einem Färberahmen eingespannt werden konnte. Die Silberfärbung wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt:

Protokoll 3-7 b

Schritt	Bedingung
10%iges Ethanol	5 Minuten
1%ige Salpetersäure	2 Minuten
Waschen mit A. bidest	1x
2%ige Silbernitratlösung (12mM)	20 Minuten
Waschen mit A.bidest	3x
Entwicklerlösung aus	29,68 g Na ₂ CO ₃
	512 µl Formaldehyd
	ad 1000 ml A.bidest
10%ige Essigsäure zum Reaktionsstopp	5 Minuten

Das gefärbte Gel wurde auf Whatman Papier aufgelegt und auf dem Geltrockner für 150 Minuten getrocknet.

Das Verhältnis von mutierten zu nicht mutierten Produkten eines Tumors wurde aufgrund der Bandendicke der 129 und 104 bp langen DNA-Fragmente abgeschätzt.

3.11 Statistische Analysen

3.11.1 Auswertung immunhistochemisch gefärbter CD18-, CD4-, CD8-, ED1- und ED2-exprimierender Zellen in den Nn. trigemini der BDIV- und BDIX-Ratten im Alter von 40 bis 70 Wochen

Für jeden Zelltyp wurde ein 4-fach-ANOVA-Test mit den Faktoren Region, Stamm, Zeitpunkt und Behandlung durchgeführt, wobei jeweils 2 Faktoren in Bezug gesetzt wurden. Bei den Tests, die den Faktor Zeit einbezogen, wurden die Zeitpunkte 40 bis 150 einzeln getestet, so dass die nachträglich bestimmten Zeitpunkte Tag 40 bis 70 mit den bereits bestimmten verglichen werden konnten. Da der p -Wert für die Interaktion zwischen Stamm und Zeit bei CD4-positiven Zellen signifikant ($> 10^{-4}$) war, wurden beide Stämme getrennt betrachtet. Das Verfahren GLM des Programms SAS V8.02 für Win NT wurde benutzt, weil die Gruppen unterschiedlich groß waren. Die p -Werte sind nicht für Vielfach-Tests abgeglichen worden.

3.11.2 Auswertung des Einflusses der neonatalen Thymektomie auf die Entstehung von Tumoren des peripheren Nervensystems

Nach Auszählung der Ratten, die maligne Schwannome entwickelten, wurden für die vier Gruppen - thymektomierte bzw. euthymische BDIV-Ratten und thymektomierte bzw. euthymische BDIX-Ratten - die Tumorinzidenzen bestimmt und der jeweilige Median der Überlebenszeiten berechnet. Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests wurde zwischen diesen Gruppen verglichen und p -Werte berechnet. Lagen bei über 50% der Zellen die Werte unter 5, wurde stattdessen der exakte Fisher-Tests angewandt. Die Berechnung der exakten 95%-Konfidenzintervalle diente dazu abzuschätzen, ob die Größe der betrachteten Rattengruppe bzw. der betrachteten Tumorgruppe für eine sichere Aussage ausreichte.

Diese wurden außerdem für die Angaben von Schwannomen mit im *Neu/ErbB2*-Gen mutierten bzw. nicht mutierten Zellen berechnet.

Unterschiede in den Überlebenszeiten der euthymischen und thymektomierten EtNU-behandelten Ratten jeweils eines Stammes wurden durch die Kaplan-Meier-Kurven dargestellt, wobei Ratten, die nicht wegen eines malignen

Schwannoms starben oder getötet werden mussten, als zensierte Ereignisse galten.

Mit dem Logistischen Regressions-Modell wurde getestet, ob die Höhe verbliebener T-Lymphozyten im Blut thymektomierter BDIV-Ratten mit der Bildung von Tumoren korreliert. Hierbei wurden Werte 16 Wochen alter Ratten betrachtet, da nicht von allen Ratten im Alter von 8 Wochen Werte bestimmt worden waren.

Alle Tests wurden mit dem Programm SAS9.1 für Windows durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Detektion von Immuneffektorzellen in den Nn. trigemini

4.1.1 Detektion von T-Lymphozyten und Makrophagen zu frühen Entwicklungszeitpunkten maligner Schwannome

In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe war bereits gezeigt worden, dass ab dem Postnataltag 80 signifikant erhöhte Zahlen an Makrophagen, zytotoxischen T-Lymphozyten und T-Helfer-Zellen in den Nn. trigemini der mit dem Kanzerogen EtNU behandelten suszeptiblen BDIX- und resistenten BDIV-Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollratten vorhanden sind (GERING et al., 2006).

Um den Zeitpunkt der Einwanderung dieser Immuneffektorzellen feststellen zu können, wurden die Nn. trigemini von je drei bis vier 40, 50, 60 und 70 Tage alten mit EtNU behandelten BDIV- und BDIX-Ratten und zwei bis drei unbehandelten Kontrollratten gleichen Alters immunhistochemisch gefärbt. Die dabei verwendeten Antikörper waren gegen die Leukozytenantigene CD4, CD8, CD18, ED1 und ED2 gerichtet.

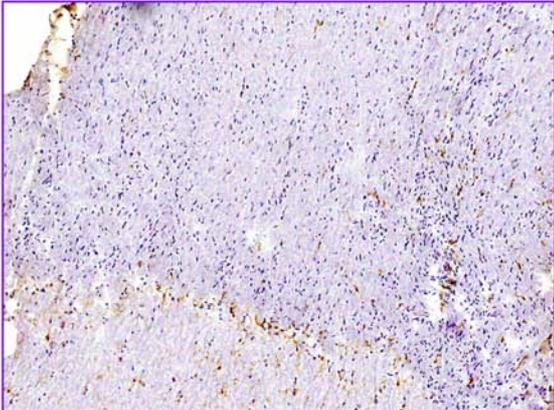
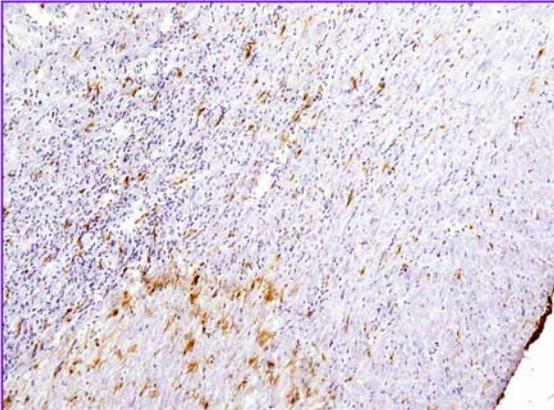
Bei der Betrachtung der gefärbten Schnitte unter dem Mikroskop zeigte sich, dass in dieser frühen Phase der Tumorentstehung in den mit EtNU behandelten Tieren nur wenige ED1-positive Makrophagen und zytotoxische T-Lymphozyten vorhanden sind und erst kurz vor dem Tag 80 einzuwandern scheinen. CD4-exprimierende Zellen (T-Helfer-Zellen oder Makrophagen) sind dagegen schon sehr früh (Tag 40) in den Nn. trigemini EtNU-behandelter Ratten in erhöhter Anzahl zu finden (Abbildung 4-1).

Zur Quantifizierung der eingewanderten Zellen wurden die gefärbten Immuneffektorzellen in den Regionen A und B der Nn. trigemini mit einer geeigneten Software ausgezählt. Die Mittelwerte der Zellzahlen wurden pro mm² Fläche für die Ratten gleichen Alters, Stammes und gleicher Behandlung bestimmt (siehe 3.9.3.1).

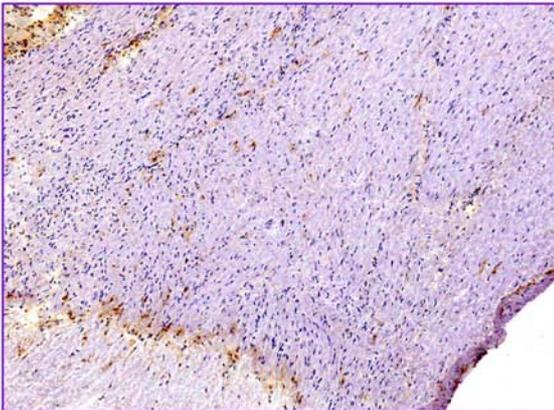
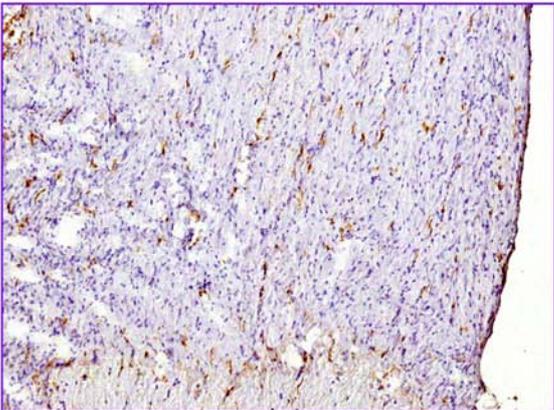
Die mit den Zellzahlen der 80 bis 250 Tage alten Ratten erstellten Grafiken wurden mit den zusätzlich bestimmten Mittelwerten der davor liegenden Zeitpunkte (Tag 40, 50, 60 und 70) ergänzt (Abbildung 4-2).

EtNU-behandelt

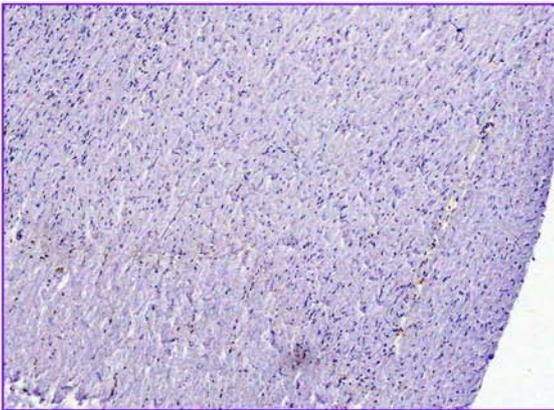
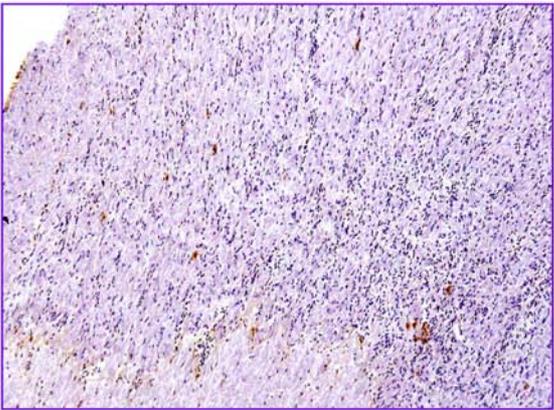
Kontrolle



a) CD18-exprimierende Zellen (60 Tage alte Ratten)



b) CD4-exprimierende Zellen (40 Tage alte Ratten)



c) CD8-exprimierende Zellen (70 Tage alte Ratten)

Abbildung 4-1 a
Fortsetzung auf der nächsten Seite

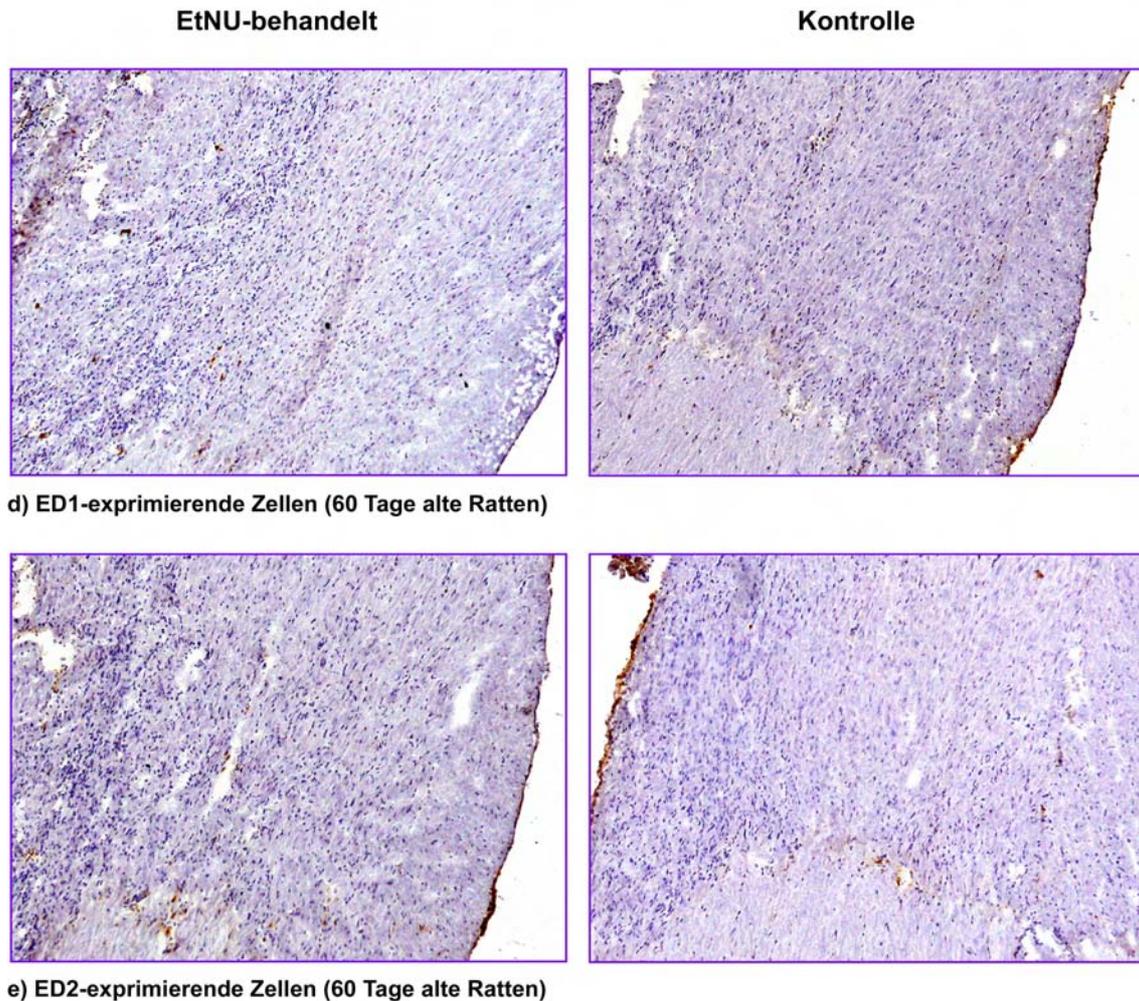


Abbildung 4-1 a Fortsetzung

Immunhistochemische Färbung CD18-, CD4-, CD8-, ED1- und ED2-exprimierender Zellen in den Nn. trigemini 40, 50, 60 und 70 Tage alter BDIV-Ratten mit und ohne EtNU-Behandlung, 100-fach vergrößert.

CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten sind am Tag 70 nur vereinzelt in den mit EtNU behandelten BDIV-Ratten zu finden (c) und auch ED1- und ED2-positive Makrophagen kommen in den von 60 Tage alten Ratten stammenden Nerven nur vereinzelt vor (d, e). Stattdessen lassen sich schon am Tag 40 bzw. 60 viele CD4- und CD18-exprimierende Zellen erkennen (a, b).

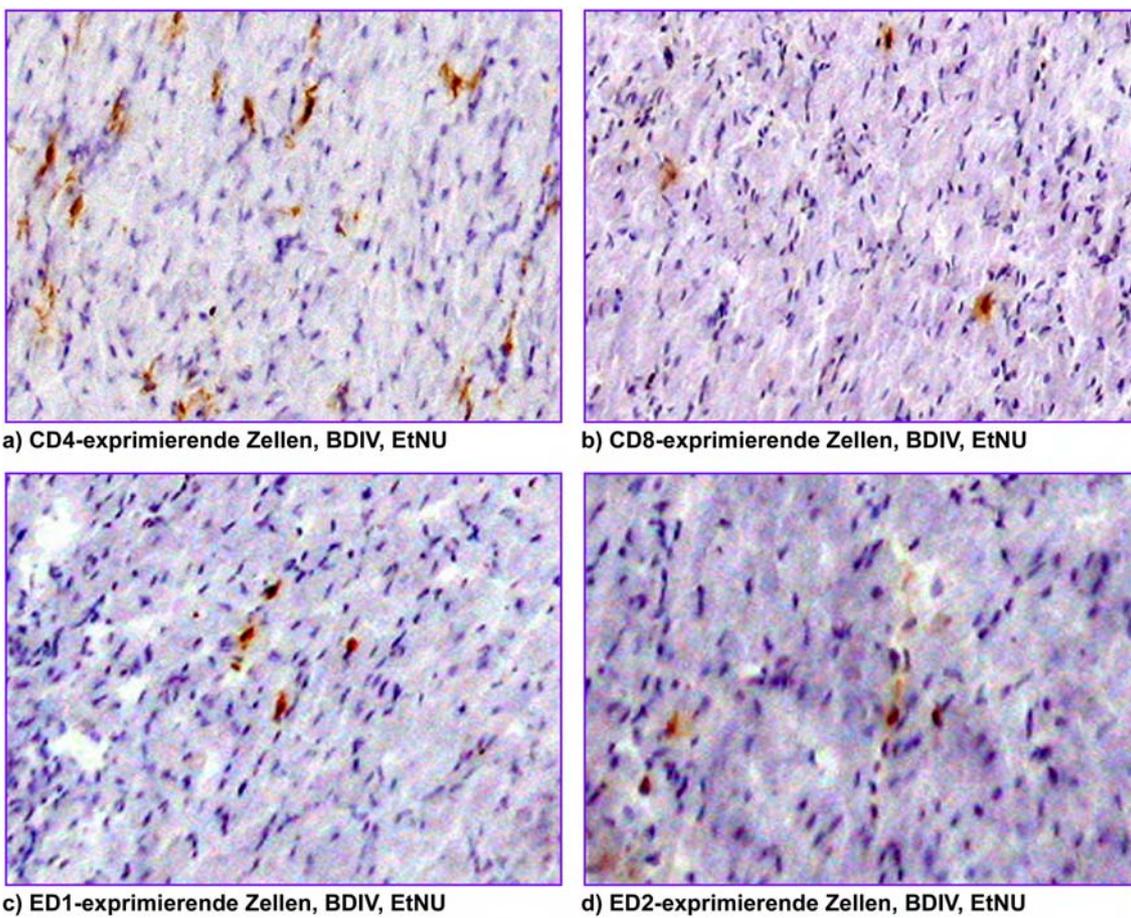
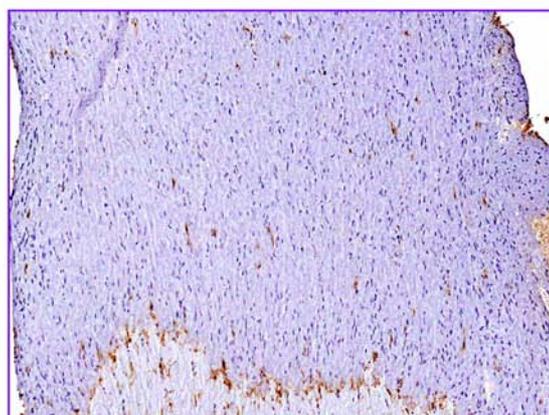
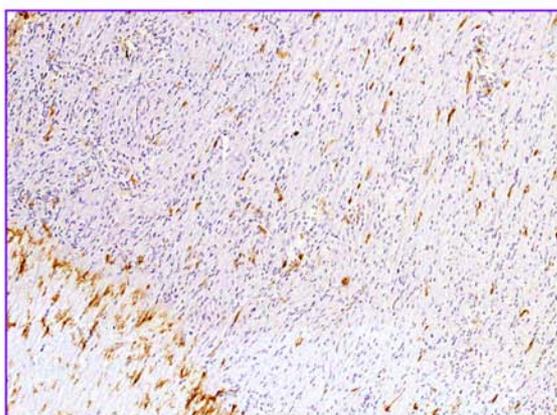


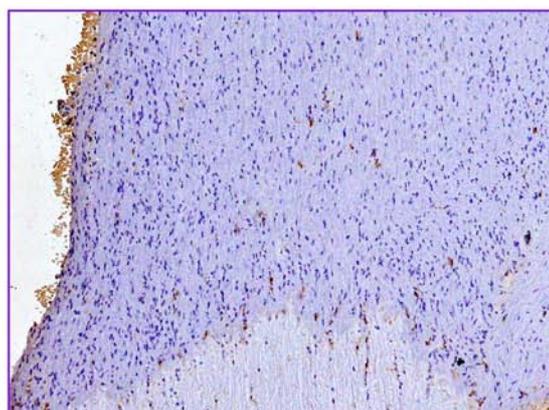
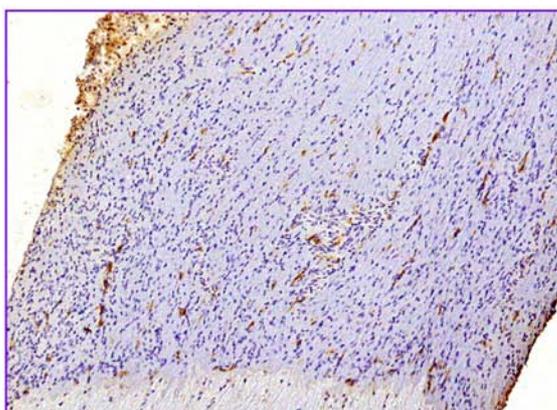
Abbildung 4-1 b
Vergrößerung einzelner Abschnitte aus Abbildung 4-1 a zur Darstellung der Zellmorphologie.

EtNU-behandelt

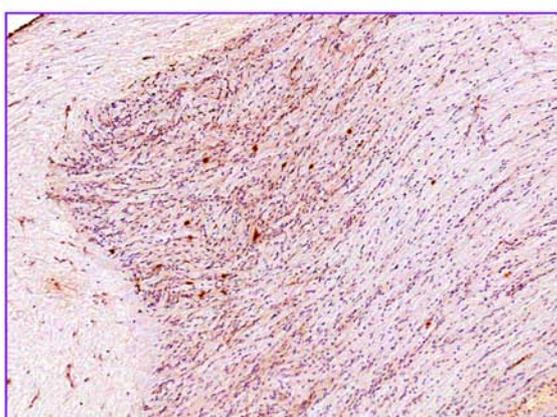
Kontrolle



a) CD18-exprimierende Zellen (60 Tage alte Ratten)



b) CD4-exprimierende Zellen (40 Tage alte Ratten)



c) CD8-exprimierende Zellen (70 Tage alte Ratten)

Abbildung 4-1 c
Fortsetzung auf der nächsten Seite

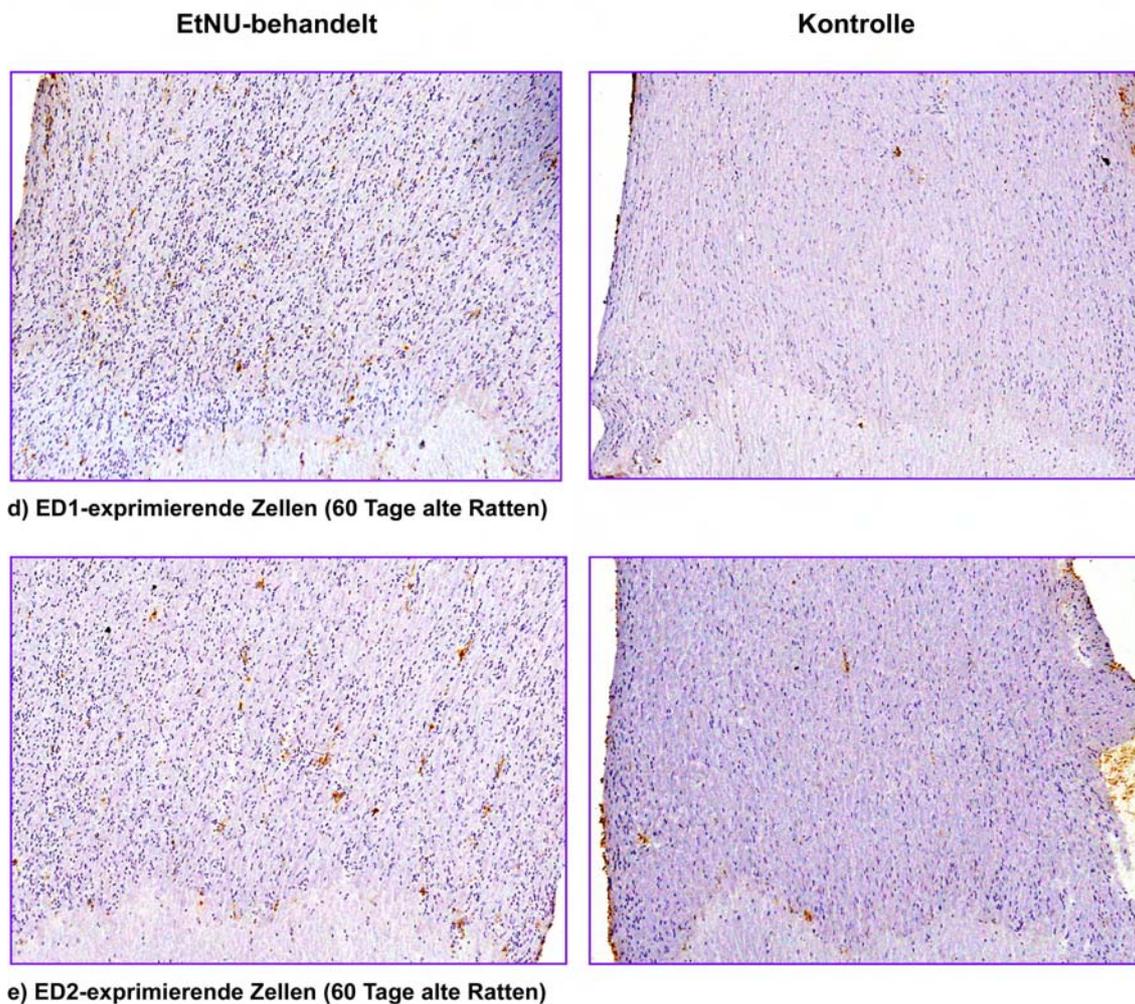
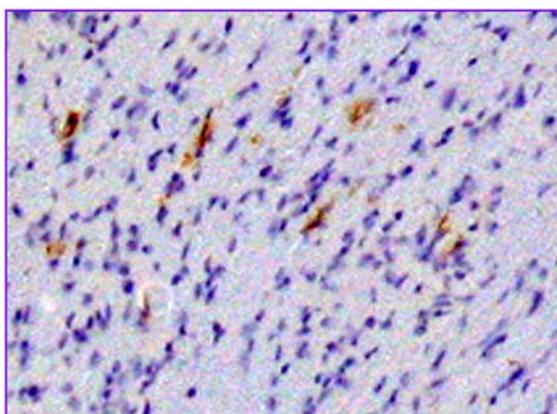


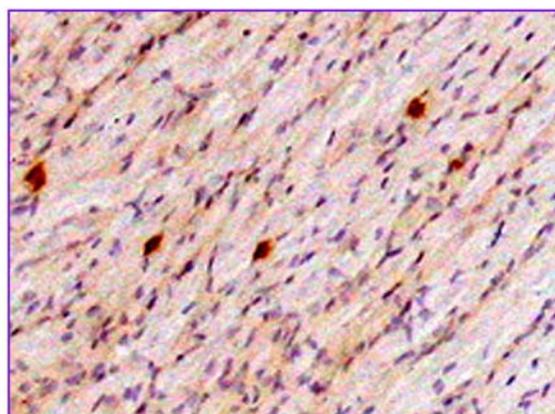
Abbildung 4-1 c Fortsetzung

Immunhistochemische Färbung CD18-, CD4-, CD8-, ED1- und ED2-exprimierender Zellen in den Nn. trigemini 40, 50, 60 und 70 Tage alter BDIX-Ratten mit und ohne EtNU-Behandlung, 100-fach vergrößert.

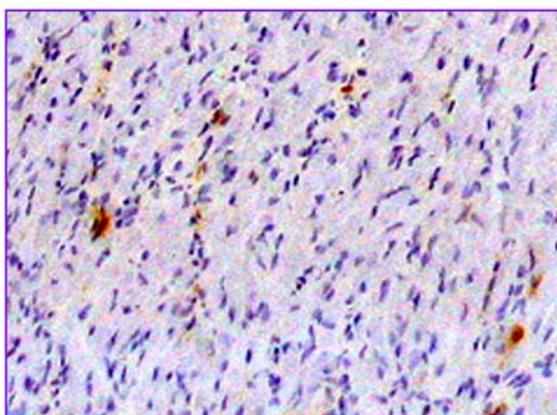
CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten sind am Tag 70 nur vereinzelt in den mit EtNU behandelten BDIX-Ratten zu finden (c) und auch ED1- und ED2-positive Makrophagen kommen in den von 60 Tage alten Ratten stammenden Nerven nur vereinzelt vor (d, e). Stattdessen lassen sich schon am Tag 40 bzw. 60 viele CD4- und CD18-exprimierende Zellen erkennen (a, b).



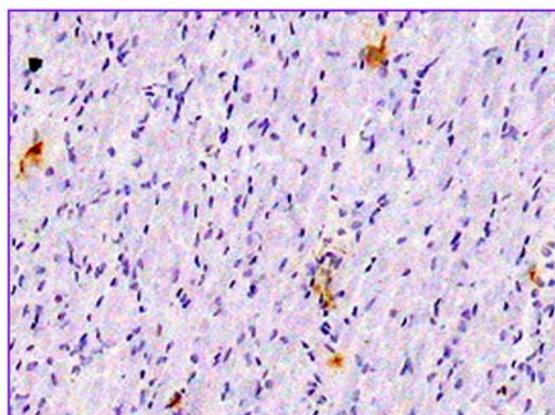
a) CD4-exprimierende Zellen, BDIX, EtNU



b) CD8-exprimierende Zellen, BDIX, EtNU



c) ED1-exprimierende Zellen, BDIX, EtNU



d) ED2-exprimierende Zellen, BDIX, EtNU

Abbildung 4-1 d
Vergrößerung einzelner Abschnitte aus Abbildung 4-1 c zur Darstellung der Zellmorphologie.

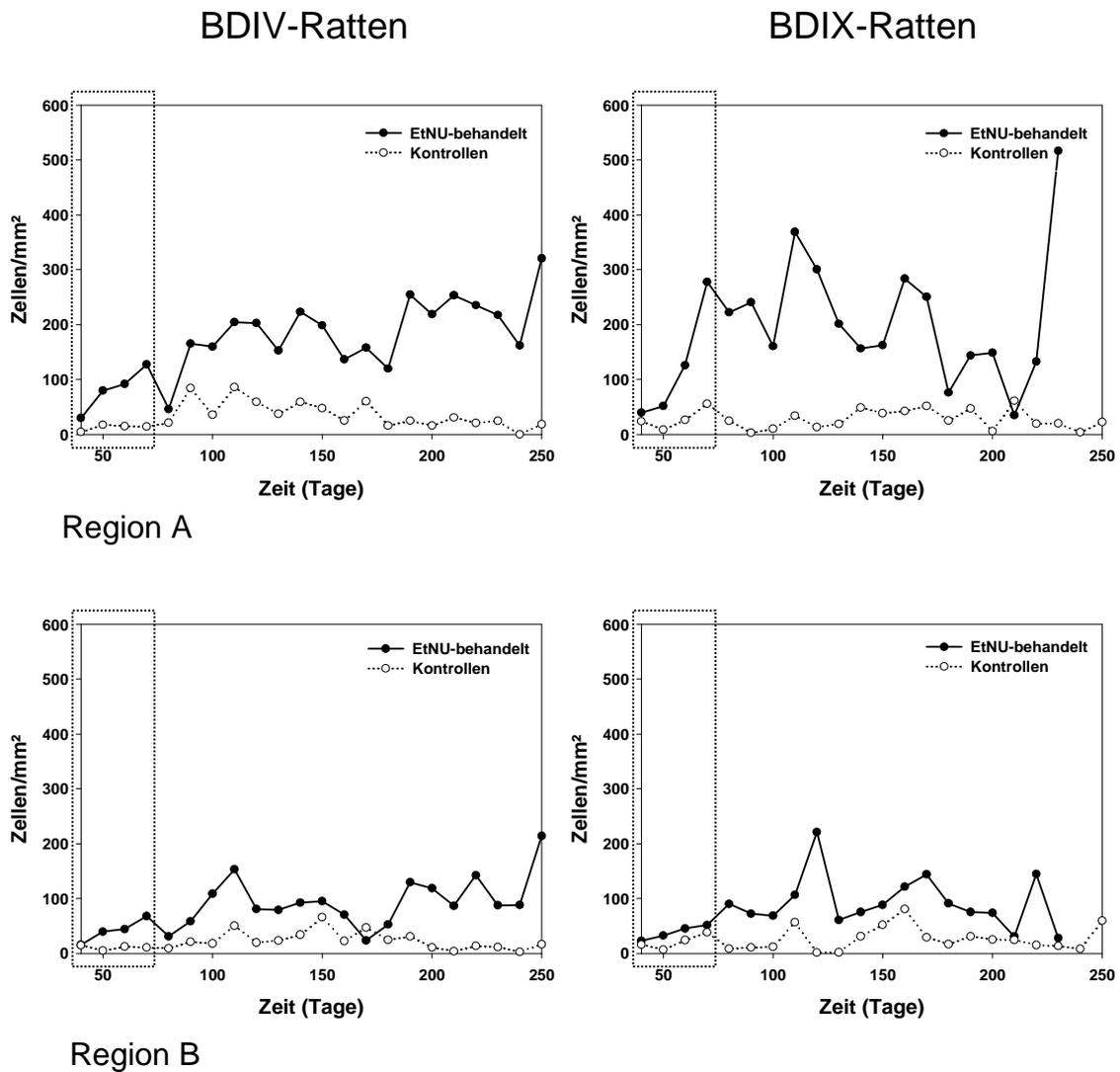


Abbildung 4-2 a

Darstellung der Anzahl immunhistochemisch detektierter CD18-exprimierender Zellen pro mm² Fläche in den Nn. trigemini unterschiedlich alter BDIV- und BDIX-Ratten.

Die nachträglich bestimmten Werte sind gerahmt.

Diese Zellen sind schon am Tag 40 in den EtNU-behandelten Ratten (durchgezogene Kurven) beider Stämme im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollratten (gestrichelte Kurven) in erhöhter Zahl vorhanden. Die Anzahl nimmt bis zum Tag 80 noch zu.

(GERING et al., 2006, modifiziert)

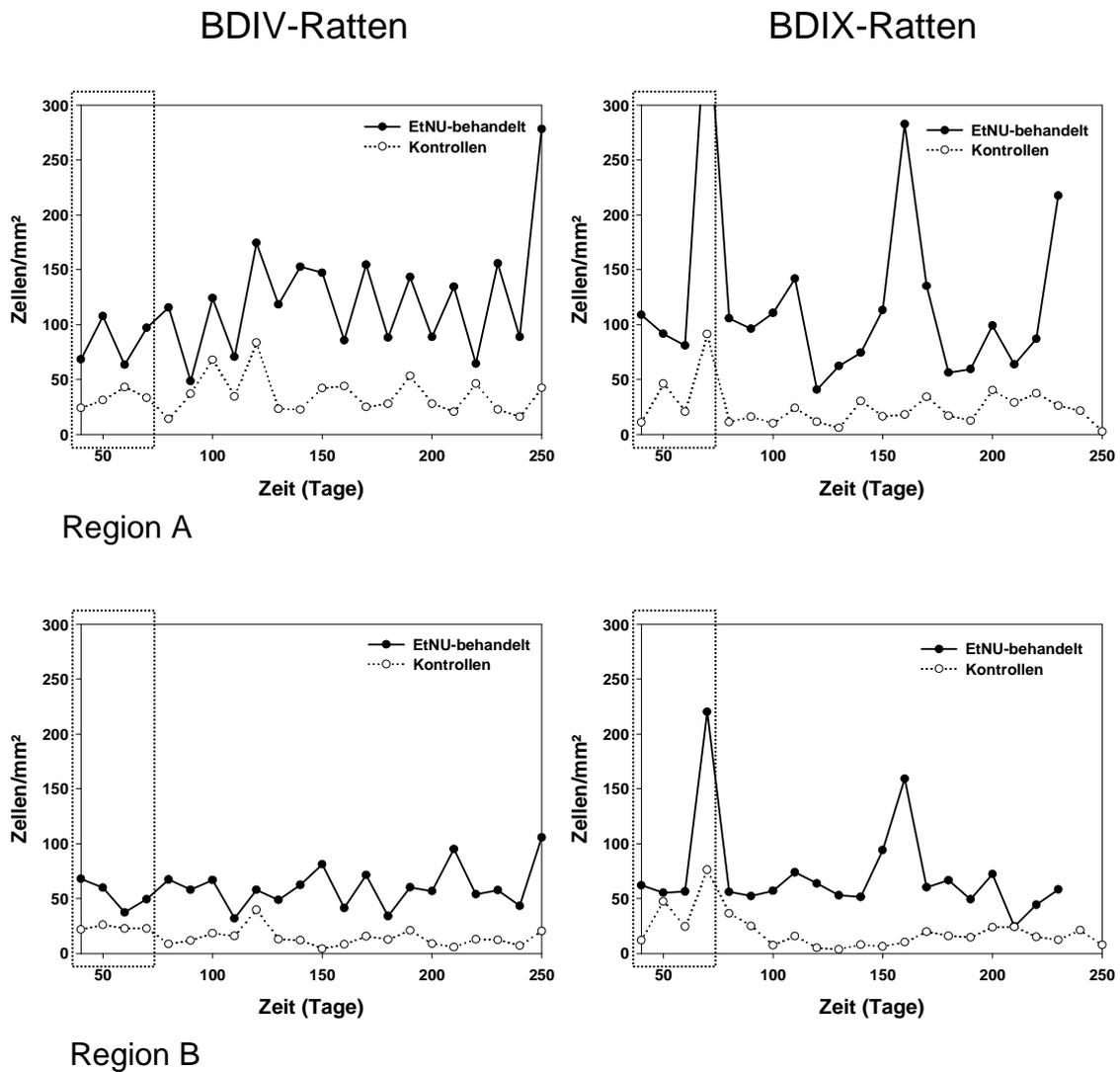


Abbildung 4-2 b

Darstellung der Anzahl immunhistochemisch detektierter CD4-exprimierender Zellen pro mm^2 Fläche in den Nn. trigemini unterschiedlich alter BDIV- und BDIX-Ratten.

Die nachträglich bestimmten Werte sind gerahmt.

Diese Zellen sind schon am Tag 40 in den EtNU-behandelten Ratten (durchgezogene Kurven) beider Stämme im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollratten (gestrichelte Kurven) in erhöhter Zahl vorhanden und nehmen nur noch geringfügig bis Tag 80 zu.

(GERING et al., 2006, modifiziert)

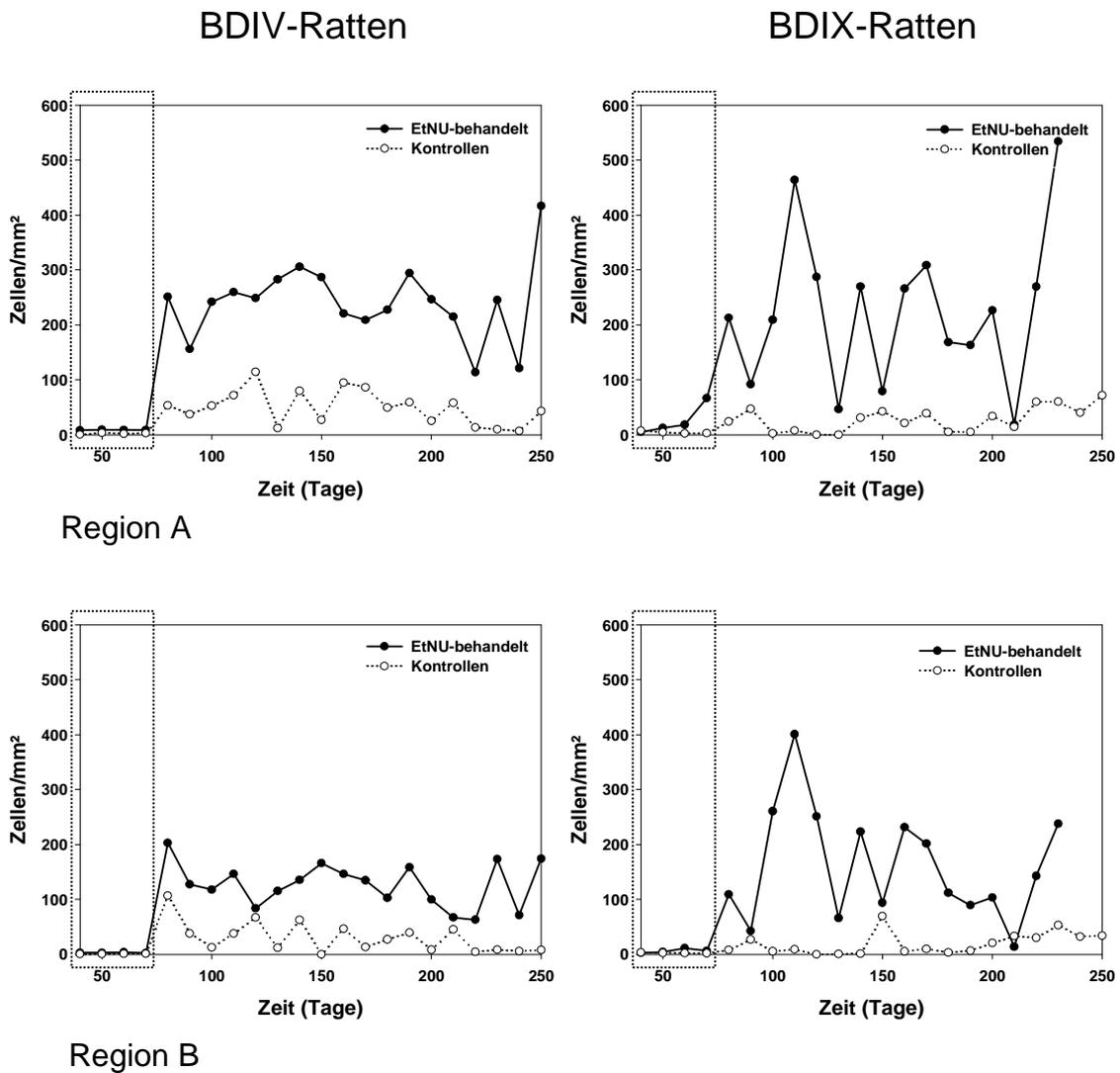


Abbildung 4-2 c

Darstellung der Anzahl immunhistochemisch detektierter CD8-exprimierender Zellen pro mm² Fläche in den Nn. trigemini unterschiedlich alter BDIV- und BDIX-Ratten.

Die nachträglich bestimmten Werte sind gerahmt.

Die Anzahl zytotoxischer T-Lymphozyten steigt in den EtNU-behandelten Ratten (durchgezogene Kurven) erst zwischen Tag 70 und 80 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollratten (gestrichelte Kurven) deutlich an.

(GERING et al., 2006, modifiziert)

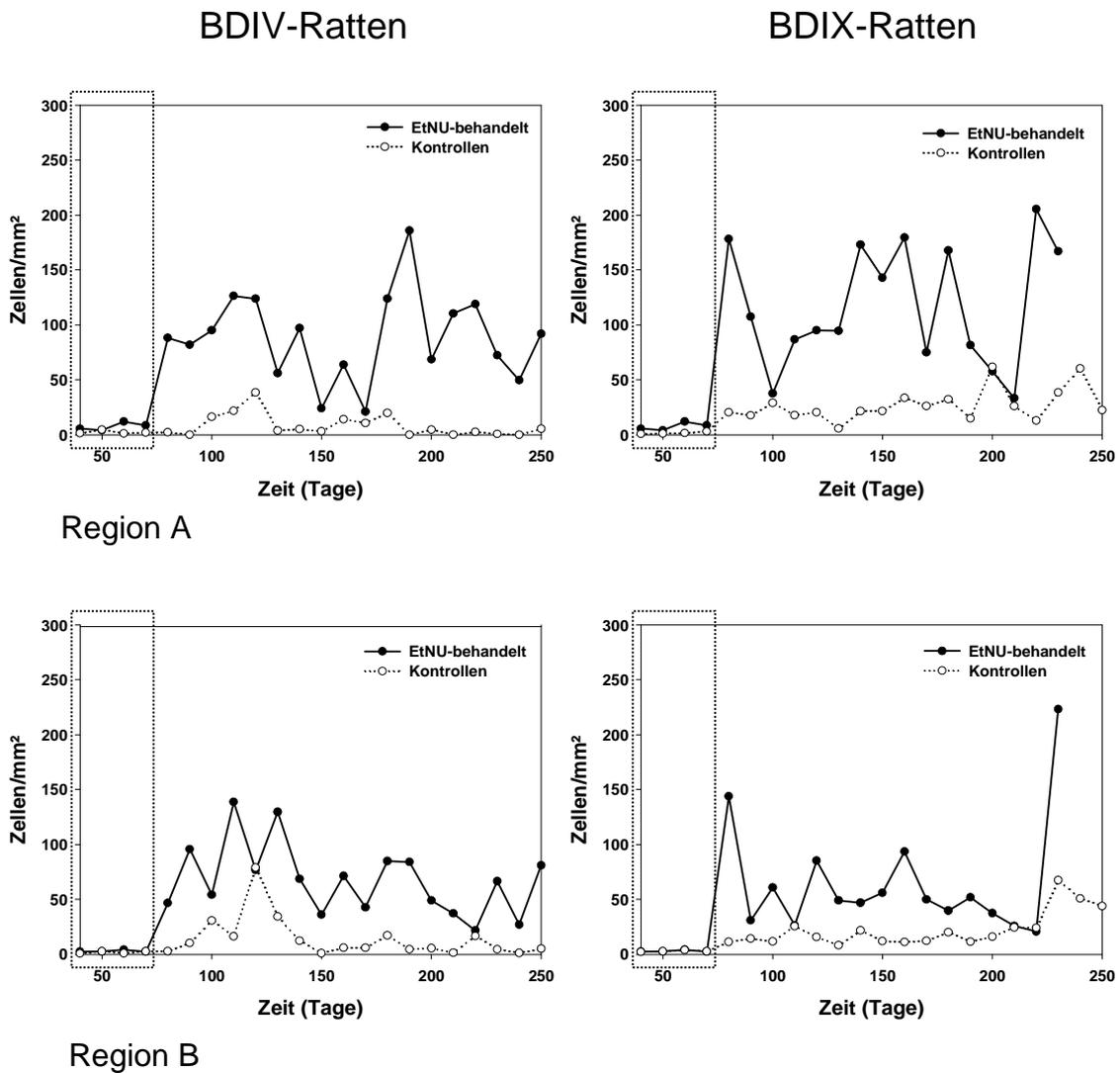


Abbildung 4-2 d

Darstellung der Anzahl immunhistochemisch detektierter ED1-exprimierender Zellen des pro mm^2 Fläche in den Nn. trigemini unterschiedlich alter BDIV- und BDIX-Ratten.

Die nachträglich bestimmten Werte sind gerahmt.

Die Anzahl dieser Makrophagen steigt in den EtNU-behandelten Ratten (durchgezogene Kurven) erst zwischen Tag 70 und 80 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollratten (gestrichelte Kurven) deutlich an.

(GERING et al., 2006, modifiziert)

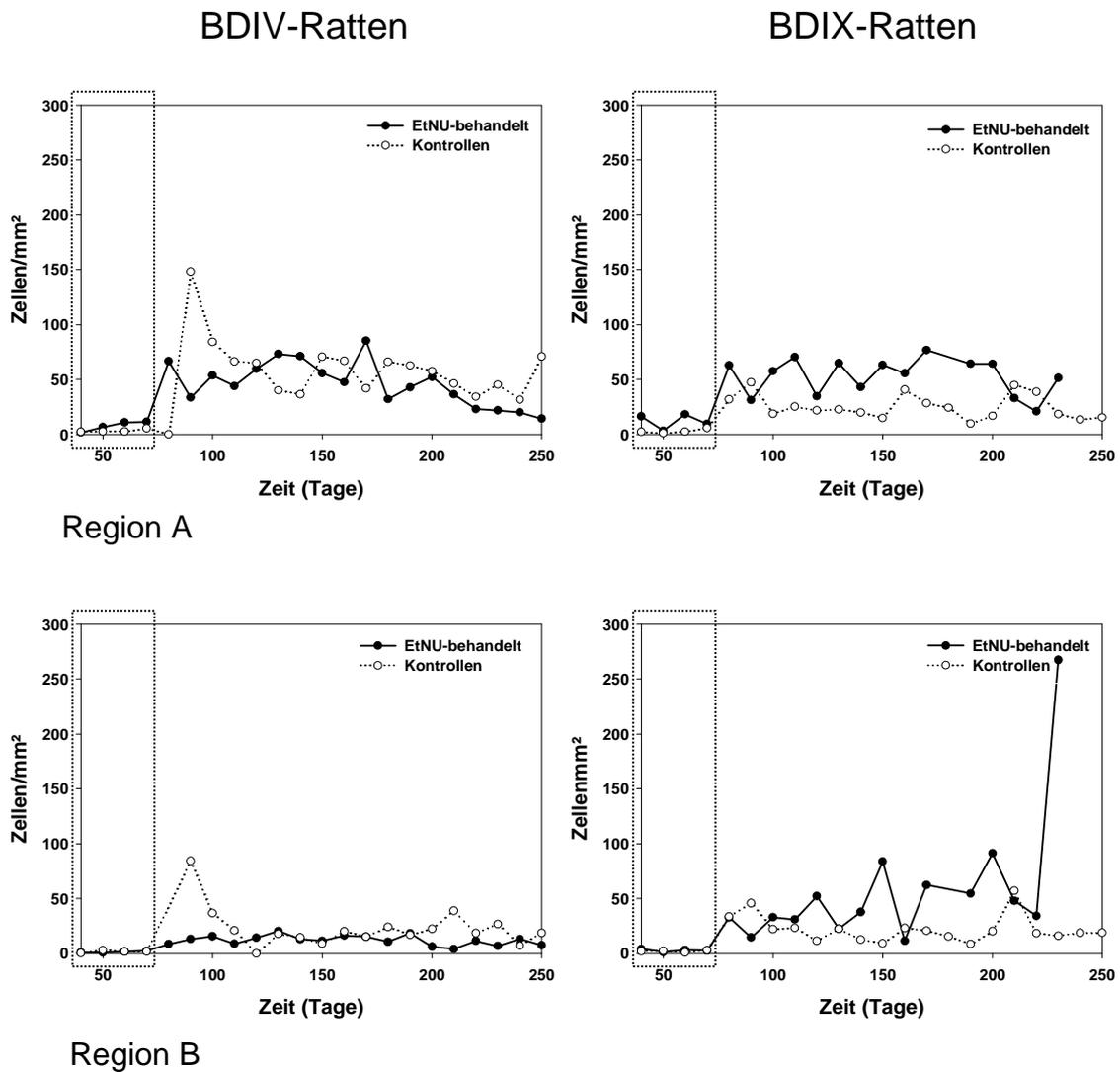


Abbildung 4-2 e

Darstellung der Anzahl immunhistochemisch detektierter ED2-exprimierender Zellen pro mm² Fläche in den Nn. trigemini unterschiedlich alter BDIV- und BDIX-Ratten.

Die nachträglich bestimmten Werte sind gerahmt.

Die Anzahl dieser Makrophagen steigt in den Nerven aller EtNU-behandelten (durchgezogene Kurven) Ratten beider Stämme und Kontrollratten (gestrichelte Kurven) bis zum Tag 80 nur gering an, wobei ausschließlich in den Nerven der EtNU-behandelten BDIX-Ratten signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den Kontrollratten desselben Stammes erreicht werden. (GERING et al., 2006, modifiziert)

Es bestätigte sich, dass die Anzahl CD8-positiver zytotoxischer T-Lymphozyten und ED1-positiver Gewebsmakrophagen erst zwischen den Zeitpunkten Tag 70 und 80 deutlich zunimmt, während sich große Mengen CD4-exprimierender Zellen (T-Helfer-Zellen oder Makrophagen) schon am Tag 40 in den Nn. trigemini der mit EtNU behandelten Ratten beider Stämme befinden und diese bis zum Tag 80 nur noch leicht ansteigen.

Durch die statistische Auswertung mit Hilfe des Vier-Faktoren-ANOVA-Tests zeigte sich, dass eine signifikante Zunahme der CD18-, CD8-, ED1- und ED2-positiven Zellen in beiden Stämmen zwischen Tag 40 und 130 vorlag, während ohne die Berücksichtigung der Immuneffektorzellen zu den Zeitpunkten Tag 40 bis 80 zuvor keine signifikanten Anstiege nachgewiesen werden konnten. Da die Wechselwirkung der zwei Faktoren Zeit und Stamm deutlich signifikant ($p > 10^{-4}$) war, wurden die zwei Stämme zusätzlich differenziert betrachtet (Tabelle 4-1 a).

Tabelle 4-1 a

Effekt (p -Werte) der Variablen Zeit bzw. Wechselwirkung von Zeit und einem weiteren Faktor auf die Art der Immuneffektorzellen in den Nn. trigemini der BDIV- und BDIX-Ratten.

Zellart	Faktor Zeit	Wechselwirkung der Faktoren Zeit und Stamm	Wechselwirkung der Faktoren Zeit und EtNU-Exposition	Wechselwirkung der Faktoren Zeit und Nerven-Region (A oder B)
CD18 ⁺	$p < 0,0001$	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt
CD4 ⁺	$p < 0,05$	$p < 0,0001$	kein Effekt	kein Effekt
CD8 ⁺	$p < 0,0001$	$p < 0,01$	$p < 0,0001$	kein Effekt
ED1 ⁺	$p < 0,0001$	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt
ED2 ⁺	$p < 0,0001$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	kein Effekt

Dabei ergab sich, dass in BDIX-Ratten alle untersuchten Immuneffektorzellen signifikant anstiegen, während in den BDIV-Ratten keine signifikante Zunahme der CD4-positiven Zellen zu messen war (Tabelle 4-1 b).

Tabelle 4-1 b
Effekt (p -Werte) der Variablen Zeit auf die Art der Immuneffektorzellen getrennt für jeden Rattenstamm.

Zellart	BDIV-Ratten	BDIX-Ratten
CD18 ⁺	$p < 0,001$	$p < 0,001$
CD4 ⁺	kein Effekt	$p < 0,0001$
CD8 ⁺	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
ED1 ⁺	$p < 0,01$	$p < 0,0001$
ED2 ⁺	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$

4.1.2 Detektion von T-Zell-Rezeptor-exprimierenden Zellen

In den Nerven EtNU-behandelter Ratten beider Stämme wurden früh viele CD4-positive Zellen gefunden. Da dieser Rezeptor sowohl von Makrophagen als auch T-Helfer-Zellen exprimiert wird, sollte gezeigt werden, welche der beiden Zelltypen in den Nerven vorkommen. Die T-Helfer-Zellen exprimieren zusätzlich den $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor ($\alpha\beta$ TCR). Ihre Präsenz wurde in Nerven von 50, 70, 117 und 126 Tage alten Ratten beider Stämme durch eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen den $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor untersucht.

Zu den frühen Zeitpunkten (50 und 70 Tage) konnten in allen Nerven keine oder nur vereinzelt $\alpha\beta$ TCR-exprimierende Zellen gefunden werden. In den Nerven 117 und 126 Tage alter Tiere wurde dagegen ein ca. 10-facher Anstieg der Menge gefärbter Zellen beobachtet. Die Werte zu den untersuchten Zeitpunkten entsprachen damit der Größenordnung CD4-exprimierender Zellen in den Nerven beider Stämme zu den Zeitpunkten von 90 bis 250 Tagen, nicht aber zu den Zeitpunkten von 40 bis 80 Tagen.

4.1.3 Detektion von Natürlichen Killerzellen

Bisher war noch nicht untersucht worden, ob Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die ähnlich wie zytotoxische T-Lymphozyten die Fähigkeit zur Vernichtung von Tumorzellen besitzen und so am Beseitigungsprozess der prämaligen Zellen in den BDIV-Ratten beteiligt sein könnten, in den Nn. trigemini EtNU-behandelter BDIV- und BDIX-Ratten vorkommen.

Es wurden Gefrierschnitte von Nn. trigemini 40, 50, 60, 70, 117 und 126 Tage alter EtNU-behandelter Ratten beider Stämme und unbehauelter Kontrollratten mit Hilfe der Immunhistochemie untersucht. Der bei der Färbung verwendete

Antikörper markierte CD161-positive Zellen, welche nach der Färbung im Mikroskop ausgezählt wurden.

Hierbei wurden sowohl bei den behandelten als auch den unbehandelten Ratten beider Stämme in allen Altersstadien nur vereinzelt NK-Zellen gefunden. Abbildung 4-3 zeigt einige gefärbte Nerven dieser Tiere.

4.2 Der Einfluss der T-Zell-Depletion durch die Thymektomie auf die Entwicklung von EtNU-induzierten malignen Schwannomen in BDIV- und BDIX-Ratten

Durch die Ausschaltung der T-Zell-Antwort mit Hilfe der Thymektomie neonataler EtNU-behandelter Ratten beider Stämme sollte die Frage geklärt werden, ob T-Lymphozyten bei der Beseitigung der prämaligen Zellen in den tumorresistenten BDIV-Ratten beteiligt sind.

Im Vordergrund der Untersuchung an thymektomierten Ratten stand einerseits eine Überprüfung der ausreichenden Reduzierung der T-Zell-Population durch die Operation und andererseits die Erhebung möglicher Veränderungen von Inzidenz, Überlebenszeit und Eigenschaften maligner Schwannome in den normalerweise vollständig tumorresistenten EtNU-behandelten BDIV-Ratten und hochgradig sensiblen BDIX-Ratten unter numerisch herabgesetzter T-Zell-Antwort.

Von den am ersten Postnataltag mit dem Kanzerogen EtNU behandelten und anschließend thymektomierten Ratten beider Stämme überlebten 43% der BDIV-Ratten und 68% der BDIX-Ratten die Operation und postoperative Phase. Sie wurden zur Betrachtung in zwei Gruppen eingeteilt. 63 BDIV- und 34 BDIX-Ratten standen für maximal 18 Monate unter Beobachtung. Erkrankten die Tiere in dieser Zeit, wurden sie getötet und sezziert.

Zusätzlich wurden 26 BDIV- und 16 BDIX-Ratten zu willkürlich gewählten Zeitpunkten (jeweils drei BDIV-Ratten im Alter von 8, 15, 23, 32, 40 und 48 Wochen bzw. drei BDIX-Ratten im Alter von 8, 15, 24 und 32 Wochen) getötet und deren Nn. trigemini für histologische und immunhistochemische Untersuchungen entnommen, wenn sie nicht zuvor wegen einer Erkrankung starben oder getötet werden mussten.

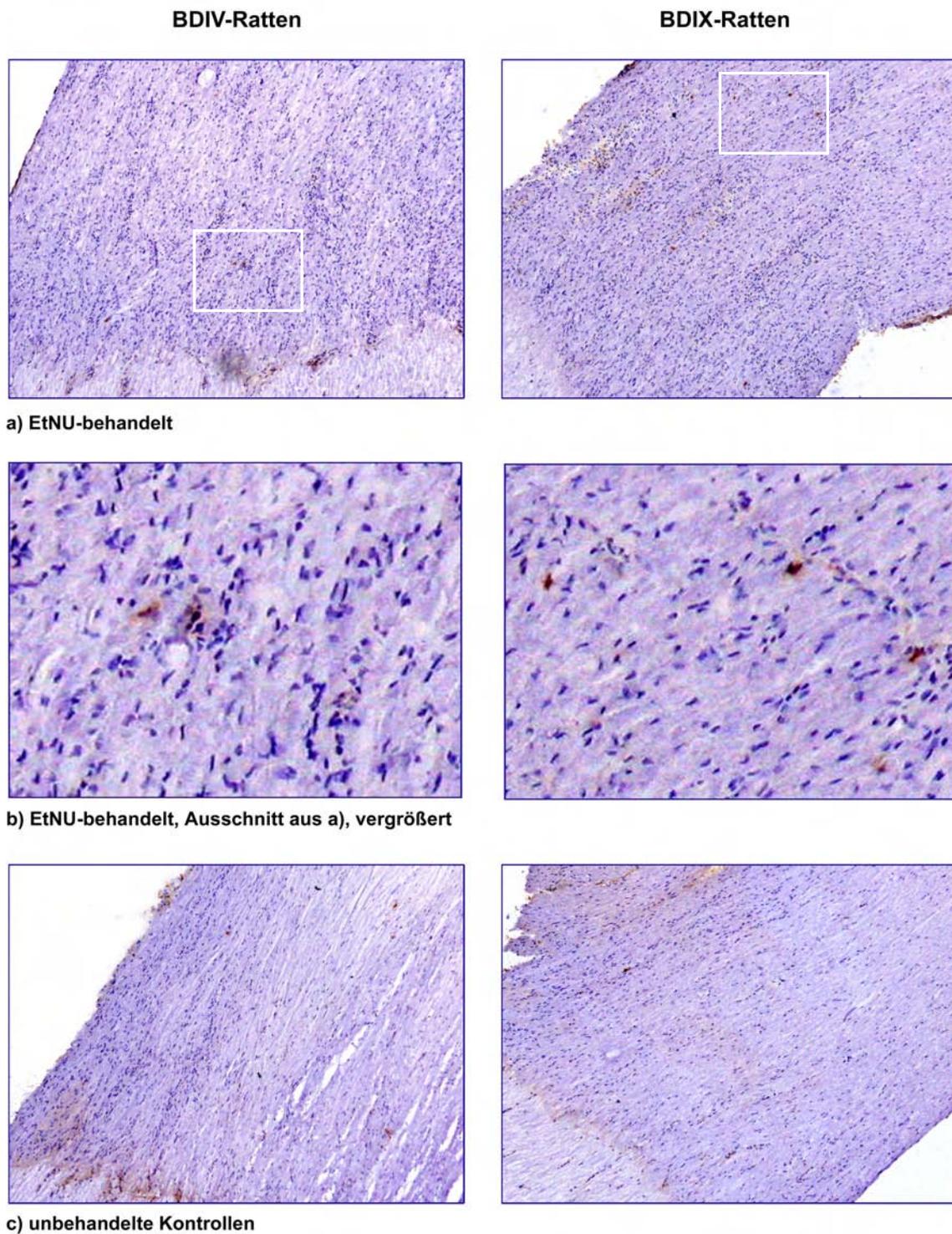


Abbildung 4-3

Immunhistochemisch gefärbte Natürliche Killerzellen in Gefrierschnitten der Nn. trigemini 100 bzw. 110 Tage alter mit und ohne EtNU behandelter BDIV- und BDIX-Ratten, 100-fach vergrößert.

Diese CD161-exprimierenden Zellen kommen in allen Nerven nur vereinzelt vor.

Als Kontrolltiere dienten 12 BDIV- und 17 BDIX-Ratten, denen EtNU injiziert wurde, ohne dass eine Thymektomie erfolgte, und 18 BDIV-Ratten, die ohne vorherige EtNU-Injektion thymektomiert wurden. Alle Kontrolltiere wurden ebenfalls für maximal 18 Monate beobachtet und bei einem Auftreten von Erkrankungssymptomen getötet und sezziert.

4.2.1 Anteil persistierender T-Lymphozyten im Blut der thymektomierten Ratten

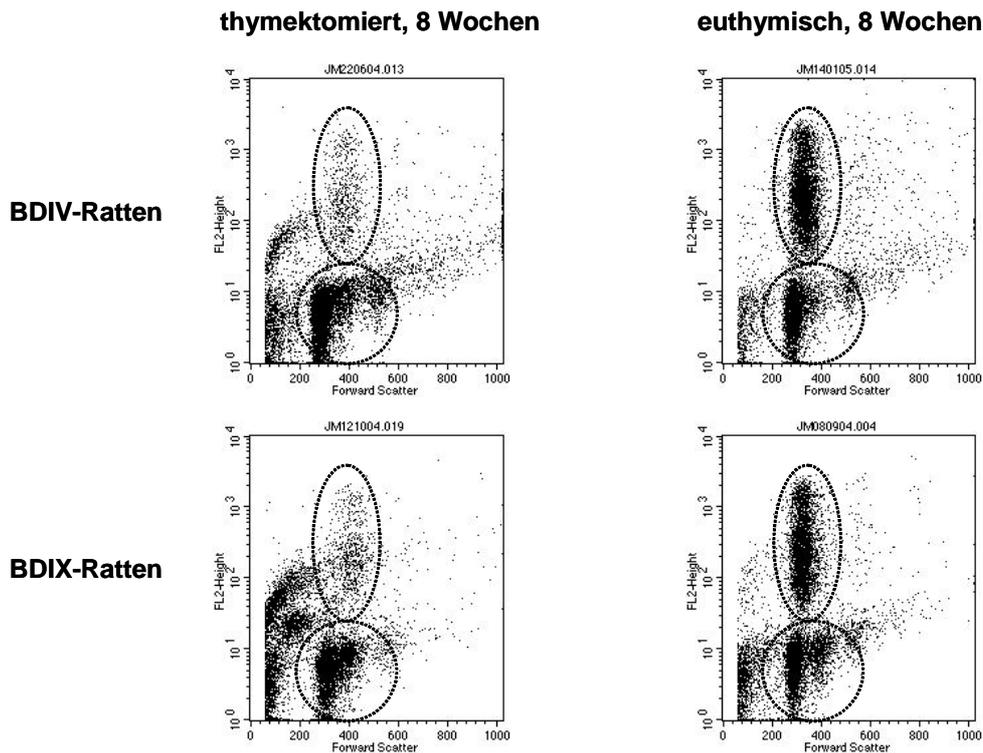
Durch die Analyse der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Anteile im Blut thymektomierter Ratten sollte untersucht werden, wie stark die erreichte Reduktion der T-Lymphozyten im Vergleich zu euthymischen Tieren war.

Das Blut der thymektomierten Ratten beider Stämme, die in der 18-monatigen Beobachtung standen, wurde im Alter von 8 (+ 2), 16 (+/- 3) und 32 (+/- 3) Wochen untersucht. Hierfür wurden die Leukozyten, wie unter Kapitel 3.9.2 beschrieben isoliert. Die dadurch erhaltene Zellfraktion bestand neben T- und B-Lymphozyten aus Monozyten und Thrombozyten.

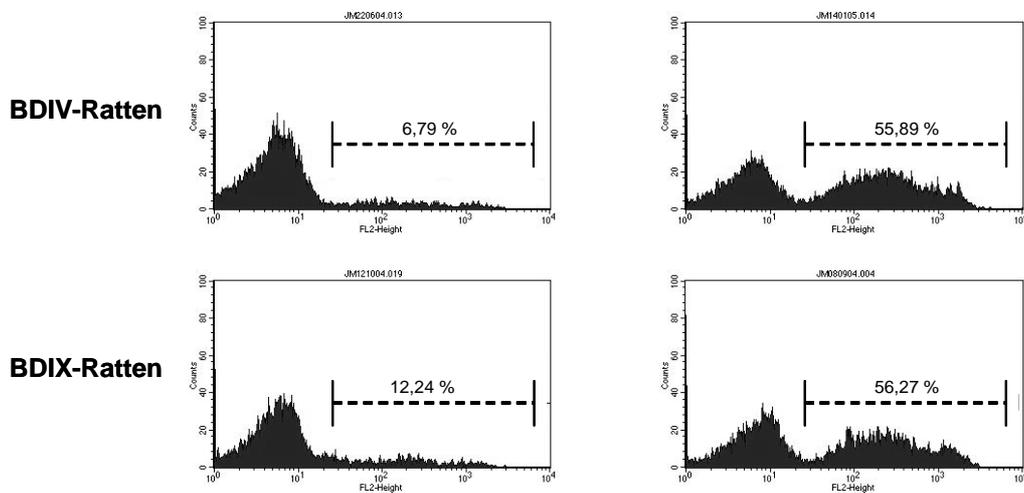
Nach einer Färbung mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen den $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor wurden die Anteile der markierten Zellen im Durchflusszytometer bestimmt.

Es zeigte sich, dass die Fraktion der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten fast aller 8 Wochen alter thymektomierter BDIV- und BDIX-Ratten im Vergleich zu der euthymischer Kontrollratten wesentlich vermindert war (Beispiel in Abbildung 4-4 a,b). Jedoch streuten die Werte beträchtlich.

Bei der Betrachtung der Werte 16 und 32 Wochen alter thymektomierter Ratten beider Stämme wurde ein Anstieg der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Anteile mit zunehmendem Alter deutlich (Beispiel in Abbildung 4-4 c und d). Auch hier zeigten die Werte eine Streuung. Alle Werte der thymektomierten BDIV- bzw. BDIX-Ratten wurden zur Darstellung der Streuung in Abbildung 4-5 zusammengefasst.



- a) Fluoreszenzintensität (Y-Achse) jedes einzelnen Partikels von definierter Größe (X-Achse), in der Ellipse die mit dem fluoreszierenden Antikörper markierten Zellen, im Kreis die nicht markierten Zellen



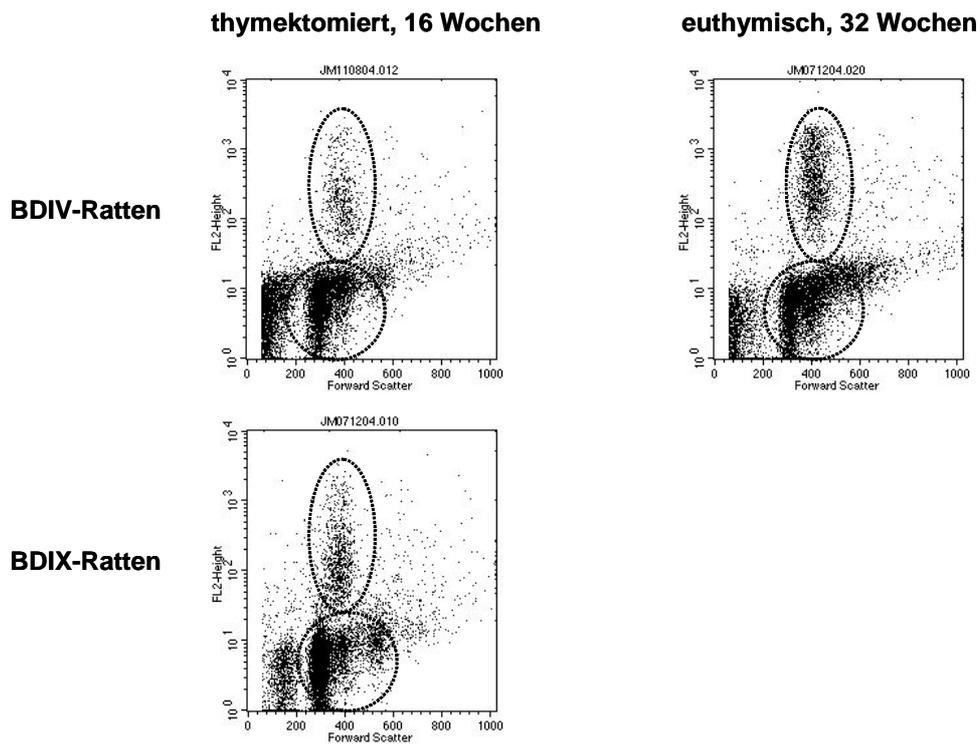
- b) Verteilung der Fluoreszenzintensität (X-Achse) aller in a) eingegrenzten Zellen (Y-Achse), die aus der Antikörperbindung resultierende Fluoreszenz ist mit dem gestrichelten Balken markiert, die Zahlen geben die prozentualen Anteile der mit dem Antikörper markierten Zellen an allen eingegrenzten Zellen wieder

Abbildung 4-4

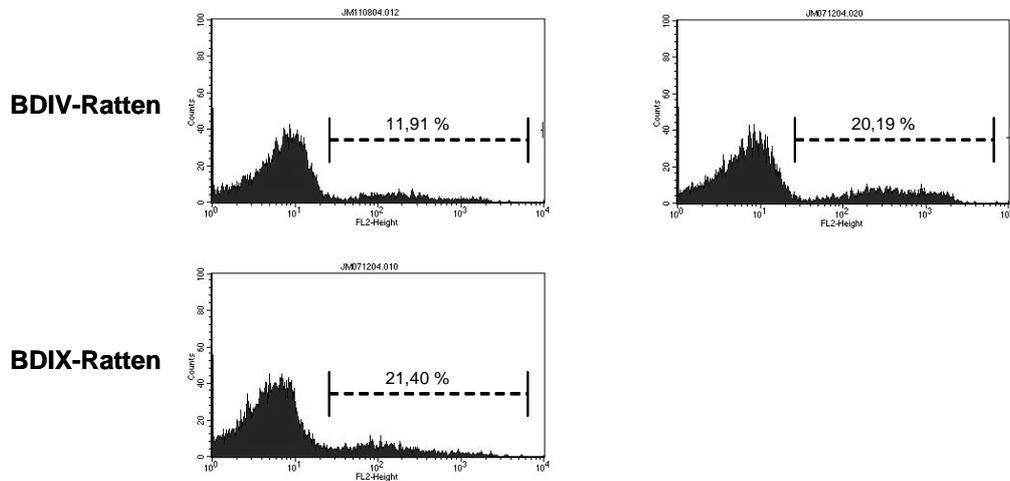
Ergebnisse der Durchflusszytometrie am Beispiel jeweils einer thymektomierten und euthymischen BDIV- und BDIX-Ratte.

In den acht Wochen alten thymektomierten Ratten befinden sich durchschnittlich weniger $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Blut als in den euthymischen Ratten, jedoch ist die T-Zell-Reifung nicht vollständig unterdrückt (a,b).

Fortsetzung auf der nächsten Seite



c) Fluoreszenzintensität (Y-Achse) jedes einzelnen Partikels von definierter Größe (X-Achse), in der Ellipse die mit dem fluoreszierenden Antikörper markierten Zellen, im Kreis die nicht markierten Zellen



d) Verteilung der Fluoreszenzintensität (X-Achse) aller in c) eingegrenzten Zellen (Y-Achse), die aus der Antikörperbindung resultierende Fluoreszenz ist mit dem gestrichelten Balken markiert, die Zahlen geben die prozentualen Anteile der mit dem Antikörper markierten Zellen an allen eingegrenzten Zellen wieder

Abbildung 4-4 Fortsetzung

Ergebnisse der Durchflusszytometrie am Beispiel jeweils einer thymektomierten und euthymischen BDIV- und BDIX-Ratte.

Mit zunehmendem Alter (16 bzw. 32 Wochen, c,d) steigen die Werte derselben thymektomierten Ratten an. Es fehlen die Werte der thymektomierten BDIX-Ratte im Alter von 32 Wochen, da die Ratte vorher starb.

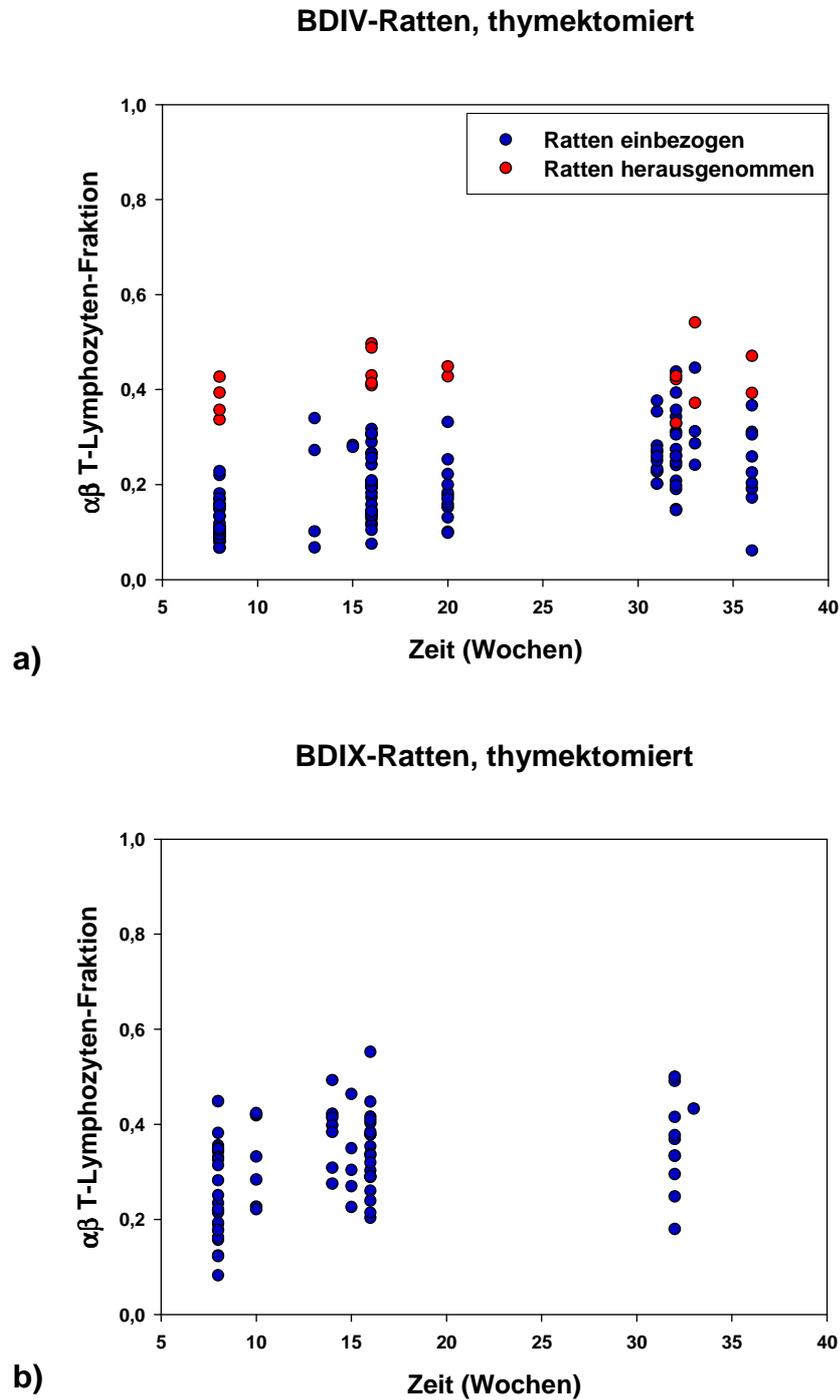


Abbildung 4-5

Streuung der prozentualen Anteile von $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Blut thymektomierter BDIV- (a) bzw. BDIX-Ratten (b).

Jeder Wert entspricht einer Ratte in einem bestimmten Alter. Die roten Markierungen geben besonders hohe Werte wieder, weshalb diese Ratten aus der Studie ausgeschlossen wurden.

Beim Vergleich der beiden Rattenstämme zeigte sich, dass deutlich mehr $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Blut der BDIX-Ratten – vor allem im Alter von 8 Wochen – vorhanden waren als im Blut der BDIV-Ratten.

Der jeweilige Median der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Fractionen thymektomierter Ratten und euthymischer Kontrollratten ist für jeden Zeitpunkt und Rattenstamm den Tabellen 4-2 a und b zu entnehmen.

Tabelle 4-2 a

Median der prozentualen Anteile gemessener $\alpha\beta$ T-Lymphozyten an der mononukleären Zellfraktion thymektomierter BDIV- und BDIX-Ratten und Größe der untersuchten Rattengruppe.

Alter (Wochen)	thymektomierte BDIV-Ratten		thymektomierte BDIX-Ratten	
	mediane $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Fractionen (%)	N =	mediane $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Fractionen (%)	N =
8 (+ 2)	11,53	36	26,66	34
16 (+/- 3)	19,78	55	34,37	32
32 (+/- 3)	27,29	49	36,88	11

Tabelle 4-2 b

Median der prozentualen Anteile gemessener $\alpha\beta$ T-Lymphozyten an der mononukleären Zellfraktion euthymischer Kontrollratten und Größe der untersuchten Rattengruppe.

Alter (Wochen)	euthymische BDIV-Ratten		euthymische BDIX-Ratten	
	mediane $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Fractionen (%)	N =	mediane $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Fractionen (%)	N =
8	56,53	16	65,40	5
16	56,05	6	66,30	6
> 52	57,40	3	61,30	3

Aus der nun folgenden Analyse der Tumorinzidenz wurden alle thymektomierten BDIV-Ratten herausgenommen, deren Anteile an $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Alter von 8 Wochen bei über 25% oder bei Fehlen des 8-Wochen-Wertes im Alter von 16 Wochen über 35% (willkürlich gewählte Grenzen) lagen und mit zunehmendem Alter ähnlich hoch blieben oder noch anstiegen. Bei diesen Ratten musste angenommen werden, dass die Anzahl der T-Lymphozyten durch eine unvollständige Thymektomie unzureichend

reduziert worden war (rot markierte Werte in Abbildung 4-5). Hiervon betroffen waren 7 thymektomierte BDIV-Ratten.

Bei weiteren 7 thymektomierten BDIV-Ratten wurde kein bzw. nur der 32-Wochen-Wert ermittelt. Da der Erfolg der Thymektomie bei diesen Ratten nicht zu beurteilen war, wurden auch sie von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

4.2.2 Verhältnis CD8-exprimierender zu CD4-exprimierenden $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Blut thymektomierter Ratten

Um den Einfluss der Thymektomie auf das Verhältnis der CD4-positiven zu CD8-positiven T-Lymphozyten in den BDIV- und BDIX-Ratten ermitteln zu können, wurden in einer zweiten Versuchsreihe die mononukleären Fraktionen des Blutes von jeweils vier 8 Wochen alten thymektomierten und euthymischen BDIV- und BDIX-Ratten mit fluoreszierenden Antikörpern gegen die Antigene CD4, CD8 und den $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor gefärbt. Die Zellen wurden darauf im Durchflusszytometer gemessen und die Anteile einzelner Zellfraktionen mit Hilfe einer geeigneten Software bestimmt. Abbildung 4-6 zeigt beispielhaft die Ergebnisse jeweils einer thymektomierten bzw. euthymischen BDIV- und BDIX-Ratte. CD4-exprimierende $\alpha\beta$ T-Lymphozyten waren bei allen thymektomierten und euthymischen Ratten in größerer Menge vorhanden als CD8-exprimierende $\alpha\beta$ T-Lymphozyten.

Die Mittelwerte der einzelnen Ratten-Gruppen und Standardabweichungen können der Abbildung 4-7 entnommen werden. Beim Vergleich der thymektomierten mit den euthymischen Ratten wird eine leichte Verschiebung dieses Verhältnisses zu Gunsten der CD4-positiven Zellen deutlich.

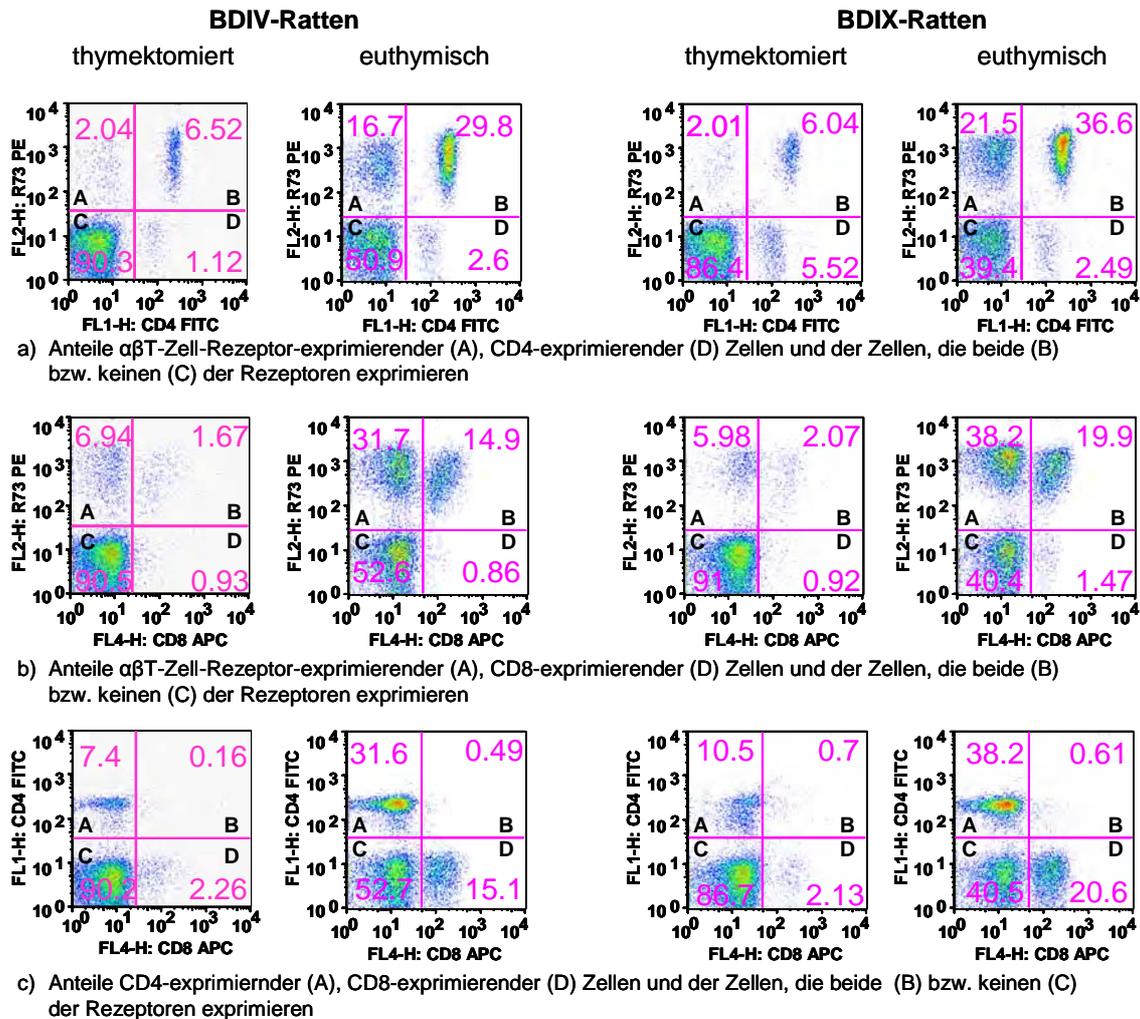


Abbildung 4-6

Dot Plots jeweils einer der thymektomierten und euthymischen BDIV- und BDIX-Ratte. Die Abbildungen geben die Anteile der $\alpha\beta$ -Zell-Rezeptor-, CD4- und CD8-exprimierenden Zellen an allen gemessenen lebenden Zellen wieder. Beim Vergleich der Werte zeigt sich, dass die thymektomierten Ratten beider Stämme deutlich weniger $\alpha\beta$ -Lymphozyten als die euthymischen Ratten besitzen (a bzw. b). Der Anteil CD4-exprimierender $\alpha\beta$ -Lymphozyten (a, Zellfraktion B) ist sowohl in den euthymischen als auch in den thymektomierten Ratten größer als der Anteil CD8-exprimierender $\alpha\beta$ -Lymphozyten (b, Zellfraktion B).

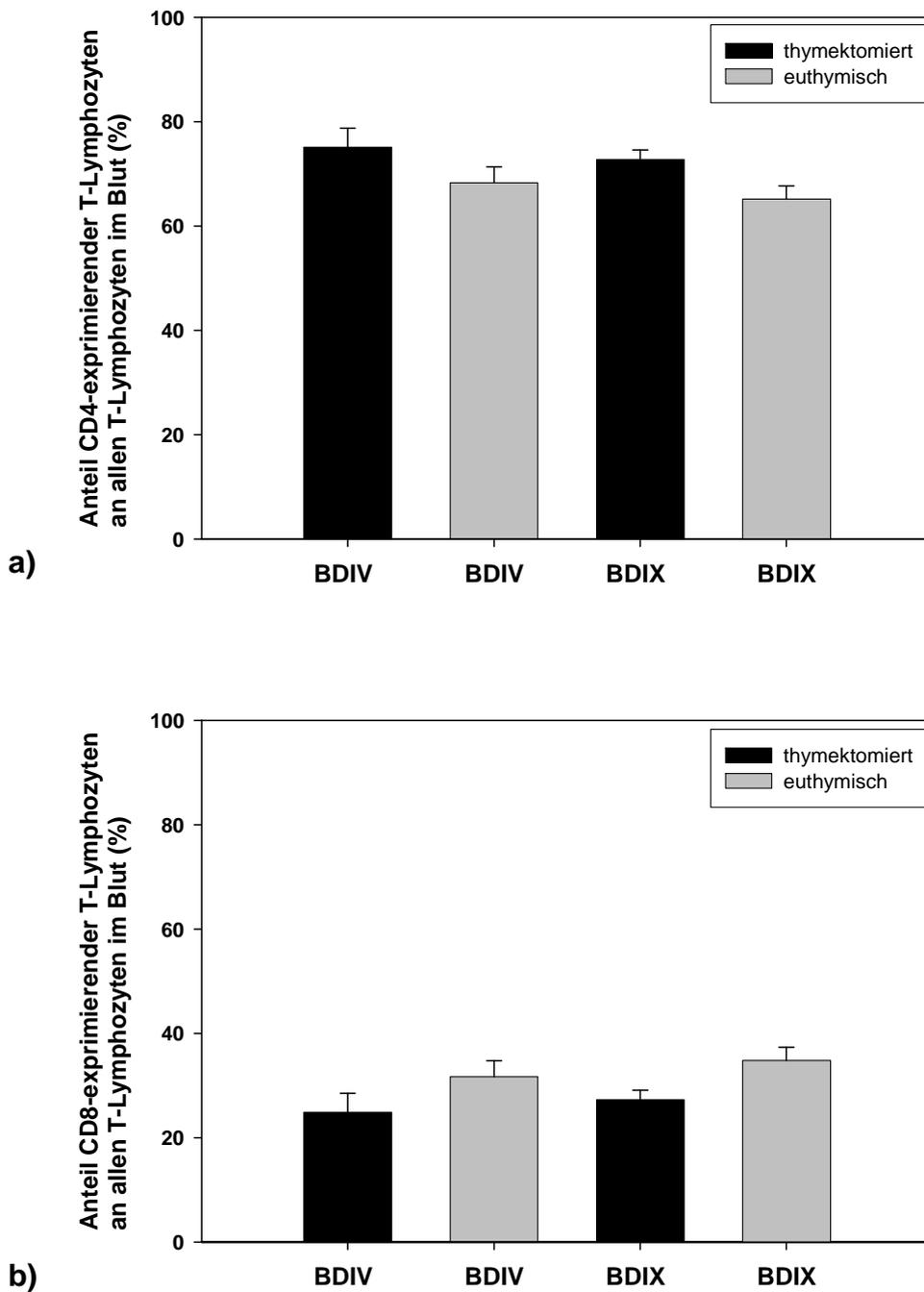


Abbildung 4-7

Darstellung der durchschnittlichen Verhältnisse CD4-exprimierender (a) zu CD8-exprimierenden (b) $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Blut 8 Wochen alter euthymischer und thymektomierter BDIV- und BDIX-Ratten mit den jeweiligen Standardabweichungen.

Bei allen untersuchten Ratten war der Anteil CD4-exprimierender $\alpha\beta$ T-Lymphozyten deutlich größer als der CD8-exprimierender Zellen.

Dieses Verhältnis verschiebt sich in den Gruppen der thymektomierten Ratten geringfügig zu Gunsten der CD4-positiven $\alpha\beta$ T-Lymphozyten.

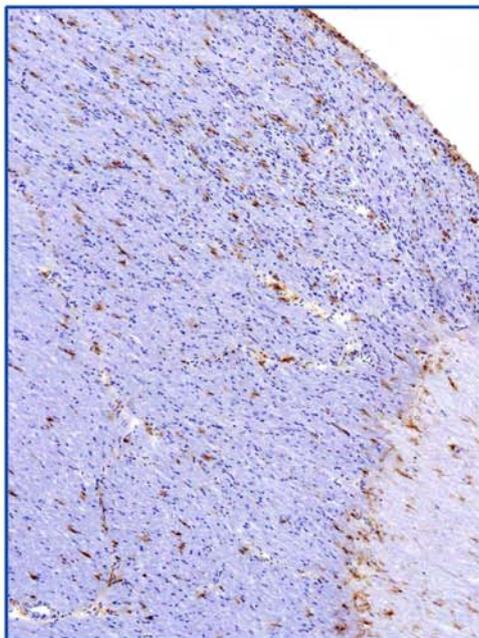
4.2.3 Quantifizierung eingewanderter T-Lymphozyten in den Nn. trigemini EtNU-behandelter thymektomierter Ratten und Identifizierung der CD4-exprimierenden Zellen als Makrophagen

Ergänzend zur Bestimmung der verbliebenen T-Lymphozyten im Blut wurden Zellen des Immunsystems mit den Leukozytenantigenen CD18, CD4 und CD8 in den Nn. trigemini thymektomierter Ratten immunhistochemisch detektiert. Damit sollte geklärt werden, ob residuale T-Lymphozyten dazu befähigt sind, in die Nn. trigemini einzuwandern.

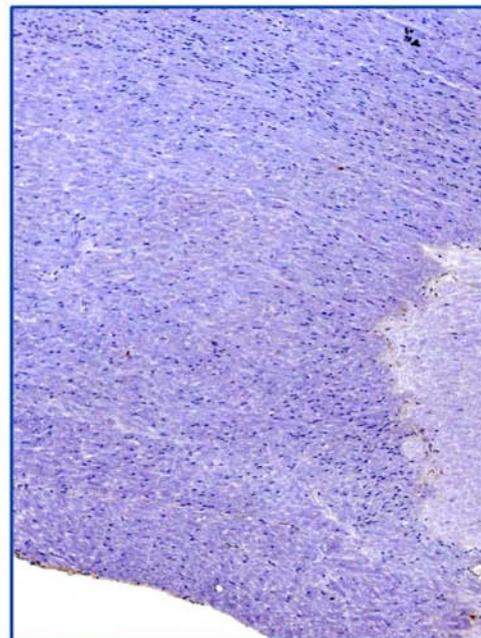
Es wurden Gefrierschnitte von den Nn. trigemini 8, 15, 23, 32, 40 und 48 Wochen alter thymektomierter und EtNU-behandelter BDIV-Ratten, sowie 8, 15, 24 und 32 Wochen alter thymektomierter und EtNU-behandelter BDIX-Ratten mit den jeweiligen Antikörpern gefärbt. Markierte Zellen wurden in einem Mikroskop mit Netzmikrometer ausgezählt (Beispiele in Abbildung 4-8).

Die Mengen der sich in den Regionen A und B befindenden gefärbten Zellen wurden mit den früher bestimmten Zellzahlen (siehe Kapitel 2.4 bzw. 4.1.1) euthymischer EtNU-behandelter Ratten verglichen (Abbildung 4-9). Dabei ergab sich, dass in den Nn. trigemini thymektomierter BDIV- und BDIX-Ratten CD4- und CD18-exprimierende Zellen in ähnlich hoher Zahl wie in den euthymischen EtNU-behandelten Ratten vorhanden waren, wohingegen CD8-positive Zellen nur in sehr geringen Mengen oder gar nicht gefunden werden konnten.

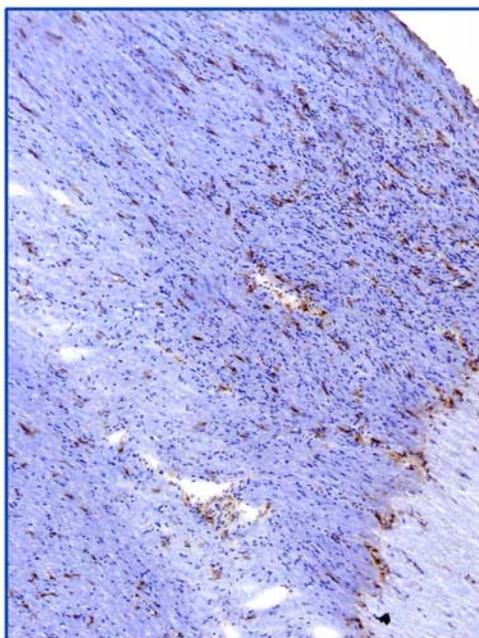
Da sowohl Makrophagen als auch T-Helfer-Zellen den Rezeptor CD4 exprimieren, wurde eine Differenzierung zwischen Makrophagen und T-Helfer-Zellen notwendig. Fast alle CD4-positiven Zellen erschienen bei der mikroskopischen Betrachtung zu groß für T-Helfer-Zellen und waren mit Fortsätzen ausgestattet. Die Identifizierung der Makrophagen wurde durch immunhistochemische Färbungen von Serienschnitten derselben Nerven mit Antikörpern gegen den T-Zell-Rezeptor bestätigt: TCR-exprimierende Zellen kamen nicht oder nur vereinzelt in derselben Region eines Nerven, in der sich viele CD4-exprimierende Zellen befanden, vor.



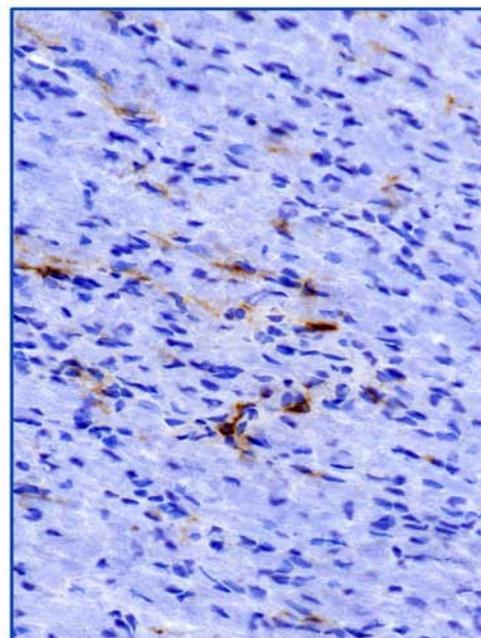
a) CD18-exprimierende Zellen



b) CD8-exprimierende Zellen



c) CD4-exprimierende Zellen



d) CD4-exprimierende Zellen, bei stärkerer Vergrößerung aufgenommen

Abbildung 4-8

Immunohistochemische Färbungen der Nn. trigemini 15 Wochen alter thymektomierter EtNU-behandelter BDIV-Ratten zur Detektion eingewanderter Immunzellen, 100-fach bzw. 400-fach vergrößert.

CD8-exprimierende Zellen sind in diesen Nerven nur vereinzelt zu finden (b). Dagegen kommen CD18- und CD4-exprimierende Zellen in großer Anzahl vor (a und c). Bei näherer Betrachtung der CD4-exprimierenden Zellen fallen wenige runde, hauptsächlich aber länglich geformte Zellen mit Ausläufern auf (d).

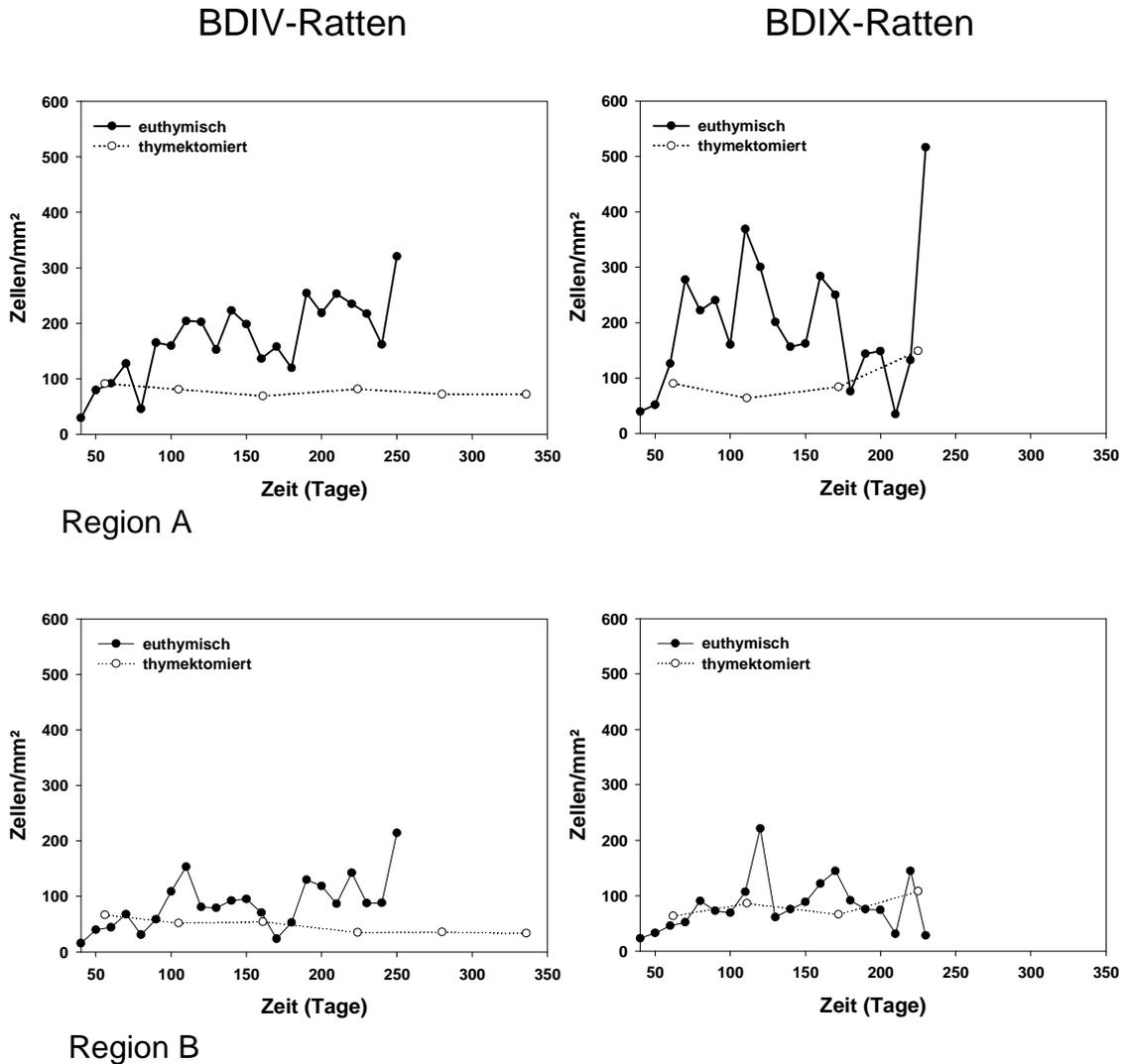


Abbildung 4-9 a
 Durchschnittliche Anzahl CD18-exprimierender Zellen in den Nn. trigemini euthymischer (durchgezogene Kurven) und thymektomierter (gestrichelte Kurven) EtNU-behandelter BDIV- und BDIX-Ratten als Funktion des Lebensalters.
 Es befinden sich noch zahlreiche CD18-exprimierende Zellen in den Nerven der thymektomierten Ratten beider Stämme.

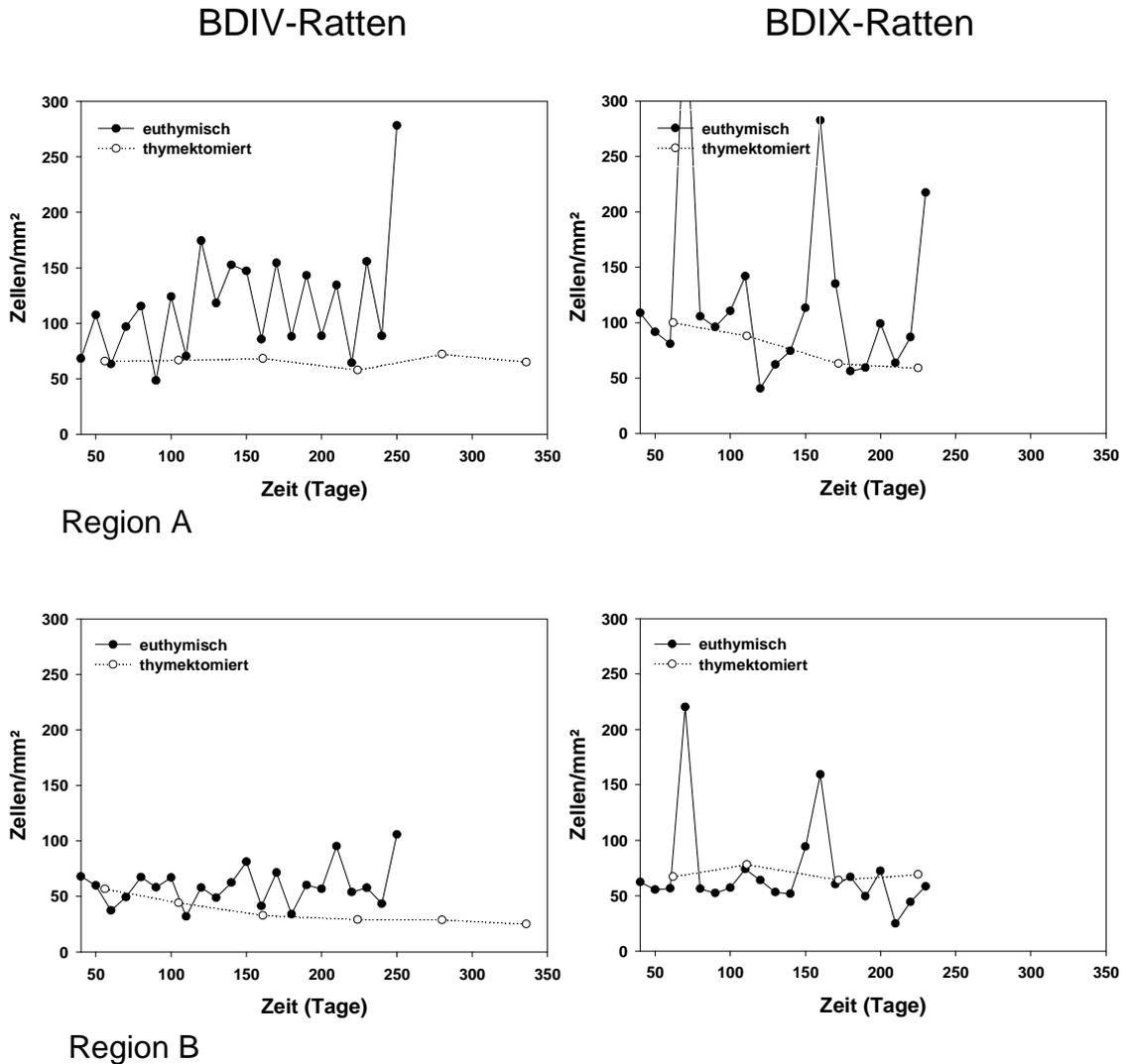


Abbildung 4-9 b

Durchschnittliche Anzahl CD4-exprimierender Zellen in den Nn. trigemini euthymischer (durchgezogene Kurven) und thymektomierter (gestrichelte Kurven) EtNU-behandelter BDIV- und BDIX-Ratten als Funktion des Lebensalters.

Es befinden sich noch zahlreiche CD4-exprimierende Zellen in den Nerven der thymektomierten Ratten beider Stämme.

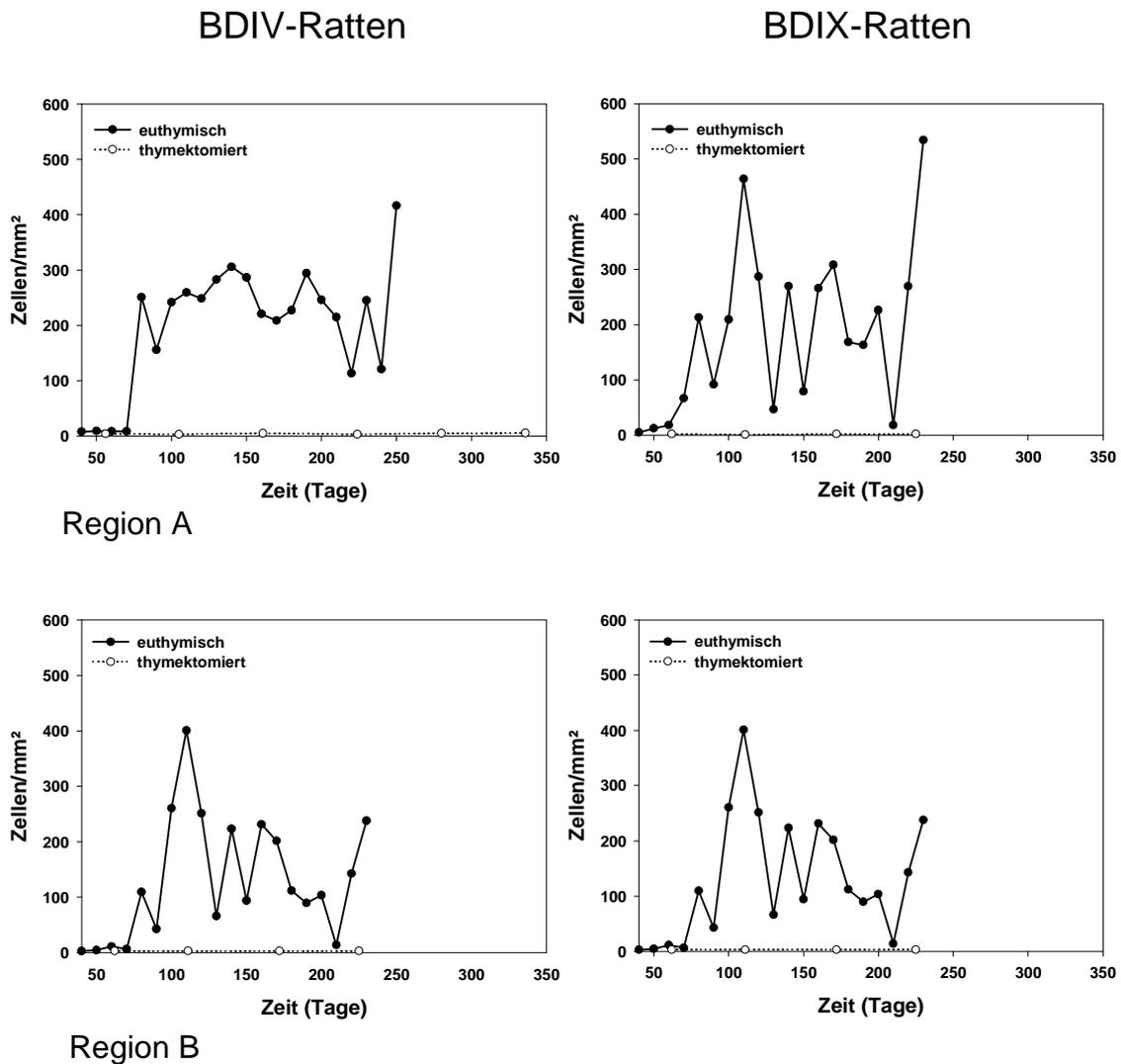


Abbildung 4-9 c

Durchschnittliche Anzahl CD8-exprimierender Zellen in den Nn. trigemini euthymischer (durchgezogene Kurven) und thymektomierter (gestrichelte Kurven) EtNU-behandelter BDIV- und BDIX-Ratten als Funktion des Lebensalters.

Im Gegensatz zu CD18- und CD4-exprimierenden Zellen (Abbildung 4-9 a und b) ist die Anzahl CD8-exprimierender Zellen in den thymektomierten Ratten beider Stämme im Vergleich zu den euthymischen Ratten in beiden Regionen stark reduziert.

4.2.4 Sektionsbefunde erkrankter thymektomierter und euthymischer Ratten

Thymektomierte und euthymische Ratten beider Stämme wurden bei Eintritt von Erkrankungsmerkmalen sofort getötet und unter besonderer Berücksichtigung der Nn. trigemini, des Gehirns, des Rückenmarks, der vom Rückenmarkskanal abgehenden Nerven und des möglichen Auftretens von Tumoren im Abdomen und der Muskulatur seziiert.

Folgende Befunde wurden erhoben:

Tabelle 4-3
Sektionsbefunde thymektomierter und euthymischer EtNU-behandelter BDIV- und BDIX-Ratten.

	BDIV		BDIX	
	thymektomiert	euthymisch	thymektomiert	euthymisch
Anzahl der beobachteten Ratten	49 (100%)	12 (100%)	34 (100%)	17 (100%)
davon Ratten mit				
malignen Schwannomen der Nn. trigemini	5 (10%)	0 (0%)	22 (65%)	12 (71%)
Tumoren, die makroskopisch verdächtig für maligne Schwannome peripherer Nerven waren	5 (10%)	0 (0%)	9 (26%)	4 (24%)
Tumoren des Rückenmarks	19 (39%)	2 (17%)	6 (18%)	4 (24%)
Tumoren des Gehirns	13 (27%)	4 (33%)	5 (15%)	1 (6%)
Blasen-, Knochen-, Milz-, Nieren-, Ovarial-, Prostatatumoren	8 (16%)	4 (33%)	8 (24%)	2 (12%)

Hierbei wurden Ratten, deren $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Blut durch die Thymektomie nicht deutlich gesenkt worden waren oder von denen keine $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Blut bestimmt worden waren, nicht mit einbezogen.

Drei euthymische und zwei thymektomierte Ratten überlebten den Beobachtungszeitraum von 18 Monaten. Bei einer dieser euthymischen EtNU-behandelten BDIV-Ratten, die plötzlich im Alter von 593 Tagen verstorben war, konnte bei der Sektion die Entwicklung eines malignen Schwannoms in einem der Nn. trigemini festgestellt werden.

4.2.5 Detektion von *Neu/ErbB-2*-mutierten Zellen in den Schwannomen beider Stämme

Eine Punktmutation im für eine Rezeptortyrosinkinase kodierenden *Neu/ErbB-2*-Gen ist beweisend für EtNU-induzierte Tumoren des peripheren Nervensystems.

Das Verhältnis von mutierten Allelen zu Wildtyp-Allelen wurde bei allen malignen Schwannomen thymektomierter Ratten unabhängig von ihrer Lokalisation (Nn. trigemini oder andere Nerven) bestimmt. Dies geschah durch eine PCR des die Mutation tragenden Fragmentes mit anschließender Restriktionsverdauung. Im Falle einer Mutation entsteht ein zusätzliches Fragment von 104 Basenpaaren. Überdies wurden alle Tumoren thymektomierter und euthymischer Ratten, die das morphologische Bild von Schwannomen besaßen und deren Ursprungsgewebe ungeklärt blieb, zur Sicherung der Diagnose untersucht.

Das Verhältnis wurde anhand der Bandendicke der durch die Gelelektrophorese aufgetrennten unterschiedlich langen DNA-Fragmente geschätzt (Abbildung 4-10). Lag der Anteil mutierter Allele bei über 50%, so musste davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Tumor um ein malignes Schwannom handelte, dessen initiales Ereignis die Mutation im *Neu/ErbB-2*-Gen war. Durch den späteren Verlust des Wildtyp-Allels (Loss of heterozygosity, LOH) und die klonale Expansion dieser Zellen dominiert der Anteil mutierter Allele im Nerv deutlich.

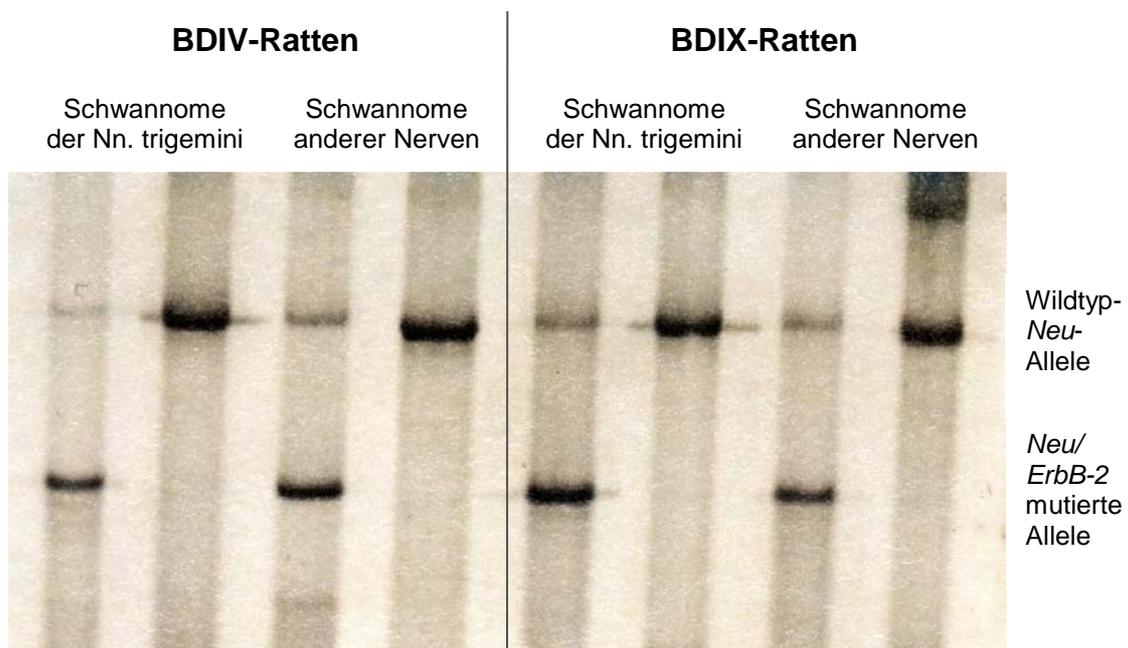


Abbildung 4-10

Gelelektrophorese der durch PCR aus verschiedenen malignen Schwannomen amplifizierten und durch den darauf folgenden enzymatischen Verdau unterschiedlich langen Fragmente des *Neu/ErbB-2*-Gens.

Sowohl die thymektomierten BDIV- als auch BDIX-Ratten entwickelten maligne Schwannome der Nn. trigemini und anderer Nerven, in denen *Neu/ErbB-2*-mutierte Allele fehlten.

Der Nachweis mutierter Zellen in einigen Schwannomen der Nn. trigemini von euthymischen EtNU-behandelten BD-Ratten diente der Überprüfung der Methode und bestätigte die deutliche Präsenz von im *Neu/ErbB-2*-Gen mutierten Zellen in EtNU-induzierten malignen Schwannomen (NIKITIN et al., 1991).

Die Tabelle 4-4 stellt die Menge der Tumoren mit im *Neu/ErbB-2*-Gen mutierten Allelen für alle untersuchten Versuchsgruppen und die dazugehörigen Konfidenzintervalle zusammen. Die Gruppe der thymektomierten BDIX-Ratten umfasst nur 32 Tumoren, da ein malignes Schwannom im N. trigeminus schon zu stark zersetzt war und nicht ausgewertet werden konnte.

Tabelle 4-4

Anzahl von malignen Schwannomen thymektomierter und euthymischer BDIV- und BDIX-Ratten mit vorwiegend im *Neu/ErbB-2*-Gen mutierten Zellen.

* KI.: Die Zahlen geben die jeweiligen exakten 95% Konfidenzintervalle wieder.

	BDIV		BDIX	
	thymektomiert	euthymisch	thymektomiert	euthymisch
Maligne Schwannome der Nn. trigemini mit mutierten Allelen im <i>Neu/ErbB-2</i> -Gen	5 von 6 (83,33%)	0 von 0 (0%)	29 von 33 (87,88%)	15 von 15 (100%)
	KI.* 36-100		KI.* 75-98	KI.* 78-100
Maligne Schwannome anderer Nerven mit mutierten Allelen im <i>Neu/ErbB-2</i> -Gen	0 von 3 (0%)	0 von 0 (0%)	9 von 11 (81,82%)	4 von 4 (100%)
	KI.* 0-71		KI.* 48-98	KI.* 40-100

Überraschenderweise wurden maligne Schwannome der Nn. trigemini gefunden, die aufgrund ihrer Lokalisation eindeutig zu identifizieren waren, bei denen die mutierten Allele aber nicht oder nur in geringem Maße nachzuweisen waren. Dies betraf 4 der 33 Tumoren (12,12%) thymektomierter BDIX-Ratten und 1 der 6 Tumoren (16,67%) thymektomierter BDIV-Ratten. In den malignen Schwannomen, die von den Nn. trigemini euthymischer BDIX-Ratten stammten, konnte dagegen immer ein großer Anteil mutierter Allele nachgewiesen werden.

Ähnliches zeigte sich auch bei der Betrachtung der peripher gelegenen Tumoren mit einer für maligne Schwannome charakteristischen Morphologie und einem ungeklärten Ursprungsgewebe: Alle aus den euthymischen BDIX-Ratten stammenden Tumoren trugen die mutierten Allele. In 2 der 11 Tumoren (18,18%) thymektomierter BDIX-Ratten und 3 der 3 Tumoren (100%) thymektomierter BDIV-Ratten, die histologisch als maligne Schwannome klassifiziert worden waren (siehe folgendes Kapitel), konnte dagegen die Mutation nicht bzw. nur in einem geringen Anteil detektiert werden.

Weil die jeweiligen Ratten-Gruppen zu klein sind, wird dieses Ergebnis statistisch nicht signifikant (siehe Konfidenzintervalle Tabelle 4-5). Bemerkenswert bleibt jedoch, dass bei einigen hunderten in früheren Studien untersuchten euthymischen EtNU-behandelten BDIX-Ratten niemals zuvor maligne Schwannome ohne mutierte Allele des *Neu/ErbB-2*-Gens gefunden worden waren.

In der einzigen euthymischen EtNU-behandelten BDIV-Ratte, die nach der deutlich verlängerten Überlebenszeit von 593 Tagen ein malignes Schwannom im N. trigeminus entwickelt hatte, konnte ein großer Anteil mutierter Allele nachgewiesen werden.

4.2.6 Klassifikation der Tumoren als maligne Schwannome durch die histologische Untersuchung

Einige EtNU-induzierte Tumoren wiesen makroskopisch die für maligne Schwannome charakteristischen Merkmale in der Sektion auf, ohne dass die Mutation im *Neu/ErbB-2*-Gen nachweisbar war. In diesem Fall wurde der Ursprung aus dem peripheren Nervensystem durch den immunhistochemischen Nachweis des von Gliazellen exprimierten S100-Proteins ermittelt. Die Diagnose eines malignen Schwannoms wurde durch die Versilberung der Retikulinfasern, die in Schwannomen vorkommen und die Zellen spindelförmig umspinnen, gestellt (Abbildung 4-11).

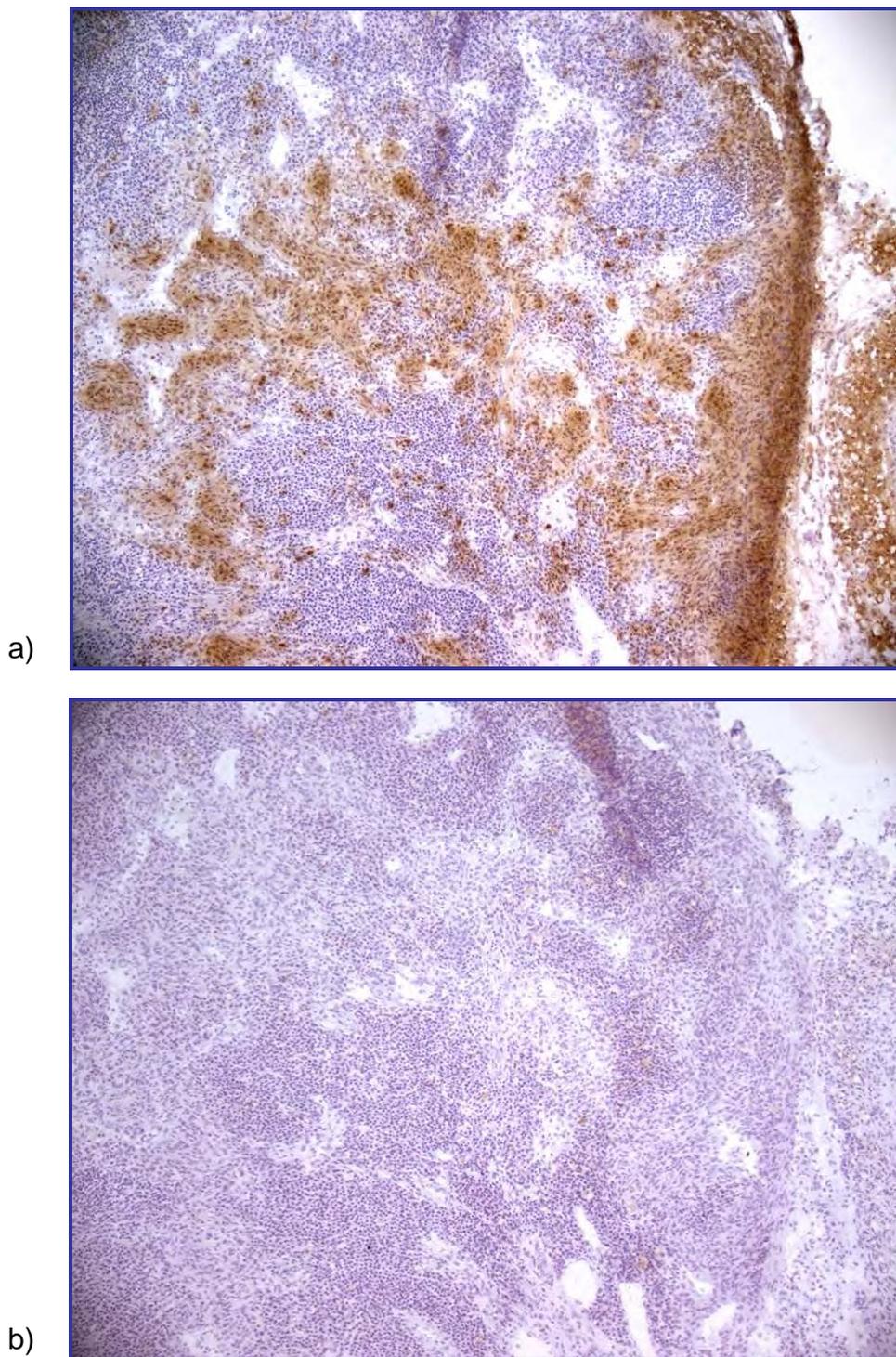
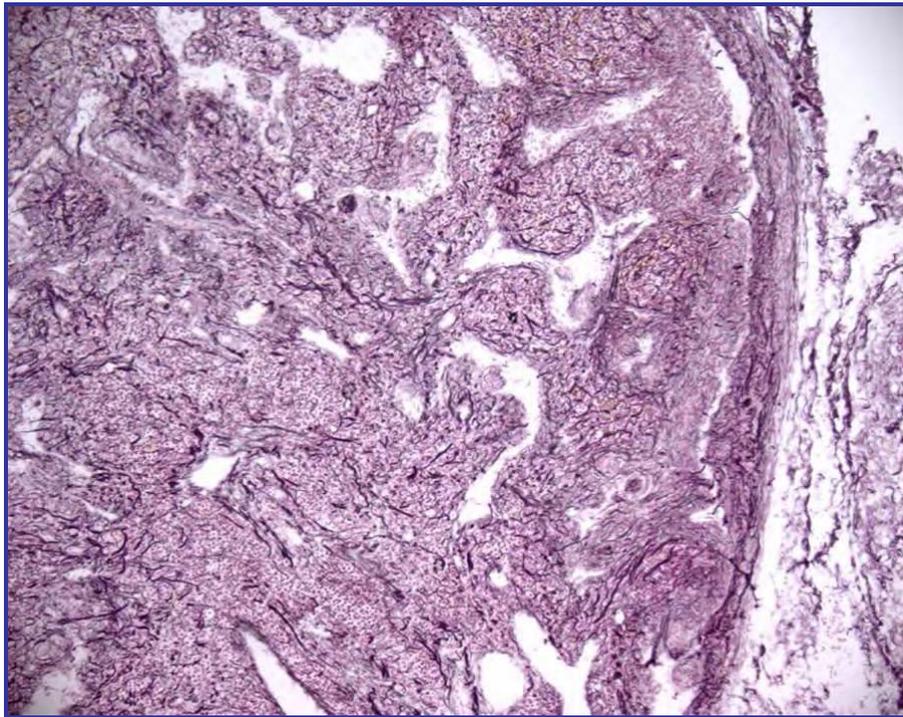
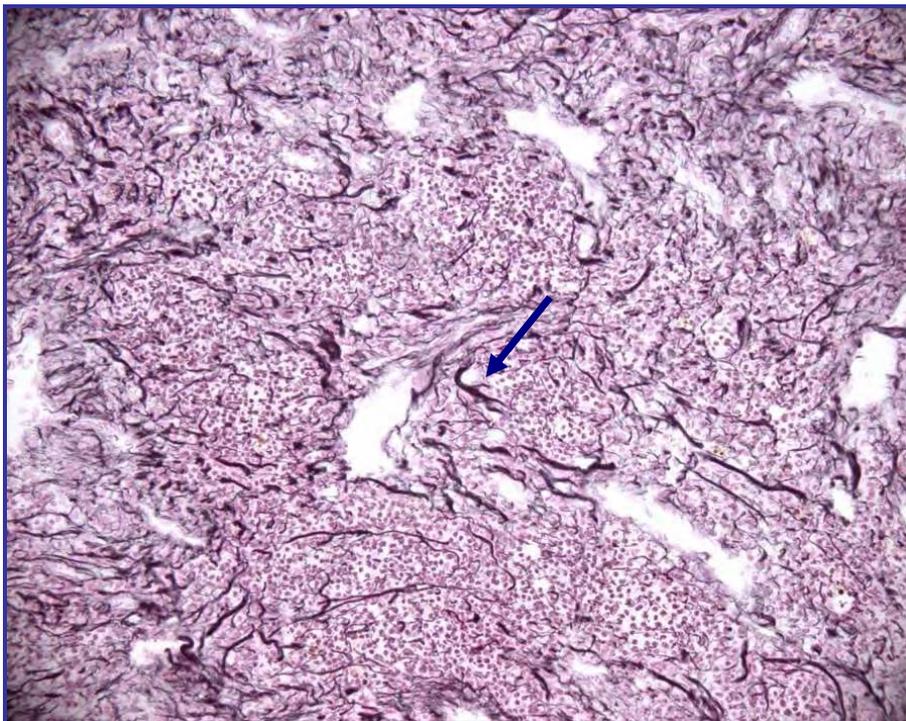


Abbildung 4-11 a
Immunhistochemische Färbung des S100-Proteins in einem histologischen Gewebeschnitt eines aus dem Abdomen stammenden Schwannoms ohne *Neu/ErbB-2*-Mutation, 100-fach vergrößert.

- a) mit Färbung des Primär-Antikörpers
- b) Kontrolle ohne Primär-Antikörper-Inkubation



a)



b)

Abbildung 4-11 b

Versilberung der Retikulinfasern in einem histologischen Gewebeschnitt eines aus dem Abdomen stammenden Schwannoms ohne *Neu/ErbB-2*-Mutation, 100-fach (a) bzw. 400-fach (b) vergrößert.

Diese lassen sich als die Zellen spindelförmig umschließende Fasern darstellen (Pfeil).

Da sich im Tumorgewebe sowohl die S100-positiven Proteine als auch die Retikulinfasern anfärben lassen, handelt es sich um ein Schwannom trotz des Fehlens der mutierten Allele.

Es zeigte sich, dass von den 5 in der Sektion gefundenen Tumoren thymektomierter BDIV-Ratten, bei denen der Verdacht eines malignen Schwannoms bestand, 3 als maligne Schwannome zu klassifizieren waren, obwohl bei keinem dieser Schwannome die Mutation im *Neu/ErbB-2*-Gen nachgewiesen werden konnte. Die anderen 2 Tumoren besaßen weder die Mutation noch histologische Merkmale maligner Schwannome.

Dagegen waren alle makroskopisch verdächtigen Tumoren der thymektomierten BDIX-Ratten als maligne Schwannome durch den Nachweis der Mutation oder histologischer Merkmale identifiziert worden, wobei 2 der 11 Tumoren keine Mutation besaßen.

4.2.7 Inzidenz maligner Schwannome und Überlebenszeit in beiden BD-Rattenstämmen

Bei der Ermittlung der Tumorinzidenz thymektomierter Ratten wurden sowohl Tumoren mit als auch ohne *Neu*-mutierten Zellen berücksichtigt.

Nachdem alle Ratten mit vergleichsweise hohen Anteilen an T-Lymphozyten im Blut aus der Studie eliminiert worden waren, ergaben sich die in der Tabelle 4-5 aufgeführten Anzahlen von Ratten mit malignen Schwannomen. Da die Gruppe der euthymischen Kontrollen des Stammes BDIV mit 12 Tieren sehr klein war, wurden 23 historische Kontrollratten aus einer vorausgegangenen Studie (EtNU-behandelte BDIV-Ratten) addiert.

Durch die statistische Auswertung mittels Fisher-Test zeigte sich, dass die Tumorinzidenz thymektomierter BDIV-Ratten im Vergleich zu den euthymischen BDIV-Ratten signifikant erhöht ist ($p = 0,0184$).

Die als Kontrolltiere ohne vorherige EtNU-Injektion thymektomierten BDIV-Ratten bildeten keine malignen Schwannome und lebten nach 2 Jahren alle noch.

In der Gruppe der BDIX-Ratten konnte durch die Thymektomie keine Veränderung der Tumorinzidenz erreicht werden (siehe Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5

Effekte der neonatalen Thymektomie von EtNU-behandelten BDIV- und BDIX-Ratten auf die Entwicklung maligner Schwannome.

* KI.: Die Zahlen geben die jeweiligen exakten 95% Konfidenzintervalle wieder.

	BDIV		BDIX	
	thymektomiert	euthymisch	thymektomiert	euthymisch
Anzahl der beurteilten Ratten	49	35	34	17
den Beobachtungszeitraum überlebende Ratten	2 von 49	3 von 35	0	0
davon Ratten mit				
malignen Schwannomen der Nn. trigemini	5 von 49 (10,20%)	0 von 35	22 von 34 (64,71%)	12 von 17 (70,59%)
einseitigem malignen Schwannom der Nn. trigemini	4 von 49 (8,16%)	0 von 35	10 von 34 (29,41%)	9 von 17 (52,94%)
	KI.* 2-20	KI.* 0-10	KI.* 15-47	KI.* 28-77
beidseitigen malignen Schwannomen der Nn. trigemini	1 von 49 (2,04%)	0 von 35	12 von 34 (35,29%)	3 von 17 (17,65%)
	KI.* 0-11	KI.* 0-10	KI.* 20-54	KI.* 4-43
malignen Schwannomen anderer Nerven	3 von 49 (6,12%)	0 von 35	9 von 34 (26,47%)	4 von 17 (23,53%)
	KI.* 1-17	KI.* 0-10	KI.* 13-44	KI.* 7-50
malignen Schwannomen ausschließlich anderer Nerven	3 von 49 (6,12%)	0 von 35	7 von 34 (20,59%)	2 von 17 (11,76%)
	KI.* 1-17	KI.* 0-10	KI.* 9-38	KI.* 1-34
Tumorinzidenz	8 (16,33%)	0 (0%)	29 (85,29%)	14 (82,35%)
	KI.* 7-30	KI.* 0-10	KI.* 69-95	KI.* 57-96
Tumoranzahl pro betroffene Ratte	1,1	0	1,6	1,4

Eine Besonderheit stellt die euthymische BDIV-Ratte dar, die nach dem Beobachtungszeitraum von 18 Monaten (im Alter von 593 Tagen) ein malignes Schwannom entwickelte: In anekdotischen Artikeln über die Tumorzinzidenz EtNU-behandelter BDIV-Ratten wurde von nur sehr wenigen Tieren (vermutlich im Promille-Bereich), die maligne Schwannome entwickelt hatten, berichtet. In unserer Arbeitsgruppe wurde bislang nie eine solche Ratte gesehen (KINDLER-ROHRBORN et al., 1999). Aufgrund der deutlichen Überschreitung des Beobachtungszeitraumes wurde diese Ratte bei der Bestimmung der Tumorzinzidenz nicht mit einbezogen.

Bei der Betrachtung der Lokalisation maligner Schwannome wurde außerdem deutlich, dass thymektomierte EtNU-behandelte BDIX-Ratten häufiger in beiden Nn. trigemini gleichzeitig maligne Schwannome entwickelten als die euthymischen EtNU-behandelten Kontrollratten des gleichen Stammes. Statistisch ist dieses Ergebnis jedoch nicht signifikant.

Im Hinblick auf die Verteilung der Schwannome auf die proximalen und distalen Nerven zeigte sich kein Effekt (Tabelle 4-6).

Tabelle 4-6

Effekte der neonatalen Thymektomie von BDIV- und BDIX-Ratten auf die Entwicklung maligner Schwannome.

* KI.: Die Zahlen geben die jeweiligen exakten 95% Konfidenzintervalle wieder.

	BDIV		BDIX	
	thymektomiert	euthymisch	thymektomiert	euthymisch
Anzahl maligner Schwannome	9	0	45	19
Maligne Schwannome der Nn. trigemini	6 von 9 (66,67%) KI.* 30-93	0	34 von 45 (75,56%) KI.* 60-87	15 von 19 (78,95%) KI.* 54-94
Maligne Schwannome anderer Nerven	3 von 9 (33,33%) KI.* 7-70	0	11 von 45 (24,44%) KI.* 13-40	4 von 19 (21,05%) KI.* 6-46

Um vergleichen zu können, ob sich die Überlebenszeiten euthymischer und thymektomierter Ratten ähnelten, wurden alle operierten Ratten bzw. Kontrollratten eines Stammes zu jeweils einer Gruppe zusammengefasst und aus den einzelnen Überlebenszeiten einer Gruppe der Median gebildet.

Die Überlebenszeit einer Ratte wurde zuvor definiert als die Zeit zwischen der EtNU-Exposition (erster Postnataltag) und dem Tag der Tötung, die wegen des Auftretens von Krankheitssymptomen durchgeführt wurde, bzw. dem Tag des plötzlich eingetretenen Todes (zum Beispiel bei plötzlich zur Blutung führenden Tumoren des Gehirns). Sie entspricht im Falle eines malignen Schwannoms der Nn. trigemini oder Gehirntumors weitgehend der Latenzzeit, welche den Zeitraum zwischen der EtNU-Exposition und dem Erscheinen erster Krankheitssymptome wiedergibt, da die Tiere innerhalb weniger Tage schwerwiegende Symptome entwickeln, die eine schnelle Tötung erfordern, bzw. ihrer Krankheit erliegen.

Dagegen weicht die Überlebenszeit bei Rückenmarkstumoren, Tumoren der abdominal gelegenen Organe wie Nierentumoren und von anderen Nerven als den Nn. trigemini entstammende Schwannomen größtenteils von der Latenzzeit ab, da die Tumoren trotz einer raschen Größenzunahme oft nicht sofort zu einer schwerwiegenden Beeinträchtigung führen.

Die in Abbildung 4-12 dargestellten Kaplan-Meier-Kurven veranschaulichen die Auswirkungen der Thymektomie auf die Überlebenszeiten beider Stämme:

Es zeigte sich, dass thymektomierte BDIV-Ratten mit einer medianen Überlebenszeit von 294 Tagen die deutlich kürzeren medianen Überlebenszeiten thymektomierter BDIX-Ratten (203 Tage) und euthymischer BDIX-Ratten (201 Tage) nicht erreichen konnten.

Die Kurven der thymektomierten und euthymischen BDIX-Ratten sind nahezu deckungsgleich und verdeutlichen, dass die Thymektomie keinen Effekt auf die mediane Überlebenszeit der BDIX-Ratten hatte.

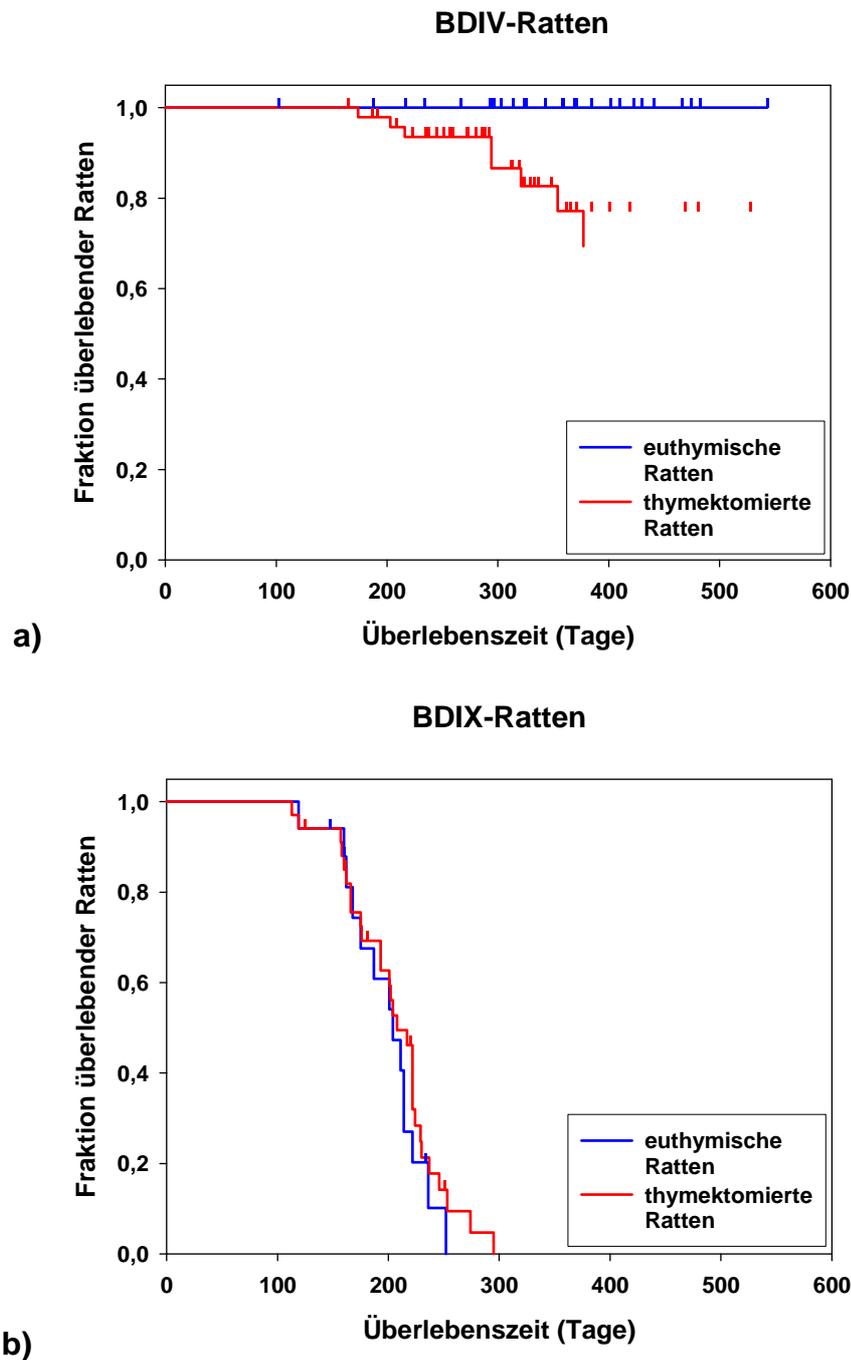


Abbildung 4-12

Kaplan-Meier-Überlebens-Kurven thymektomierter (rote Kurven) und euthymischer (blaue Kurven) BDIV- (a) und BDIX-Ratten (b).

Die Tiere, die aufgrund anderer Erkrankungen starben oder getötet werden mussten, sind in den Kurven mit kurzen senkrechten Strichen markiert.

Während die zwei Kurven der BDIV-Ratten in ihrem Abfall stark differieren, ist bei den thymektomierten und euthymischen BDIX-Ratten kein Unterschied in der Überlebenszeit zu erkennen. Die Ratten dieses Stammes starben darüber hinaus fast ausschließlich an malignen Schwannomen.

4.2.8 Korrelation zwischen Anteilen verbliebener T-Lymphozyten im Blut und dem Auftreten von Schwannomen

Durch die Bestimmung der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Anteile im Blut thymektomierter BDIV- und BDIX-Ratten wurde überprüft, inwieweit die operative Entfernung des Thymus am ersten Postnataltag zu einer deutlichen Reduktion dieser Zellen führte. Wegen der starken Streuung der Werte (siehe Kapitel 4.2.1) stellte sich die Frage, ob bei den Ratten, die maligne Schwannome entwickelten, zuvor weniger $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Blut gemessen wurden als bei den Ratten ohne Tumoren.

Die Abbildung 4-13 gibt die $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Anteile thymektomierter BDIV- bzw. BDIX-Ratten wieder. Dabei sind Werte von Ratten mit malignen Schwannome rot und ohne Tumorentwicklung blau markiert.

Alle BDIV-Ratten, die maligne Schwannome entwickelten, hatten geringe $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Fractionen im Blut verglichen mit den Werten aller thymektomierter BDIV-Ratten, wobei diese Tendenz mit zunehmendem Alter an Deutlichkeit verliert. Wegen der niedrigen Tierzahlen ist dieses Ergebnis aber nicht statistisch signifikant.

Es gab jedoch auch viele BDIV-Ratten, die keine Tumoren bekamen, obwohl bei ihnen nur wenige $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Blut gemessen worden waren.

BDIX-Ratten entwickelten dagegen ähnlich häufig maligne Schwannome, wenn ihre $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Fractionen im Blut groß waren und denen nicht thymektomierter BDIX-Ratten entsprachen.

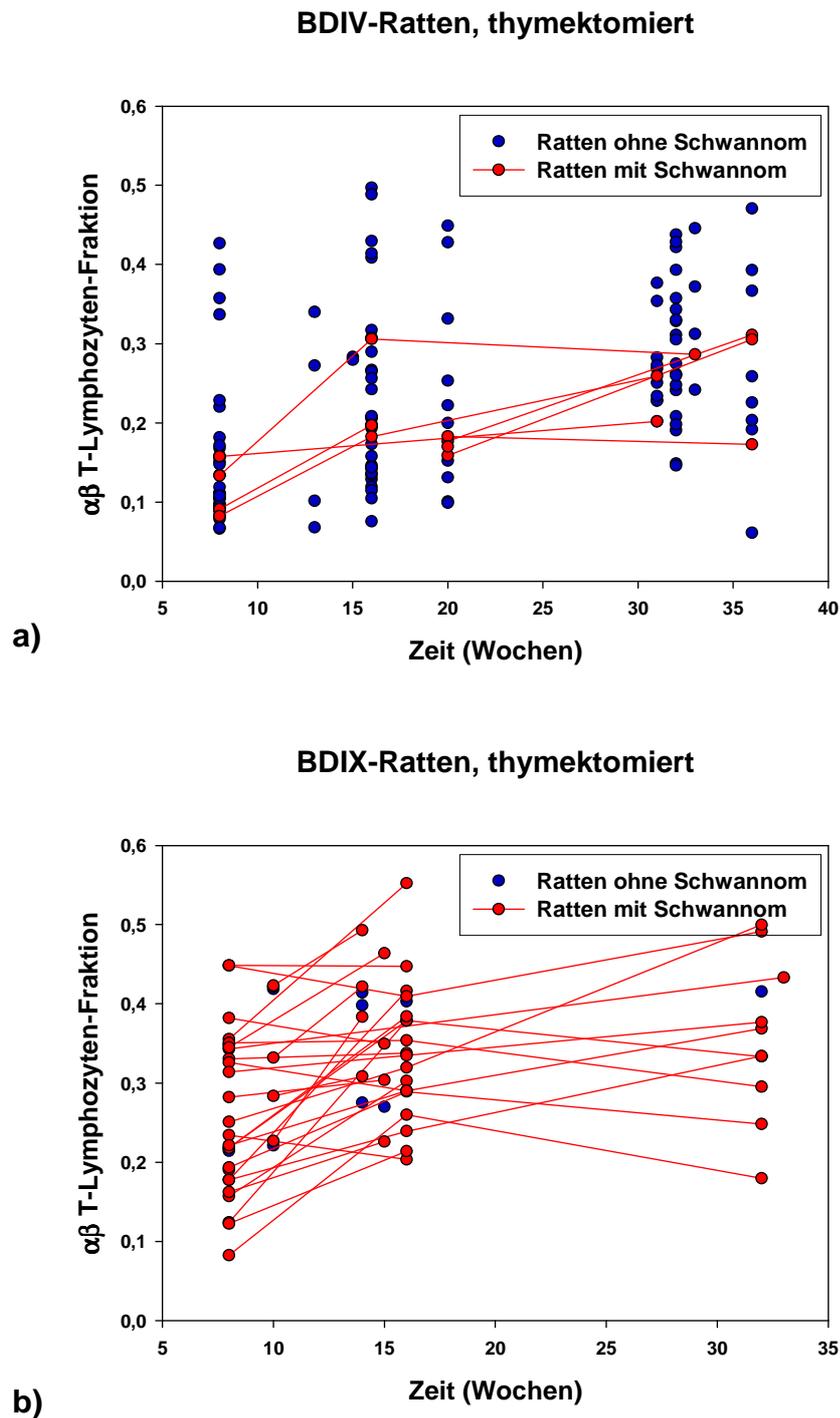


Abbildung 4-13

Korrelation der Menge residueller $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Blut mit der Entwicklung maligner Schwannome thymektomierter BDIV- (a) bzw. BDIX-Ratten (b).

Die roten Linien verbinden Werte eines Tieres.

Während den BDIV-Ratten, die maligne Schwannome entwickelten, niedrige Werte zugeordnet werden können, besteht keine Korrelation zwischen der Menge residueller Lymphozyten und dem Auftreten eines malignen Schwannoms.

4.2.9 Histomorphologie der Nn. trigemini thymektomierter BDIV-Ratten ohne Schwannomentwicklung

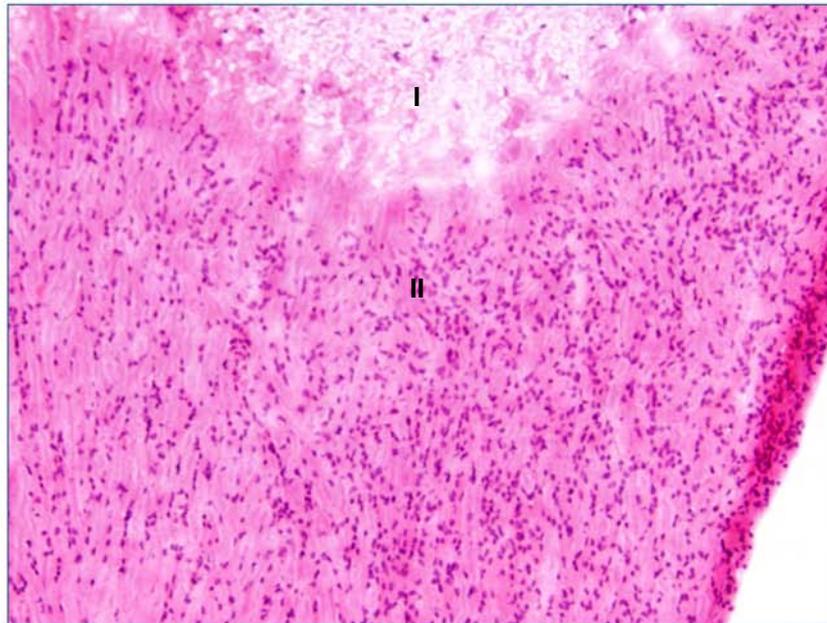
In früheren histologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich sowohl in den Nerven der BDIV- als auch in denen der BDIX-Ratten um den Tag 70 nach der EtNU-Applikation prä maligne Zellen befinden. Sie stellen sich als unregelmäßig begrenzte Zellen mit abgerundeten Zellkernen und erhöhter Nukleus-Zytoplasma-Relation dar und akkumulieren in multiplen gruppierten Zellhaufen nahe der Hirn-Nerv-Grenze. Im Gegensatz zu den BDIX-Ratten fangen diese Zellen in den Nerven der BDIV-Ratten um Tag 90 an, zu verschwinden, und die Nerven erlangen etwa am Tag 180 ihre ursprüngliche Morphologie zurück (KINDLER-ROHRBORN et al., 2000).

Da ein großer Anteil thymektomierter BDIV-Ratten trotz weniger $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Blut bis zum Zeitpunkt der Tötung keine Schwannome entwickelt hatte, war zu klären, welche Morphologie deren Nn. trigemini besaßen.

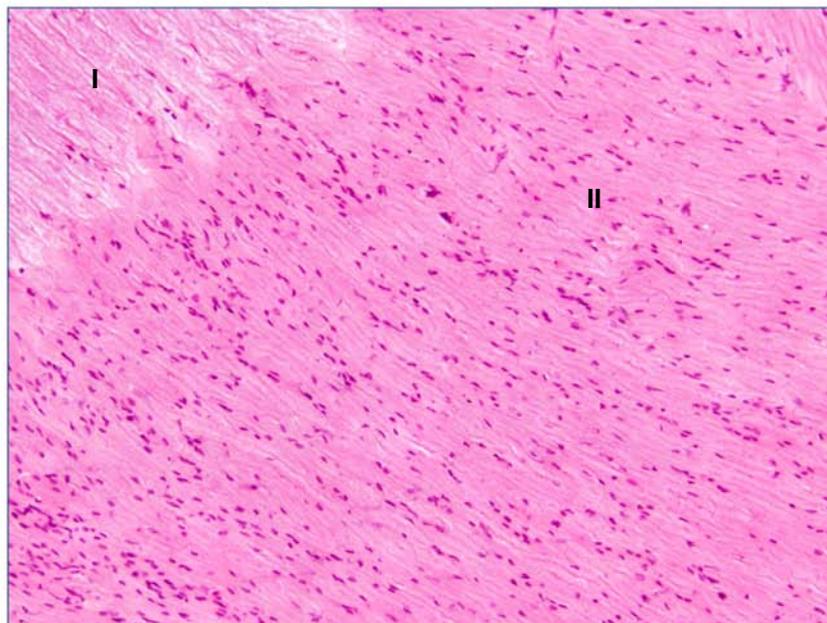
Deshalb wurden Gefrierschnitte der Nerven von 14 der 240 bis 435 Tage alten Ratten histologisch untersucht, nachdem sie mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt worden waren (Abbildung 4-14).

Bei der Betrachtung unter dem Mikroskop zeigte sich, dass die Mehrzahl aller Nerven (18 von 28) kaum morphologisch veränderte Schwannsche Zellen aufwies. Stattdessen wirkte die Struktur ähnlich regeneriert wie die euthymischer EtNU-behandelter BDIV-Ratten im Alter von 180 Tagen. Bei 10 der 28 Nerven dominierten dagegen die morphologisch veränderten prä malignen Zellen in der Region nahe der Hirn-Nerv-Grenze.

Erstaunlicherweise konnte in diesen Nerven bei der sich anschließenden Mutationsanalyse keine im *Neu/ErbB-2*-Gen mutierten Zellen gefunden werden, welche für die prä malignen Zellen in den Nerven EtNU-behandelter BDIX-Ratten beweisend sind.



a) N. trigeminus einer 313 Tage alten thymektomierten BDIV-Ratte



b) N. trigeminus einer 330 Tage alten thymektomierten BDIV-Ratte

Abbildung 4-14

Morphologie der Nn. trigemini thymektomierter EtNU-behandelter BDIV-Ratten im Alter von mehr als 300 Tagen, Gefrierschnitte gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin, 100-fach vergrößert. Die BDIV-Ratten wurden wegen eines Tumors im Gehirn bzw. Rückenmark getötet. Makroskopisch erschienen ihre Nn. trigemini unverändert. Während der Nerv der einen Ratte nahe der Gehirn (I)-Nerv (II)-Grenze noch viele prä-maligne Zellen – unregelmäßig geformt Zellen mit abgerundetem Zellkern, die zu Zellhaufen akkumulieren - besitzt und seine Struktur dadurch unruhig erscheint (a), ähnelt die Morphologie des Nervs der anderen Ratte derer euthymischer EtNU-behandelter und unbehandelter BDIV-Ratten gleichen Alters (b).

5. Diskussion

5.1 Die Antwort des Immunsystems auf die Entstehung prämaligner Schwannscher Zellen in den Nn. trigemini von BDIV- und BDIX-Ratten

Die Bedeutung des Immunsystems für das Tumorrisiko von Mensch und Tier war noch vor einigen Jahren sehr umstritten, da konkrete Kenntnisse zu dieser Thematik fehlten.

Erst in den letzten Jahren wurde durch eine Vielzahl von Studien deutlich, dass der Einfluss der Immuneffektorzellen auf den Ablauf der Entstehung verschiedener Tumoren stark differiert: Einerseits gilt heute als unumstritten, dass Immuneffektorzellen die Beseitigung bestimmter, spontan entstandener, prämaligner und maligner Zellen bewirken und somit die Tumor-Entwicklung verhindern können (DUNN et al., 2002). Andererseits kommt es auch in immunkompetenten Individuen zur Entstehung von Tumoren (DUNN et al., 2002). Sogar von kanzerogenesefördernden Effekten - zum Beispiel der Initiation der Tumorentstehung durch chronische Entzündungsreaktionen - wurde berichtet (CLEVERS, 2004; DE VISSER and COUSSENS, 2005).

In vielen bereits etablierten Tumoren konnte eine teils massive Infiltration von Immuneffektorzellen wie T-Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen und Natürlichen Killerzellen nachgewiesen werden (BISSELL and RADISKY, 2001). Unterschiedliche Chemokine und Zytokine, die entweder von den Tumorzellen selbst oder von Zellen des Stromas sezerniert werden, oder das Vorhandensein von Zelltrümmern können deren Invasion bewirken (MURDOCH et al., 2004). Abhängig von der Art des Tumors und der Immuneffektorzellen unterscheiden sich deren Wirkungen auf den Tumor erheblich: Bei einigen Tumorentitäten korreliert das Ausmaß der Infiltration von T-Lymphozyten positiv mit der Überlebenszeit der Patienten (NAITO et al., 1998). Eine vollständige Regression eines infiltrierte Tumors ist jedoch bislang in keinem Fall festgestellt worden. In zuvor immunisierten BDIX-Ratten konnte nachgewiesen werden, dass durch T-Lymphozyten aktivierte Makrophagen transplantierte Kolon-Tumorzellen abtöten (BONNOTTE et al., 2001). In anderen Tumorentitäten zeigen die T-Lymphozyten dagegen eine Toleranz gegenüber

den Tumorzellen (ZIPPELIUS et al., 2004) und bestimmte Immuneffektorzellen wie regulatorische T-Lymphozyten und Makrophagen besitzen zudem die Fähigkeit, das Tumorwachstum zu fördern (ZOU, 2005).

Da diese Erkenntnisse aus Studien an bereits etablierten Tumoren stammen, bleibt unklar, inwieweit die Immuneffektorzellen auch in frühe Entwicklungsstadien von Tumoren eingreifen bzw. deren Entwicklung verhindern.

Ein geeignetes Modell zur Erforschung des Einflusses invadierender Immuneffektorzellen auf die Tumorentstehung ist die chemisch induzierte Kanzerogenese im Nervensystem von BD-Ratten. Über 85% der BDIX-Ratten entwickeln nach der Injektion des Kanzerogens EtNU am ersten Postnataltag maligne Schwannome, vor allem der Nn. trigemini, während BDIV-Ratten fast vollständig resistent sind (DRUCKREY et al., 1970; KINDLER-ROHRBORN et al., 1999). Ein histomorphologisch verändertes Erscheinungsbild der Nn. trigemini besteht frühestens ab dem Tag 70 nach der EtNU-Exposition. Prämale Zellen sind zunächst in den Nn. trigemini beider Rattenstämme nahe der Hirn-Nerv-Grenze vorhanden und verschwinden später nach und nach (bis zum Tag 180) aus den Nn. trigemini der resistenten BDIV-Ratten, während sich aus ihnen in den Nerven der suszeptiblen BDIX-Ratten schließlich vollständig maligne Tumoren bilden. Da der Entstehungsort der Tumoren genau bekannt ist und prämale Zellen anhand der Mutation im *Neu/ErbB-2*-Gen und ihrer Morphologie identifiziert werden können, ist es möglich, frühe und intermediäre Stadien der Kanzerogenese zu analysieren.

Als ein möglicher Effektormechanismus für die spätere Reversion der frühen histomorphologischen Veränderungen in den BDIV-Ratten wurde die Elimination prämaligener Zellen durch Immuneffektorzellen diskutiert (KINDLER-ROHRBORN et al., 2000).

Auf dieser These beruhende Untersuchungen ergaben, dass die aufeinander folgenden Schritte der Kanzerogenese in den Nn. trigemini EtNU-behandelter BDIV- und BDIX-Ratten von einer Invasion von Immuneffektorzellen begleitet werden: Schon am Tag 80 sind in den Nerven beider Rattenstämme CD4-exprimierende Zellen (Makrophagen und T-Helfer-Zellen), CD8-exprimierende zytotoxischen T-Lymphozyten und ED1-exprimierende Makrophagen in

signifikant erhöhter Zahl nachweisbar. Ein Unterschied zwischen den EtNU-behandelten Ratten beider Stämme betrifft allein die ED2-positiven Makrophagen, die nur in den BDIX-Ratten als Folge der EtNU-Exposition in erhöhter Zahl gefunden werden konnten (GERING et al., 2006).

In meiner Arbeit zeigte sich, dass CD4-positive Makrophagen zuerst (ab dem Postnataltag 40) in die Nerven einwandern. Die Invasion zytotoxischer T-Lymphozyten, T-Helferzellen und ED1-exprimierender Makrophagen setzt zwischen Tag 70 und 80 ein. Der gleiche Einwanderungszeitpunkt ergab sich für die ED2-positiven Makrophagen in den BDIX-Ratten. Die Reihenfolge der Invasion unterschiedlicher Immuneffektorzellen entspricht damit der regulären Abfolge der Immunantwort bei Infektionen, bei der das angeborene Immunsystem die Aktivierung des erworbenen Immunsystems bewirkt (DE VISSER and COUSSENS, 2005).

Das kurz aufeinander folgende Auftreten von prämaligen Zellen und Immuneffektorzellen in den Nerven EtNU-behandelter euthymischer BDIV- und BDIX-Ratten macht wahrscheinlich, dass die prämaligen Zellen selbst die Invasion der Zellen des Immunsystems initiieren. Zudem liegt die Vermutung nahe, dass die Immuneffektorzellen für die Elimination der prämaligen Zellen in der resistenten BDIV-Ratte verantwortlich sein könnten.

5.2 Die Auswirkungen der postnatalen Thymektomie auf die EtNU-induzierte Entstehung maligner Schwannome bei BDIV- und BDIX-Ratten

Um zu klären, ob T-Lymphozyten die Resistenz der BDIV-Ratten gegenüber der EtNU-induzierten Entstehung von Tumoren des peripheren Nervensystems vermitteln, wurde Ratten beider Stämme der Thymus am ersten Postnataltag nach der EtNU-Injektion operativ entfernt und so eine thymusabhängige Reifung der T-Lymphozyten verhindert. Durch die Sektion der verstorbenen Ratten wurde die Tumorinzidenz bestimmt.

Die Reduktion der T-Lymphozyten wurde durch eine Quantifizierung dieser Zellen im Blut und parallel dazu in den Nn. trigemini überprüft. Diese Kontrolle war unerlässlich, da in früheren Studien zum Einfluss der Thymektomie von

Ratten und Mäusen auf die Inzidenz verschiedener spontan entstandener und chemisch induzierter Tumoren (STUTMAN, 1975) die erfolgreiche Ausschaltung der T-Zell-Antwort nicht überprüft worden war und deshalb die Interpretation der erheblich variierenden Effekte problematisch war.

5.2.1 Komplikationen während der Thymektomie und postoperativen Phase

Zu Beginn der Versuche traten hohe Verluste der operierten Tiere auf. Vor allem während der Operation starben viele neonatale Ratten aufgrund diffuser Blutungen und einer zu tiefen oder zu langen Narkose. Durch die Vergrößerung der Inzision, das Einsetzen des Spreizers weiter kaudal und die Verkürzung der Unterkühlung kombiniert mit einer sofortigen und längeren Wärmebehandlung nach der Operation konnten diese Verluste stark reduziert werden. Jedoch kam es in einzelnen Fällen immer wieder zu diffusen Blutungen, die bei einigen Tieren zum Tod führten. Massive Verluste traten außerdem in einer späteren postoperativen Phase (1.-2. Lebenswoche) auf. Dabei blieb unklar, ob die Ratten von selbst starben und danach von den Muttertieren eliminiert wurden oder ob sie von den Muttertieren getötet wurden, da zum Beispiel fremde Gerüche sie irritierten. Eine Sedierung der Muttertiere mit Diazepam brachte keine Erhöhung der Überlebensrate. Auch das Ergebnis der durchgeführten Sham-Operationen, bei denen nur die Haut der Ratten inzidiert und wieder mit einer Naht und Gewebekleber verschlossen wurde, sprach dagegen, dass die Muttertiere die operierten Jungtiere töten, weil sie sich gestört fühlten: Alle Tiere überlebten.

Andere Sham-Operationen, bei denen der Thorax eröffnet, der Thymus aber nicht entfernt wurde, zeigten, dass das hierdurch verursachte Trauma zu Verlusten der Tiere auch in der postoperativen Phase führte.

Zur Klärung aller Ursachen waren die Versuche zu einseitig und die untersuchten Tierzahlen zu gering. Doch konnten durch sie Anhaltspunkte gewonnen werden, die eine Optimierung der Operation und des postoperativen Managements ermöglichten und schließlich zu einer Verminderung der Verluste führten.

Dass weniger BDIX-Ratten während und nach der Thymektomie starben, kann seine Ursache darin haben, dass diese Tiere erst zum Schluss der Versuchsreihe operiert wurden, als die Methode schon optimiert worden war. Doch auch eine stammspezifische erhöhte „Widerstandsfähigkeit“ der BDIX-Ratten wäre denkbar.

5.2.2 Die Notwendigkeit einer intakten T-Zell-Antwort für die Resistenz der BDIV-Ratte gegenüber der EtNU-induzierten Kanzerogenese im peripheren Nervensystem

Die Bildung von malignen Schwannomen als Folge der EtNU-Applikation am ersten Postnataltag wurde bei BDIV-Ratten in früheren Studien sehr selten beobachtet (DRUCKREY et al., 1970; KINDLER-ROHRBORN et al., 1999). Die Tumorrates lag schätzungsweise im Bereich $< 1\%$. Ein signifikant erhöhter Anteil der thymektomierten BDIV-Ratten (16,33%) entwickelte in dieser Studie maligne Schwannome.

Da keine der thymektomierten, nicht EtNU-behandelten BDIV-Ratten diese Tumoren entwickelte, konnte ausgeschlossen werden, dass die Thymektomie selbst ein tumorauslösendes Ereignis darstellt.

Das Ergebnis lässt den Schluss zu, dass eine funktionsfähige T-Zell-Antwort zu der fast vollständigen Tumoresistenz der BDIV-Ratten beiträgt. Damit wird die erstmals von Burnet und Thomas formulierte Theorie einer Verhinderung der Tumorentstehung durch das Immunsystem (BURNET, 1957; THOMAS, 1959) gestützt.

Die T-Zell-vermittelte Tumoresistenz scheint eine gewebe- und stammspezifische Eigenschaft zu sein. Schon früher war versucht worden, die Resistenz der Copenhagen-Ratten gegen chemisch induzierte Mammatumoren durch die Kreuzung mit athymischen Nacktratten aufzuheben. F₂-Ratten, die den Gen-Lokus für die Athymie besaßen, zeigten jedoch keine erhöhte Tumorrates. Die Autoren schlossen daraus, dass T-Lymphozyten für die Resistenz nicht verantwortlich sein können (KORKOLA et al., 1997).

In vielen anderen Tiermodellen konnte dagegen eine Abhängigkeit der Tumorempfindlichkeit von der Existenz oder Funktionsfähigkeit der

Lymphozyten beobachtet werden, so dass die Theorie von Burnet und Thomas bekräftigt werden konnte: Zum Beispiel entwickeln RAG-2^{-/-}-Mäuse, in denen sich keine T- und B-Lymphozyten entwickeln, nach der Applikation eines Kanzerogens vermehrt und schneller Tumoren verglichen mit den Wildtyp-Mäusen (SHANKARAN et al., 2001).

Ob die T-Lymphozyten in den resistenten BDIV-Ratten die prämaligen Zellen durch ihre zytotoxischen Fähigkeiten selbst beseitigen oder durch die Sekretion von Zytokinen andere Eliminationsvorgänge unterstützen, zum Beispiel durch die Interaktion mit Makrophagen (BONNOTTE et al., 2001; DE VISSER and COUSSENS, 2005), bleibt offen.

Eine Erhöhung der Tumorinzidenz konnte bei den thymektomierten BDIX-Ratten im Vergleich zu den euthymischen Kontrollratten nicht beobachtet werden. Jedoch erscheint eine statistisch signifikante Erhöhung der ohnehin hohen Tumorraten euthymischer EtNU-behandelter BDIX-Ratten von mehr als 85% (KINDLER-ROHRBORN et al., 1999) bei der kleinen Anzahl untersuchter thymektomierter BDIX-Ratten kaum erreichbar.

Es zeigte sich zudem kein Effekt auf den Median der Überlebenszeit durch die Thymektomie und auch die Kaplan-Meier-Kurven euthymischer und thymektomierter BDIX-Ratten erscheinen nahezu deckungsgleich. Dies weist darauf hin, dass die invadierenden T-Lymphozyten in den BDIX-Ratten nicht oder nur begrenzt mit dem Prozess der Kanzerogenese interferieren.

Der einzige wenn auch aufgrund der vergleichsweise kleinen untersuchten Tiergruppe schwer messbare Effekt durch die Thymektomie bestand darin, dass doppelt so viele thymektomierte Ratten gleichzeitig in beiden Nn. trigemini maligne Schwannome (35,29%) entwickelten, verglichen mit den euthymischen Kontrollratten (17,65%).

Mit einem Median von 203 Tagen sind die Überlebenszeiten der thymektomierten BDIX-Ratten deutlich kürzer als die der BDIV-Ratten (294 Tage). Zudem kann durch die Thymektomie keine Angleichung der Tumorinzidenzen beider Ratten-Stämme erreicht werden. Als Ursache für diese stammspezifischen Unterschiede wäre vorstellbar, dass die Beseitigung der prämaligen Zellen in den Nn. trigemini von BDIV-Ratten durch ein

Zusammenwirken von T-Lymphozyten mit nervengewebeintrinsischen Mechanismen oder anderen Immuneffektorzellen wie den ebenfalls in die Nerven einwandernden Makrophagen erfolgt. In den thymektomierten BDIV-Ratten, die keine malignen Schwannome entwickelt hatten, könnten dann die Effektivität der Makrophagen ohne oder mit stark reduzierter Hilfe der T-Lymphozyten und das Verhältnis prämaligener Zellen zu anwesenden Makrophagen entscheidend für die erfolgreiche Beseitigung der prämaligen Zellen sein.

Der Beobachtungszeitraum von 18 Monaten (550 Tagen) wurde aufgrund der Überlebenszeiten EtNU-exponierter BDIX-Ratten in früheren Versuchen festgelegt. Obwohl die thymektomierten BDIV-Ratten im Median längere Überlebenszeiten als die euthymischen BDIX-Ratten zeigten, lag auch die älteste BDIV-Ratte, die ein malignes Schwannom entwickelte, mit einer Überlebenszeit von 377 Tagen deutlich in diesem Beobachtungszeitraum.

Eine euthymische BDIV-Ratte entwickelte ein malignes Schwannom nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes (im Alter von 593 Tagen). Da die Entwicklung von malignen Schwannomen bei EtNU-behandelten BDIV-Ratten in früheren Studien sehr selten beobachtet wurde und die Überlebenszeit dieser Kontrollratte deutlich länger als die der thymektomierten BDIV-Ratten war, liegt die Vermutung nahe, dass ein anderer Mechanismus zur Entstehung beigetragen hat oder die Immuneffektorzellen - zum Beispiel durch eine zusätzliche Erkrankung - in ihrer Funktion beeinträchtigt wurden und so die prämaligen Zellen nicht beseitigen konnten.

5.2.3 Die unvollständige Elimination der T-Lymphozyten durch die postnatale Thymektomie

Durch die Thymektomie konnte keine vollständige Eliminierung der T-Lymphozyten erreicht werden. So war der Median des Anteils $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor-tragender Lymphozyten an der mononukleären Zellfraktion im Blut, der mittels Durchflusszytometrie gemessen worden war, bei 8 Wochen alten BDIV- und BDIX-Ratten mit 11,53% bzw. 26,66% zwar deutlich niedriger als der euthymischer Kontrollratten gleichen Alters (ca. 60%), keiner der einzelnen

Werte lag aber unter 5%. Ähnliche Mengen an T-Lymphozyten im Blut wurden in neonatal thymektomierten Lewis-Ratten gefunden (FIELDSTEEL et al., 1981). Mit zunehmendem Alter (16 und 32 Wochen) stiegen die Werte fast aller Ratten auf über 20% an.

Die Reifung der Lymphozyten im Thymus beginnt um den Zeitpunkt der Geburt. Anders als beim Menschen, bei dem der Thymus schon bei der Geburt vollständig entwickelt ist, besitzt der Ratten-Thymus erst einige Wochen nach der Geburt sein maximales Volumen. Zu diesem Zeitpunkt kann daher der größte Anteil der T-Lymphozyten reifen (HERRMANN, T., persönliche Mitteilung). Bis zur Entnahme des Thymus am ersten Postnataltag könnten wenige Lymphozyten den Thymus passiert haben und als reife T-Lymphozyten ins Blut gelangt sein. Eine klonale Expansion dieser wenigen Zellen würde dann zu einer Erhöhung der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Anteile im Blut mit zunehmendem Alter führen. Außerdem wäre denkbar, dass die im Blut thymektomierter Ratten detektierten $\alpha\beta$ T-Lymphozyten in extrathymalem Gewebe gereift sind, wie zum Beispiel der Leber oder dem Darmepithel (BLAIS et al., 2006; BUBANOVIC, 2003) oder in zusätzlichem Thymusgewebe, welches erst kürzlich als Ort der Reifung in der Maus entdeckt wurde (TERSZOWSKI et al., 2006).

Thymektomierte Ratten, deren Anteile von T-Lymphozyten zu allen gemessenen Zeitpunkten deutlich höher waren, wurden von der Studie ausgeschlossen. Bei diesen Ratten wurde davon ausgegangen, dass ein kleiner Anteil des Thymus bei der Operation zurückgelassen worden war.

Eine gesteigerte thymusabhängige Reifung vor der Thymus-Entnahme, schnellere Expansion oder extrathymale Reifung in den BDIX-Ratten könnten zudem die Differenz beider Stämme in der Menge der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Blut verursachen.

Das Verhältnis peripherer CD4- und CD8-positiver T-Lymphozyten variiert zwischen verschiedenen Rattenstämmen (DAMOISEAUX et al., 1999). Welches Verhältnis in euthymischen BDIV- und BDIX-Ratten vorliegt und ob die Reifung der Subpopulationen CD4-exprimierender T-Helfer-Zellen und CD8-exprimierender zytotoxischer T-Lymphozyten in gleichem Maß durch die Thymektomie unterbunden werden konnte, sollte durch die Quantifizierung

dieser Zellen im Blut einiger acht Wochen alter Ratten beider Stämme untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass mehr T-Helferzellen im Blut vorhanden sind als zytotoxische T-Zellen und dass das Verhältnis zu Gunsten der T-Helfer-Zellen in thymektomierten Ratten beider Stämme weiter verschoben wird. Da nur wenige Ratten untersucht wurden, kann dies aber lediglich einen Hinweis auf eine stärkere Unterbindung der Reifung von zytotoxischen T-Lymphozyten als von T-Helferzellen durch die Thymektomie geben.

Auch nach Ausschluss der BDIV-Ratten aus der Studie, deren $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Blut unzureichend reduziert worden waren, bestand eine breite Streuung der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Anteile (Abbildung 4–12). Tendenziell konnten dabei allen Ratten, die maligne Schwannomen entwickelten, niedrige $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Anteile im Blut zugeordnet werden. Dies lässt vermuten, dass die Bildung maligner Schwannome mit der Effizienz der Thymektomie korreliert. Aufgrund der niedrigen Tierzahl bleibt das Ergebnis jedoch statistisch unbewiesen. Eine radikalere Reduktion der T-Lymphozyten, zum Beispiel durch die zusätzliche Gabe eines Antikörpers, der die Elimination von T-Lymphozyten bewirkt, könnte somit möglicherweise zu einer Erhöhung der Tumorinzidenz oder Verkürzung der Latenzzeit bei den BDIV-Ratten führen.

5.2.4 Die Abwesenheit der T-Lymphozyten in den Nn. trigemini thymektomierter BD-Ratten

Der immunhistochemische Nachweis von T-Lymphozyten in den Nn. trigemini thymektomierter Ratten sollte klären, ob die nach der Thymektomie im Körper vorhandenen und im Blut detektierten T-Lymphozyten in die Nerven einwandern. T-Lymphozyten erhalten ihre irreversible Spezifität des T-Zell-Rezeptors bei ihrer Reifung im Thymus (BOMMARDT et al., 2004). Stammten die im Blut gefundenen T-Lymphozyten von wenigen vor der Thymektomie oder extrathymal gereiften T-Lymphozyten ab, deren T-Zell-Rezeptoren nicht gegen Antigene der prämaligen Schwannschen Zellen gerichtet sind, so wäre ihre Invasion in die Nerven unwahrscheinlich. Ähnliches wurde bei athymischen kongenen Mäusen beobachtet: Bei ihnen wurden funktionelle T-Lymphozyten

gefunden, deren Repertoire der T-Zell-Rezeptoren aber sehr eng begrenzt war (MALECKAR and SHERMAN, 1987).

Die drastische Senkung von $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor-exprimierenden Zellen und CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten in allen immunhistochemisch untersuchten Nn. trigemini thymektomierter BDIV-Ratten erscheint als eine funktionell effektive Reduktion dieser Zellen durch die Thymektomie.

Dies steht jedoch im Gegensatz dazu, dass im BDIV-Rattenstamm eine Abhängigkeit des Risikos zur Tumorentstehung vom Ausmaß der numerischen Reduktion der T-Lymphozyten im Blut beobachtet wurde. Da dieser Befund jedoch nur an wenigen Tieren (N=8) erhoben wurde, bleibt unklar, ob er repräsentativ ist. Möglicherweise ist aber auch die Anwesenheit einzelner T-Lymphozyten in den Nerven thymektomierter BDIV-Ratten noch ausreichend, um eine Wirkung bei der Beseitigung prämaligener Zellen zu haben, sofern diese nicht direkt zytotoxisch ist, sondern zum Beispiel in der Aktivierung anderer Immuneffektorzellen durch die Sekretion von Zytokinen besteht. Eine ähnliche Wirkungsweise wurde in einer Studie gezeigt, bei der Zellklone von Kolonkarzinomen in zuvor immunisierte BDIX-Ratten transplantiert wurden (BONNOTTE et al., 2001).

CD4-positive Zellen waren dagegen in den Nerven thymektomierter BDIV-Ratten nachweisbar. Ihre Größe und Morphologie deuteten auf CD4-positive Makrophagen hin. Darüber hinaus konnten keine $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor-positiven Zellen gefunden werden, so dass CD4-positive T-Helferzellen ausschieden und es sich somit um Makrophagen handeln musste.

Neben malignen Zellen ist in einigen Tumoren ein großer Anteil von Makrophagen vorhanden, der oft mehr als 50% der Gewebemasse ausmacht. Dabei handelt es sich nicht um bereits im Gewebe vorhandene Makrophagen, sondern um Monozyten, die erst durch die Tumorentstehung aus dem Blut in das Gewebe einwandern (MURDOCH et al., 2004).

Es gilt heute als unumstritten, dass Makrophagen neben ihren Fähigkeiten, den T-Lymphozyten tumorassoziierte Antigene zu präsentieren und Zytokine zur Stimulation anderer Immuneffektorzellen zu exprimieren und so zur Entfernung

der Tumorzellen durch andere Immuneffektorzellen beizutragen, auch in der Lage sind, die Tumorzellen selbst zu zerstören (BALKWILL et al., 2005).

So ist zum Beispiel bei der intraperitonealen Transplantation von Zellen verschiedener hoch aggressiver Tumoren in *BALB/c*-Mäuse mit einer spontan entstandenen, bisher unbekanntem Mutation beobachtet worden, dass Zellen des angeborenen Immunsystems Tumorresistenz vermitteln können: Wiesen die Mäuse eine Mutation in einem bisher unbekanntem Gen auf, entwickelten sie im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen keine Tumoren. Die dominant vererbte Tumorresistenz wurde durch eine massive Infiltration von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Natürlichen Killerzellen in das Abdomen vermittelt, die zu einer Zerstörung der malignen Zellen führten (CUI et al., 2003).

Die Tatsache, dass die meisten thymektomierten BDIV-Ratten keine malignen Schwannome entwickeln, deutet auf die Existenz eines komplementären Mechanismus zur Elimination prämaligener Zellen in den Nerven hin. Daran könnten sowohl nervengewebeintrinsische Mechanismen als auch die in den Nerven EtNU-behandelter Ratten in großer Zahl vorkommenden Makrophagen beteiligt sein. Denkbar wäre, dass ein optimales Zusammenwirken von T-Lymphozyten und Makrophagen die Wahrscheinlichkeit für eine effektive Beseitigung stark erhöht und somit für die vollständige Resistenz der euthymischen BDIV-Ratte verantwortlich ist, während in Abwesenheit der T-Lymphozyten prämaligene Zellen in einigen Fällen entkommen können und so zur Entstehung maligner Schwannome führen.

Folglich könnten weitere Versuche, bei denen die Makrophagen ausgeschaltet werden, klären, ob diese Zellen neben den T-Lymphozyten zur Resistenz der BDIV-Ratte gegenüber der EtNU-induzierten Kanzerogenese im peripheren Nervensystem beitragen.

Für die Existenz eines zweiten T-Zell-unabhängigen Mechanismus für die Elimination der prämaligen Zellen spricht auch der Befund der histologischen Untersuchung der Nn. trigemini thymektomierter EtNU-behandelter BDIV-Ratten, die älter als 238 Tage wurden und aufgrund anderer Erkrankungen (zum Beispiel Hirntumoren) getötet werden mussten oder starben: In 18 der 28

Nerven waren durch mikroskopische Untersuchungen keine prämaligen Zellen mehr zu detektieren und nur in 10 Nerven schienen einige Zellen morphologische Merkmale der Prämaliginität zu besitzen. Jedoch war in allen 28 Nerven die *Neu/ErbB-2*-Mutation nicht nachweisbar. Entsprechend der früheren Untersuchung von Nn. trigemini 180 bis 500 Tage alter euthymischer EtNU-behandelter BDIV-Ratten, in denen keine prämaligen Schwannschen Zellen mehr gefunden werden konnten (KINDLER-ROHRBORN et al., 2000), mussten die prämaligen Schwannschen Zellen in den thymektomierten BDIV-Ratten beseitigt worden sein.

5.2.5 Die Entwicklung maligner Schwannome ohne *Neu*-Mutation in thymektomierten BD-Ratten

Für EtNU-induzierte maligne Schwannome in euthymischen BD-Ratten ist die Mutation im *Neu/ErbB-2*-Gen beweisend (NIKITIN et al., 1991; PERANTONI et al., 1987). Sie stellt wahrscheinlich das initiale Ereignis für deren Entwicklung dar (NIKITIN et al., 1991).

Durch die Analyse mutierter Allele in malignen Schwannomen thymektomierter BD-Ratten sollte dieser Entstehungsmechanismus bestätigt werden.

Dabei zeigte sich, dass im Gegensatz zu malignen Schwannomen euthymischer BDIX-Ratten, in denen immer im *Neu/ErbB-2*-Gen mutierte Zellen dominieren, in den thymektomierten BDIV-Ratten 17% der Tumoren in den Nn. trigemini und 100% der Tumoren anderer Nerven bzw. in den thymektomierten BDIX-Ratten 12% der Tumoren in den Nn. trigemini und 18% der Tumoren anderer Nerven keine oder nur sehr wenige mutierte Zellen besaßen.

Die EtNU-Applikation am ersten Postnataltag führt durch Alkylierungsreaktionen mit der DNA zu zahlreichen Punktmutationen im Genom aller Körperzellen. Es ist davon auszugehen, dass im Nervengewebe, welches zum Zeitpunkt der EtNU-Applikation aufgrund der hohen Proliferationsrate besonders empfindlich ist (IVANKOVIC and DRUCKREY, 1968), verschiedene Mutationen entstehen, die die Entwicklung von malignen Schwannomen initiieren oder begünstigen könnten. Da bisher zumindest alle in den BDIX-Ratten entstandenen malignen

Schwannome im *Neu/ErbB-2*-Gen mutierte Zellen aufwiesen, erscheint es wahrscheinlich, dass die in einem anderen Gen mutierten Zellen in den euthymischen Ratten beider Stämme durch Immuneffektorzellen eliminiert werden können, während aus einigen von ihnen in Abwesenheit der T-Lymphozyten in den thymektomierten Ratten ein vollständig maligner Phänotyp entsteht.

5.3 Das BD-Ratten-Modell im Kontext der Erforschung immunologisch bedingter Tumoresistenzen

Schon in den 50er Jahren wurde im Hinblick auf die Entstehung maligner Tumoren eine überwachende Funktion des Immunsystems postuliert, wobei Immuneffektorzellen befähigt sein sollten, Tumorzellen im frühen Stadium der Kanzerogenese zu erkennen und zu eliminieren (BURNET, 1957; THOMAS, 1959). Durch einen solchen Mechanismus wäre die Verhinderung der Tumorentstehung durch spontan entartete Zellen denkbar und folglich könnte ein genetischer oder erworbener Defekt des Immunsystems die Entstehung solcher Tumoren fördern.

Erste Analysen zum Einfluss des Immunsystems erfolgten in den 60er und 70er Jahren an Mäusen: Durch die neonatale Thymektomie bzw. Gabe von Anti-Lymphozyten-Seren sollte eine Elimination der Lymphozyten künstlich herbeigeführt und die Auswirkung auf die Inzidenz von spontan entstandenen und chemisch induzierten Tumoren untersucht werden. Da hierdurch in vielen Fällen die Tumorzinzenz nicht beeinflusst werden konnte, wurde auf eine generelle Funktionslosigkeit der Lymphozyten, bezogen auf die Tumörprävention, geschlossen (DUNN et al., 2002; STUTMAN, 1975). Mit dem heutigen Wissensstand ist diese Folgerung jedoch fraglich, da die Effizienz der Ausschaltung von T-Lymphozyten nicht überprüft wurde und die gewählten Beobachtungszeiträume vergleichsweise kurz waren. In nachfolgenden Untersuchungen konnte an unterschiedlichen Knockout-Mäusen, zum Beispiel an C57BL/6-Mäusen mit einem Knockout im Interferon- γ - bzw. Perforin-Gen, gezeigt werden, dass die Rate spontan auftretender bzw. chemisch induzierter Tumoren erhöht war (STREET et al., 2002; VAN DEN BROEK et al., 1996).

Hierdurch konnte angenommen werden, dass ein präventiver Effekt des Immunsystems auf die Entstehung bestimmter Tumoren existiert. Es scheint sich dabei um einen heterogenen Prozess zu handeln, bei dem je nach Art des Tumors unterschiedliche Immuneffektorzellen beteiligt sein können (DUNN et al., 2002). Wie bereits früher vermutet, sind T-Lymphozyten hierfür von großer Bedeutung, wie auch mit Hilfe von Knockout-Mäusen, bei denen der $\alpha\beta$ - bzw. $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor ausgeschaltet war, gezeigt werden konnte: Bei diesen Mäusen stieg nach der Behandlung mit Methylcholanthren die Inzidenz von Fibrosarkomen und Spindellzellkarzinomen verglichen mit den Wildtyp-Mäusen (DUNN et al., 2002; GIRARDI et al., 2001).

Auch beim Menschen gibt es Hinweise auf die Existenz einer immuneffektorzellvermittelten Krebsprävention. Zum Beispiel entwickeln immunsupprimierte Patienten häufiger Tumoren (DUNN et al., 2002). Aufgrund der kurzen Überlebenszeit der Patienten ist die Aufklärung der beteiligten Schritte schwer realisierbar (DE VISSER and COUSSENS, 2005). Diese Tatsache macht die Arbeit mit Tiermodellen unumgänglich.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass T-Lymphozyten, die neben Makrophagen in die Nerven EtNU-behandelter BDIV- und BDIX-Ratten einwandern, wichtig für die fast vollständige Resistenz der BDIV-Ratten gegenüber der chemisch induzierten Kanzerogenese sind. Da davon ausgegangen werden muss, dass die T-Lymphozyten an dem Eliminationsvorgang der *Neu*-mutierten prämaligen Zellen, aus denen später maligne Schwannome entstehen, beteiligt sind, lässt sich somit die Hypothese der überwachenden Funktion des Immunsystems stützen.

Der immunhistochemische Nachweis von Makrophagen in den Nn. trigemini beider Stämme und die Tatsache, dass keine vollständige Aufhebung der Resistenz der BDIV-Ratte durch die Thymektomie erfolgte, machen zudem wahrscheinlich, dass neben den T-Lymphozyten auch die einwandernden Makrophagen in den Resistenzmechanismus involviert sind (siehe 5.2.4).

Obwohl in den Nerven der Ratten keine B-Lymphozyten gefunden werden konnten, ist deren Beteiligung am Prozess nicht ausgeschlossen. In Untersuchungen an prämaligem Hautgewebe wurde deutlich, dass

B-Lymphozyten wichtige Mediatoren in chronischen Entzündungsprozessen sind. Dabei müssen sie nicht selbst in die Region einwandern, denn die Invasion ihrer Antikörper ist für die erfolgreiche Bekämpfung der Tumorzellen ausreichend (DE VISSER and COUSSENS, 2005).

Der stammspezifische Unterschied der BDIV- und BDIX-Ratten in der Empfindlichkeit gegenüber der chemisch induzierten Entstehung von malignen Schwannomen könnte durch verschiedene Interaktionen zwischen prämaligen Zellen und Immuneffektorzellen hervorgerufen werden: Funktionelle Unterschiede der Immunzellen in beiden Stämmen könnten die Effektivität der Elimination beschränken. Diese Möglichkeit ist jedoch unwahrscheinlich, da Infektionserkrankungen in BDIX-Ratten nicht in höherer Frequenz auftreten als in BDIV-Ratten. Zudem zeigten BDIX- sowie BDIV-Ratten bei Transplantationsversuchen vollständige Abstoßungsreaktionen.

Wahrscheinlicher ist deshalb, dass die prämaligen Zellen in den BDIX-Ratten sich dem Eliminationsvorgang der Immuneffektorzellen entziehen können. Die massive genomische Instabilität von Tumorzellen, gepaart mit einer hohen Teilungsrate, bewirkt einen hohen Grad an genetischer Vielfalt der Tumorzellen. Durch eine natürliche Selektion könnten sich einzelne nicht vom Immunsystem der BDIX-Ratten zu eliminierende Tumorzellen entwickelt haben. Eine Möglichkeit hierfür wäre die Maskierung. Das Herunterregulieren und der Verlust von Oberflächenantigenen, wie Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-I-Molekülen oder tumorspezifischen Antigenen, sind in diesem Zusammenhang beschrieben worden. Auch ein Defekt in der zum Zelltod führenden Signalkaskade in den Tumorzellen könnte ein Entkommen bewirken (KHONG and RESTIFO, 2002).

Eine andere Möglichkeit des Entkommens bestände in der aktiven Suppression des Immunsystems (ZOU, 2005) durch die prämaligen Schwannschen Zellen. So wäre es denkbar, dass die prämaligen Schwannschen Zellen bestimmte Proteine sezernieren, welche die in die Nerven einwandernden T-Lymphozyten und Makrophagen beeinträchtigen. Proteine, die eine solche funktionelle Inaktivierung bewirken, sind zum Beispiel TGF β , dessen wachstumshemmende Wirkung auf T-Lymphozyten auch in Transplantationsversuchen von malignen

Schwannomen in BDIX-Ratten beobachtet wurde (ALTENSCHMIDT et al., 1997), oder Zytokine wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor oder Interleukin 10 mit ihren hemmenden Wirkungen auf dendritische Zellen (KHONG and RESTIFO, 2002; ZOU, 2005). Die von Igney beschriebene Initiation der Apoptose von T-Lymphozyten durch die Expression der Tumorzellen von FAS-Ligand (IGNEY et al., 2005) scheidet als Möglichkeit aus, da in den BDIX-Ratten bis zum Alter von 250 Tagen keine Reduktion der T-Lymphozyten beobachtet werden konnte.

Es ist heute bekannt, dass das Immunsystem aber auch für das Tumorstadium förderlich oder sogar essentiell sein kann. Die Entstehung von Kolon-Tumoren wird zum Beispiel durch das Mikromilieu des Gewebes chronischer Entzündungsreaktionen begünstigt, wobei NFkappaB die Unsterblichkeit der Zellen bewirkt (CLEVERS, 2004). Durch Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und verschiedener Proteinase (vor allem Matrix-Metallo-Proteinase) können Immuneffektorzellen zudem einen direkten fördernden Einfluss auf die Kanzerogenese nehmen (DE VISSER and COUSSENS, 2005). Tumorzellen sind dabei befähigt, bestimmte für sie förderliche Zellen in ihre Nähe zu locken und sie in ihrer Funktion noch anzutreiben oder zu modifizieren. Auch CD4-positive T-regulatorische Zellen spielen eine wichtige immunpathologische Rolle bei der Entstehung von Tumoren durch die Suppression der endogenen tumorassoziierten antigenspezifischen T-Zell-Immunität (ZOU, 2005).

Vor allem aber sogenannte tumorassoziierte Makrophagen können in Abhängigkeit eines bestimmten Mikromilieus des Tumorgewebes für die Suppression der adaptiven Immunantwort sorgen und durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren die Proliferation, die Invasion der Tumorzellen in umliegendes Gewebe sowie die Bildung von Metastasen fördern (MURDOCH et al., 2004; POLLARD, 2004).

Dies könnte eine Begründung sein, warum in den malignen Schwannomen der thymektomierten BDIV-Ratten immunhistologisch massenhaft CD4-exprimierende Makrophagen nachgewiesen werden konnten: Evtl. war das Gleichgewicht zwischen Makrophagen, die zytotoxische Funktion ausüben, zu

solchen, die durch den Einfluss der Tumorzellen gehemmt waren oder sogar wachstumsfördernde Funktionen übernommen haben, zu Gunsten der letzteren verschoben, so dass in Kombination mit der Abwesenheit der T-Lymphozyten ein Tumor entstehen konnte. Es wäre auch möglich, dass CD4-exprimierende Makrophagen in den BDIX-Ratten in jedem Fall fördernd auf die Bildung von malignen Schwannomen wirken. Zudem könnten ED2-positve Makrophagen, die nur in den Nn. trigemini EtNU-behandelter BDIX-Ratten in signifikant erhöhter Zahl vorkommen, durch die Tumor-Zellen zur Einwanderung und deren Unterstützung veranlasst worden sein.

Die Vielfältigkeit von Interaktionen zwischen Tumor- und Immuneffektorzellen, die einem Tumor zur Entstehung und Progression dienen, lässt die Vielzahl existierender Möglichkeiten erahnen und macht die Schwierigkeit einer spezifischen Therapie deutlich. Nur ein Therapieansatz, der mehrere Faktoren berücksichtigt, erscheint deshalb zweckmäßig. So wurden von Khong die gleichzeitige Aktivierung der Immunantwort, Elimination hemmender Faktoren durch den Tumor und Verhinderung der Entstehung eines immunresistenten Phänotyps vorgeschlagen. Aber auch bei einer solchen parallelen Therapie bestände die Gefahr, dass einige Tumorzellen standhalten können und durch diese Selektion von Zellen ein immunresistenter Phänotyp entsteht (KHONG and RESTIFO, 2002). Vielversprechender erscheint deshalb der Ansatz der Tumor-Prävention. Beständen bei Patienten prädisponierende Varianten bestimmter Gene, die zum Beispiel die Immunabwehr betreffen könnten, wäre eine medikamentöse Prävention vorstellbar, mit der dieser Defekt auf funktioneller Ebene ausgeglichen oder auf molekularer Ebene behoben würde. Dies erfordert die genaue Kenntnis aller in der Entstehung eines bestimmten Tumors relevanten Faktoren und Abläufe.

Durch die Renaissance, die die Tumorummunologie in den letzten Jahren erfahren hat, konnte das Wissen über beteiligte Vorgänge, Faktoren und genetische Prädispositionen, die über die Entstehung von Tumoren entscheiden, beachtlich erweitert werden. Diese Tatsache lässt auf einen raschen Fortschritt des Verständnisses und damit auf die Entwicklung von spezifischen Präventionsmaßnahmen in den nächsten Jahren hoffen.

6. Zusammenfassung

Tumorerkrankungen gehören in der Humanmedizin zu den häufigsten Todesursachen und gewinnen auch in der Tiermedizin aufgrund des Qualitätsfortschrittes medizinischer Versorgung und der zunehmenden Lebenserwartung der in Obhut des Menschen lebenden Tiere an Bedeutung.

Nur eine kleine Anzahl der Tumorerkrankungen entsteht auf der Basis eines genetischen Defektes mit einem dominanten Erbgang, der das Krebsrisiko drastisch erhöht. Das individuelle Risiko gegenüber sporadisch auftretenden Tumoren wird dagegen durch das Zusammenspiel genetischer und exogener Faktoren bestimmt. Eine Aufklärung der Effektormechanismen, die eine genetisch bedingte Tumoresistenz und -suszeptibilität vermitteln, wird wichtige Ansatzpunkte für die Tumoprävention, Frühdiagnose und Therapie bieten.

Die Induktion von malignen Tumoren des peripheren Nervensystems in Ratten der nahe verwandten Stämme BDIV und BDIX durch Applikation von N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (EtNU) am ersten Lebenstag (Postnataltag) ist ein geeignetes Modell zur Erforschung solcher Effektormechanismen. Während > 85% der BDIX-Ratten maligne Schwannome hauptsächlich im Nervus trigeminus (N. trigeminus) entwickeln, sind BDIV-Ratten nahezu vollständig resistent. Eine Punktmutation in der Transmembranregion des *Neu/ErbB-2*-Gens ist ein frühes, wahrscheinlich das initiale Ereignis der Tumorentwicklung. Im *Neu*-Gen mutierte Schwannsche Zellen stellen eine Hochrisikopopulation hinsichtlich der Progression zum voll ausgebildeten malignen Phänotyp dar.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass nach der EtNU-Applikation im *Neu*-Gen mutierte prä-maligne Zellen in den Nn. trigemini sowohl der tumorsuszeptiblen BDIX- als auch der tumorresistenten BDIV-Ratten vorhanden sind. Während diese Zellen aus den Nerven der BDIV-Ratten später eliminiert werden, entwickeln sich aus ihnen in BDIX-Ratten maligne Schwannome.

Zur Klärung der Frage, ob das Immunsystem an dem Eliminationsvorgang beteiligt ist, wurde die Anzahl von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten, CD4⁺ T-Helferzellen und Makrophagen sowie von ED1⁺ und ED2⁺ Makrophagen als Funktion der Zeit nach EtNU-Applikation in den Nn. trigemini von Ratten beider Stämme immunhistochemisch untersucht. Dabei wurden gegenüber den

unbehandelten Kontrollratten signifikant erhöhte Zahlen von CD4⁺ Makrophagen und T-Helferzellen ab Tag 40 sowie von CD8⁺ T-Lymphozyten und ED1⁺ Makrophagen ab Tag 80 in EtNU-behandelten Ratten beider Stämme gefunden. Es konnte jedoch kein deutlicher stammspezifischer Unterschied festgestellt werden, so dass unklar blieb, ob die Immuneffektorzellen an der Elimination der prämaligen Zellen beteiligt sind.

Durch die Thymektomie von BDIX- und BDIV-Ratten nach EtNU-Applikation am ersten Postnataltag sollte die Reifung der T-Lymphozyten unterbunden und so der Einfluss der T-Lymphozyten am Resistenzmechanismus der BDIV-Ratte geklärt werden. Die Effizienz der Thymektomie wurde durch Bestimmung der verbliebenen T-Lymphozyten im Blut dieser Ratten mittels Durchflusszytometrie überprüft. Durch immunhistochemische Untersuchungen der Nn. trigemini konnte gezeigt werden, dass residuale T-Lymphozyten nicht invadieren und daher im Hinblick auf die Kanzerogenese des peripheren Nervensystems vermutlich keine funktionelle Bedeutung haben.

Eine signifikante Anzahl (16%) thymektomierter BDIV-Ratten entwickelte nach einer medianen Überlebenszeit von 294 Tagen maligne Schwannome. Dies stellt einen drastischen Anstieg der Inzidenz bei BDIV-Ratten dar. Dagegen zeigte die Thymektomie keinen Einfluss auf die Tumorraten und die Überlebenszeit bei BDIX-Ratten. Dieser Effekt demonstriert die Notwendigkeit einer intakten T-Zell-Antwort für die fast vollständige Resistenz der BDIV-Ratte gegenüber der Entstehung maligner Schwannome nach EtNU-Applikation sowie die funktionelle Hemmung der T-Lymphozyten der BDIX-Ratten. Jedoch konnten in den meisten thymektomierten BDIV-Ratten, die keine Tumoren entwickelt hatten, keine prämaligen Zellen mehr nachgewiesen werden. T-Lymphozyten scheinen daher mit anderen Zellen des Immunsystems wie z. B. Makrophagen oder gewebeintrinsischen Mechanismen zu interagieren, so dass die genetische Tumoresistenz der BDIV-Ratten durch die Thymektomie nicht vollständig aufgehoben wird. Die unterschiedliche Tumorsuszeptibilität der beiden Stämme könnte sowohl durch funktionelle Unterschiede in der T-Zell-Antwort bedingt sein als auch auf verschiedenen Fähigkeiten der prämaligen Zellen beruhen, Immuneffektorzellen zu hemmen oder ihnen zu entkommen.

7. Summary

Cancer belongs to the most frequent causes of death in human medicine and also becomes more and more important in veterinary medicine.

A small number of tumors develop on the basis of tumor susceptibility syndromes, dominantly inherited genetic diseases increasing cancer risk drastically. In contrast, the individual risk towards sporadically occurring tumors varying from high susceptibility to complete resistance depends on the interaction of genetic with exogenic factors. A thorough analysis of effector mechanisms modulating tumor risk is a prerequisite for the prevention, early diagnosis and therapy of malignancies.

The induction of malignant tumors of the peripheral nervous system in rats of the closely related strains BDIV and BDIX induced by the application of N-Ethyl-N-Nitrosourea (EtNU) on postnatal day one constitutes a suitable model for exploring the biological basis of cancer susceptibility and resistance. While > 85% of the BDIX rats develop malignant schwannomas predominantly of the trigeminal nerves, BDIV rats are almost completely resistant. A transversion mutation in the transmembrane region of the *Neu/ErbB-2* gene is an early, likely the initial event in tumor development and diagnostic for malignant schwannomas. This mutated Schwann cells represent a high risk population for the progression to full blown malignant phenotypes.

Unexpectedly *Neu/ErbB-2* mutant cells were detected in trigeminal nerves of tumor-susceptible BDIX rats as well as in resistant BDIV rats as a consequence of EtNU treatment. While these cells can be eliminated from the nerves of BDIV rats, they give rise to malignant tumors in susceptible BDIX rats.

To find out whether the immune system is involved in the elimination process CD8⁺ cytotoxic T cells, CD4⁺ T helper cells and macrophages were quantified in trigeminal nerves of both rat strains as a function of time after EtNU exposure. Starting on day 40 significantly increased numbers of CD4⁺ macrophages and T helper cells were found in EtNU treated rats, while the amounts of CD8⁺ cytotoxic T cells and ED1⁺ macrophages surpassed the controls after day 80. As no gross differences were found in immune cell counts between cancer

susceptible and resistant rats, it remained unclear, whether the immune effector cells were involved in the elimination of premalignant cells.

Therefore the maturation of T cells was prevented by thymectomy of BDIX and BDIV rats after EtNU treatment on postnatal day one.

The efficiency of the procedure was monitored by determination of the residual T cells in the blood by flow cytometry. It was shown, that residual T cells could not invade trigeminal nerves and therefore do not appear to interfere with the development of cancer in the PNS.

A significant number (16%) of thymectomized BDIV rats developed malignant schwannomas after a median survival time of 295 days representing a strong increase of the tumor incidence of BDIV rats. In contrast thymectomy had no influence on the tumor rate and the survival time in BDIX rats.

This effect demonstrates that an intact T cell response is essential for the almost complete resistance of the BDIV rat towards the development of malignant schwannomas after EtNU treatment. In BDIX rats T cells appear to have no effect on tumor development.

However, most thymectomized BDIV rats did not develop cancer and *Neu* mutant cells were not detected in most of their nerves. It is therefore likely, that T cells either interact with other cells of the immune system, as for example macrophages, or with nerve-tissue intrinsic mechanisms so that the genetic tumor resistance of the BDIV rat cannot be completely abolished by the thymectomy.

The differential tumor susceptibility of both strains could be caused by functional differences of the T cell response as well as by different capabilities of premalignant cells to escape or counteract the cellular immune response.

8. Literaturübersicht

ALTENSCHMIDT, U., KAHL, R., KLUNDT, E., STOCKLIN, E., MIHATSCH, M., WEINDEL, K. and GRONER, B. (1997):

Schwannoma cells induce a tumor-cell-specific cytotoxic-T-cell response upon transplantation into syngeneic rats but escape elimination through the secretion of immunosuppressive factors.

Int J Cancer, **70**, 542-550.

BALKWILL, F., CHARLES, K. A. and MANTOVANI, A. (2005):

Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease.

Cancer Cell, **7**, 211-217.

BALMAIN, A., GRAY, J. and PONDER, B. (2003):

The genetics and genomics of cancer.

Nat Genet, **33 Suppl**, 238-244.

BALMAIN, A. and HARRIS, C. C. (2000):

Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes.

Carcinogenesis, **21**, 371-377.

BALMAIN, A. and NAGASE, H. (1998):

Cancer resistance genes in mice: models for the study of tumour modifiers.

Trends Genet, **14**, 139-144.

BARGMANN, C. I., HUNG, M. C. and WEINBERG, R. A. (1986):

Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185.

Cell, **45**, 649-657.

BISSELL, M. J. and RADISKY, D. (2001):

Putting tumours in context.

Nat Rev Cancer, **1**, 46-54.

BLAIS, M. E., LOUIS, I. and PERREAULT, C. (2006):

T-cell development: an extrathymic perspective.

Immunol Rev, **209**, 103-114.

BOMMHARDT, U., BEYER, M., HUNIG, T. and REICHARDT, H. M. (2004):

Molecular and cellular mechanisms of T cell development.

Cell Mol Life Sci, **61**, 263-280.

BONNOTTE, B., LARMONIER, N., FAVRE, N., FROMENTIN, A., MOUTET, M., MARTIN, M., GURBUXANI, S., SOLARY, E., CHAUFFERT, B. and MARTIN, F. (2001):

Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system.

J Immunol, **167**, 5077-5083.

BROWN, M. A. (1997):

Tumor suppressor genes and human cancer.

Adv Genet, **36**, 45-135.

BUBANOVIC, I. V. (2003):

Crossroads of extrathymic lymphocytes maturation pathways.

Med Hypotheses, **61**, 235-239.

BURNET, F. M. (1957):

Cancer - a biological approach.

Brit. Med. Journal, **1**, 841-847.

CAVENEY, W. K., DRYJA, T. P., PHILLIPS, R. A., BENEDICT, W. F., GODBOUT, R., GALLIE, B. L., MURPHREE, A. L., STRONG, L. C. and WHITE, R. L. (1983):

Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma.

Nature, **305**, 779-784.

CLEMENTE, C. G., MIHM, M. C., JR., BUFALINO, R., ZURRIDA, S., COLLINI, P. and CASCINELLI, N. (1996):

Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma.

Cancer, **77**, 1303-1310.

CLEVERS, H. (2004):

At the crossroads of inflammation and cancer.

Cell, **118**, 671-674.

CUI, Z., WILLINGHAM, M. C., HICKS, A. M., ALEXANDER-MILLER, M. A., HOWARD, T. D., HAWKINS, G. A., MILLER, M. S., WEIR, H. M., DU, W. and DELONG, C. J. (2003):

Spontaneous regression of advanced cancer: identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A, **100**, 6682-6687.

DAMOISEAUX, J. G., CAUTAIN, B., BERNARD, I., MAS, M., VAN BREDA VRIESMAN, P. J., DRUET, P., FOURNIE, G. and SAOUDI, A. (1999):

A dominant role for the thymus and MHC genes in determining the peripheral CD4/CD8 T cell ratio in the rat.

J Immunol, **163**, 2983-2989.

DE VISSER, K. E. and COUSSENS, L. M. (2005):
The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development.
Cancer Immunol Immunother, **54**, 1143-1152.

DRUCKREY, H. (1971):
Genotypes and phenotypes of ten inbred strains of BD-rats.
Arzneimittelforschung, **21**, 1274-1278.

DRUCKREY, H., SCHAGEN, B. and IVANKOVIC, S. (1970):
Erzeugung neurogener Malignome durch einmalige Gabe von Äthyl-nitrosoharnstoff (ÄNH) an neugeborene und junge BDIX-Ratten.
Z Krebsforsch, **74**, 141-161.

DUNN, G. P., BRUCE, A. T., IKEDA, H., OLD, L. J. and SCHREIBER, R. D. (2002):
Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.
Nat Immunol, **3**, 991-998.

FEARON, E. R. and VOGELSTEIN, B. (1990):
A genetic model for colorectal tumorigenesis.
Cell, **61**, 759-767.

FIELDSTEEL, A. H., SATO, N. and COLSTON, M. J. (1981):
Relationship between T-cell population in neonatally thymectomized Lewis rats and susceptibility to infection with mycobacterium leprae.
Int J Lepr Other Mycobact Dis, **49**, 317-323.

GATTI, R. A. and GOOD, R. A. (1971):
Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review.
Cancer, **28**, 89-98.

GERING, K. M., MARX, J. A., LENNARTZ, K., FISCHER, C., RAJEWSKY, M. F. and KINDLER-ROHRBORN, A. (2006):
The interaction mode of premalignant Schwann and immune effector cells during chemically induced carcinogenesis in the rat peripheral nervous system is strongly influenced by genetic background.
Cancer Res, **66**, 4708-4714.

GIRARDI, M., OPPENHEIM, D. E., STEELE, C. R., LEWIS, J. M., GLUSAC, E., FILLER, R., HOBBY, P., SUTTON, B., TIGELAAR, R. E. and HAYDAY, A. C. (2001):
Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells.
Science, **294**, 605-609.

HABER, D. A. and FEARON, E. R. (1998):
The promise of cancer genetics.
Lancet, **351 Suppl 2**, S11-8.

HANAHAN, D. and WEINBERG, R. A. (2000):
The hallmarks of cancer.
Cell, **100**, 57-70.

HSU, L. C., KENNAN, W. S., SHEPEL, L. A., JACOB, H. J., SZPIRER, C.,
SZPIRER, J., LANDER, E. S. and GOULD, M. N. (1994):
Genetic identification of Mcs-1, a rat mammary carcinoma suppressor gene.
Cancer Res, **54**, 2765-2770.

IGNEY, F. H., BEHRENS, C. K. and KRAMMER, P. H. (2005):
CD95L mediates tumor counterattack in vitro but induces neutrophil-
independent tumor rejection in vivo.
Int J Cancer, **113**, 78-87.

IVANKOVIC, S. and DRUCKREY, H. (1968):
Transplazentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems. I.
Äthylnitrosoharnstoff (ÄNH) an BDIX-Ratten.
Z Krebsforsch, **71**, 320-360.

JACOBY, R. F., HOHMAN, C., MARSHALL, D. J., FRICK, T. J., SCHLACK, S.,
BRODA, M., SMUTKO, J. and ELLIOTT, R. W. (1994):
Genetic analysis of colon cancer susceptibility in mice.
Genomics, **22**, 381-387.

KHONG, H. T. and RESTIFO, N. P. (2002):
Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape"
phenotypes.
Nat Immunol, **3**, 999-1005.

KINDLER-ROHRBORN, A., KIND, A. B., KOELSCH, B. U., FISCHER, C. and
RAJEWSKY, M. F. (2000):
Suppression of ethylnitrosourea-induced schwannoma development involves
elimination of neu/erbB-2 mutant premalignant cells in the resistant BDIV rat
strain.
Cancer Res, **60**, 4756-4760.

KINDLER-ROHRBORN, A., KOLSCH, B. U., FISCHER, C., HELD, S. and
RAJEWSKY, M. F. (1999):
Ethylnitrosourea-induced development of malignant schwannomas in the rat:
two distinct loci on chromosome of 10 involved in tumor susceptibility and
oncogenesis.
Cancer Res, **59**, 1109-1114.

KNUDSON, A. G., JR. (1971):
Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.
Proc Natl Acad Sci U S A, **68**, 820-823.

KORKOLA, J. E. and ARCHER, M. C. (1999):

Resistance to mammary tumorigenesis in Copenhagen rats is associated with the loss of preneoplastic lesions.

Carcinogenesis, **20**, 221-227.

KORKOLA, J. E., WOOD, G. A. and ARCHER, M. C. (1997):

Resistance to chemically-induced mammary tumors in Copenhagen X nude-derived F2 athymic rats: evidence that T-cell immunity is not involved in Copenhagen resistance.

Carcinogenesis, **18**, 53-57.

KRIEGER-HUBER, S. and FAUSSNER, M. (1985):

Nierenkarzinom und noduläre Dermatofibrose mit erblicher Disposition - eine neue Erkrankung beim Deutschen Schäferhund.

Kleintierpraxis, **30**, 235.

LINGAAS, F., COMSTOCK, K. E., KIRKNESS, E. F., SORENSEN, A., AARSKAUG, T., HITTE, C., NICKERSON, M. L., MOE, L., SCHMIDT, L. S., THOMAS, R., BREEN, M., GALIBERT, F., ZBAR, B. and OSTRANDER, E. A. (2003):

A mutation in the canine BHD gene is associated with hereditary multifocal renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German Shepherd dog.

Hum Mol Genet, **12**, 3043-3053.

MALECKAR, J. R. and SHERMAN, L. A. (1987):

The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice.

J Immunol, **138**, 3873-3876.

MOE, L. and LIUM, B. (1997):

Hereditary multifocal renal cystadenocarcinomas and nodular dermatofibrosis in 51 German shepherd dogs.

J Small Anim Pract, **38**, 498-505.

MONACO, S., GEHRMANN, J., RAIVICH, G. and KREUTZBERG, G. W. (1992):

MHC-positive, ramified macrophages in the normal and injured rat peripheral nervous system.

J Neurocytol, **21**, 623-634.

MURDOCH, C., GIANNOUDIS, A. and LEWIS, C. E. (2004):

Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues.

Blood, **104**, 2224-2234.

NAITO, Y., SAITO, K., SHIIBA, K., OHUCHI, A., SAIGENJI, K., NAGURA, H. and OHTANI, H. (1998):

CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer.

Cancer Res, **58**, 3491-3494.

NIKITIN, A., BALLERING, L. A., LYONS, J. and RAJEWSKY, M. F. (1991):

Early mutation of the neu (erbB-2) gene during ethylnitrosourea-induced oncogenesis in the rat Schwann cell lineage.

Proc Natl Acad Sci U S A, **88**, 9939-9943.

PENN, I. (1970):

Malignant Tumors in Organ Transplant Recipients.

Springer-Verlag, New York.

PERANTONI, A. O., RICE, J. M., REED, C. D., WATATANI, M. and WENK, M. L. (1987):

Activated neu oncogene sequences in primary tumors of the peripheral nervous system induced in rats by transplacental exposure to ethylnitrosourea.

Proc Natl Acad Sci U S A, **84**, 6317-6321.

POLLARD, J. W. (2004):

Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis.

Nat Rev Cancer, **4**, 71-78.

PONDER, B. A. (1990):

Inherited predisposition to cancer.

Trends Genet, **6**, 213-218.

RAJEWSKY, M. F., AUGENLICHT, L. H., BIESSMANN, H., GOTH, R., HÜLSER, D. F., LAERUM, O. D. and LOMAKINA, L. Y. (1977):

Nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea in the rat: molecular and cellular aspects.

Hiatt, H. H., Watson, J. D. and Winston, J. A., Oingions of Human Cancer, Cold Spring Habor Press, Cold Spring Habor, 709 - 726.

ROSIN, A., MOORE, P. and DUBIELZIG, R. (1986):

Malignant histiocytosis in Bernese mountain dogs.

J. A. V. M. A., **188**, 1041.

SHANKARAN, V., IKEDA, H., BRUCE, A. T., WHITE, J. M., SWANSON, P. E., OLD, L. J. and SCHREIBER, R. D. (2001):

IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity.

Nature, **410**, 1107-1111.

SHEPEL, L. A., LAN, H., HAAG, J. D., BRASIC, G. M., GHEEN, M. E., SIMON, J. S., HOFF, P., NEWTON, M. A. and GOULD, M. N. (1998):
Genetic identification of multiple loci that control breast cancer susceptibility in the rat.

Genetics, **149**, 289-299.

STREET, S. E., TRAPANI, J. A., MACGREGOR, D. and SMYTH, M. J. (2002):
Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma.

J Exp Med, **196**, 129-134.

STÜNZI, H. and WEISS, E. (1990):

Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin.

Parey, Berlin und Hamburg.

STUTMAN, O. (1975):

Immunodepression and malignancy.

Adv Cancer Res, **22**, 261-422.

SUTTER, N. B. and OSTRANDER, E. A. (2004):

Dog star rising: the canine genetic system.

Nat Rev Genet, **5**, 900-910.

TERSZOWSKI, G., MULLER, S. M., BLEUL, C. C., BLUM, C., SCHIRMBECK, R., REIMANN, J., PASQUIER, L. D., AMAGAI, T., BOEHM, T. and RODEWALD, H. R. (2006):

Evidence for a functional second thymus in mice.

Science, **312**, 284-287.

THOMAS, L. (1959):

Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitiy States.

Hoebner-Harper, New York.

VAN DEN BROEK, M. E., KAGI, D., OSSENDORP, F., TOES, R., VAMVAKAS, S., LUTZ, W. K., MELIEF, C. J., ZINKERNAGEL, R. M. and HENGARTNER, H. (1996):

Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice.

J Exp Med, **184**, 1781-1790.

WALSH, T. and KING, M. C. (2007):

Ten genes for inherited breast cancer.

Cancer Cell, **11**, 103-105.

WAYNFORTH, H. B. A. F., P. A. (2001):

Experimental and surgical technique in the rat

Academic Press, London.

WOOD, G. A., KORKOLA, J. E., LEE, V. M., SARMA, D. S. and ARCHER, M. C. (1997):

Resistance of Copenhagen rats to chemical induction of glutathione S-transferase 7-7-positive liver foci.
Carcinogenesis, **18**, 1745-1750.

ZIPPELIUS, A., BATARD, P., RUBIO-GODOY, V., BIOLEY, G., LIENARD, D., LEJEUNE, F., RIMOLDI, D., GUILLAUME, P., MEIDENBAUER, N., MACKENSEN, A., RUFER, N., LUBENOW, N., SPEISER, D., CEROTTINI, J. C., ROMERO, P. and PITTET, M. J. (2004):

Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance.
Cancer Res, **64**, 2865-2873.

ZOU, W. (2005):

Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance.
Nat Rev Cancer, **5**, 263-274.

9. Anhang

9.1 Bezugsquellen für Antikörper

9.1.1 Antikörper Immunhistochemie

9.1.1.1 Primär-Antikörper

Name	Klon	Produkt-Nummer	Firma	Verdünnung
Monoclonal Mouse anti- Vimentin	V9	M 0725	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	1:50
Mouse Anti Rat CD161	10/78	MCA1427	Serotec, Oxford	1:100
Mouse anti rat CD163	ED2	MCA342R	Serotec, Oxford	1:600
Mouse anti rat CD4	W3/25	MCA55XZ	Serotec, Oxford	
Mouse anti rat CD68	ED1	MCA341R	Serotec, Oxford	1:250
Mouse anti rat CD8 antibody	MRC OX-8	MCA48R	Serotec, Oxford	1:100
Mouse anti rat TCR alpha/beta	R73	MCA453G	Serotec, Oxford	1:100
Polyclonal Rabbit Anti- S100		Z 0311	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	1:400
Purified Mouse anti rat CD18 monoclonal antibody	WT.3	554977	BDPharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA	1:100

9.1.1.2 Sekundär-Antikörper

Name	Produkt-Nummer	Firma	Verdünnung
Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab') Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	111-066-144	Jackson Immuno Research über Dianova, Hamburg	1:500
Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Rat Anti-Mouse IgG (H+L)	415-066-166	Jackson Immuno Research über Dianova, Hamburg	1:500

9.1.2 Antikörper FACS

Antigen	Klon	Produkt-Nummer	Firma	Verdünnung
Biotin-Conjugated Mouse Anti-Rat CD8b Monoclonal Antibody	341	550970	BDPharmingen, NJ, Franklin Lakes, USA	1,1 µg/ 1 Million Zellen
Fluorescein Isothiocyanate-Conjugated Mouse Anti-Rat CD4 Monoclonal Antibody	OX-38	554843	BDPharmingen, NJ, Franklin Lakes, USA	0,7 µg/ 1 Million Zellen
R-Phycoerythrin-Conjugated Mouse Anti-Rat αβ T-Cell Receptor Monoclonal Antibody	R73	554914	BDPharmingen, NJ, Franklin Lakes, USA	0,7 µg/ 1 Million Zellen

9.2 Bezugsquellen für Reagenzien und Chemikalien

Name	Produkt-Nummer	Firma
10xTaq-Puffer	Enthalten in Taq DNA Polymerase, M0267L	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
2-Propanol	KMF. 08-539	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
ABComplex/HRP	K 0355	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Agarose NEEO Ultra Roti@gerose	2267.4	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	161-0700	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Ampuwa-Wasser	40676.00.00	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Azeton	1.00014.2511	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid-Acrylamid (19:1)	10679	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Borsäure	5935.2	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum-Albumin	A 4503-100G	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau, reinst	15375	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Cerestain® Eosin	1.15935	Merck, Darmstadt
Citronensäure (C ₆ H ₈ O ₇ ·1H ₂ O)	244	Merck, Darmstadt
Corbit-Balsam		Hecht, Kiel-Hassee
DAKO-Pen	S 2002	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Di-Natrium-hydrogen-Phosphat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	6580.0400	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix 2mM	R0249	Fermentas, Burlington, ON, Kanada
EDTA	E-5134	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Eisenalaun (Amoniumeisen(III)-Sulfat-Dodecahydrat)	1.03776.0500	Merck, Darmstadt
Essigsäure 96%	1.00062.2511	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	1.00983.2511	Merck, Darmstadt
Ethanol, vergällt	UN 1170	Werner Hoffmann GmbH & Co, Düsseldorf
Ethidiumbromid-Lösung 1%	21251	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
EtNU	N3385	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Ficoll-Paque Plus	17-1440-03	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
Flüssigstickstoff		Hauseigene Versorgung über das UKB
Foetal Bovine Serum	10270-106	Life Technologies (Gibco BRL), Gaithersburg, MD, USA
Formaldehyd, 37%	103999.1000	Merck, Darmstadt
Formamid	S4117	Oncor, Gaithersburg, MD, USA
Goldchlorid	G 4022	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA

Name	Produkt-Nummer	Firma
Isofluran Curamed	30372.00.00	Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe
Kaliumpermanganat	1.05082.0250	Merck, Darmstadt
Kernechtrot	2 E 012	Waldeck, GmbH und Co KG, Münster
Kohlendioxid		Hauseigene Versorgung über das UKB
Lachgas Stickoxydul	2349.99.99	Messer Gießheim GmbH, Frankfurt/Main
Längenstandard, 100bp DNA Leiter Generuler®	SM 0241	Fermentas, Burlington, ON, Kanada
Mayer's Hämalaulösung	1. 09249.500	Merck, Darmstadt
Methanol	1.06006.2511	Merck, Darmstadt
Mineralöl	M-5904	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Mouse IgG	I 8765	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
NaOH	1.06482.1000	Merck, Darmstadt
Natriumacid	6688.0100.226	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	1.06392.5000	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	A 1883,1000	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Oxalsäure	1.00495.0500	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	P-6148	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
PBS-Trockensubstanz ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (Dulbecco)	L182-10	Biochrom AG, Berlin
Primer <i>Neu-mut-F</i> ¹ und <i>Neu-mut-R</i> ²		Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Propriidiumiodid solution	P 4864	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Restriktionsenzym Restriction endonuclease Mnl1, 300U/µl	ER1071	Fermentas, Burlington, ON, Kanada
R-Phycoerythrin-Conjugated Mouse IgG1,κ Isotype Control Immunglobulin	554680	BDPharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA
Salpetersäure 65%	1.00456.2500	Merck, Darmstadt
Sauerstoff	2409.99.99	Air Liquide Deutschland GmbH, Krefeld
SIGMA FAST DAB Peroxidase Substrate Tablet Set	D4168	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Silbernitrat	7908.2	Roth, Karlsruhe
Streptavidin-A647	S32357	BDPharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA
Taq-Polymerase 5U/µl	M0267L	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
TEMED	161-0801	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Thymolkristall	8167.0100	Merck, Darmstadt
Tissue-Tek® O.C.T.TM Compound	4583	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande
Tris Base	1.08382.2500	Merck, Darmstadt

¹ Sequenz: 5' GCCAGCCCGGTGACATTCATCATTG 3'

² Sequenz: 5' GCAGCCTACGCATCGTATACTTCCG 3'

Name	Produkt-Nummer	Firma
Trockeneis		Hauseigene Produktion des Uniklinikums Essen
Wasserstoffperoxid 30%	1.07209.0250	Merck, Darmstadt
Xylene Cyanol FF (XCFF)	38505	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Xylol, reinst	KMF. 30-060.9025	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar

9.3 Bezugsquellen für Verbrauchsmaterialien

9.3.1 Verbrauchsmaterialien Thymektomie

Beschreibung	Produkt-Nummer	Firma
Cutasept®F	3917265	Bode Chemie, Hamburg
Einmal-Skalpell, Feather, Klinge 15	200130015	Produkte für Medizin AG, Köln
Ethicon® PDS® II, 6/0, monofil, resorbierbar, Nadel BV-1	Z1702	Johnson-Johnson, New Brunswick, NJ, USA
Foliodrape®	252302	Hartmann, Heidenheim
Gewebekleber Histoacryl®	9381104	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Infusomat®-Leitung, Standard	870036	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
OP-Handschuhe Micro-Touch® PF2		Ansell, Surrey, UK
Trachea-Sekretprobenset	4306589	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Untergrundfolie Variables Lochtuch	0554575	Raguse Gesellschaft für medizinische Produkte GmbH, Ascheberg-Herbern
Vasofix® Braunüle®, Luer Lock, 20G 1¼	4268113B	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Zellstofftupfer Nobazelltupf®	208405	NobaVerbandsmittel Danz GmbH, Wetter

9.3.2 Verbrauchsmaterialien Blutentnahme, Gewebeschnittherstellung, Histologische Färbungen, Immunhistochemie, FACS, PCR, Gelelektrophorese

Beschreibung	Produkt-Nummer	Firma
Alufolie	1-6612	neoLab, Heidelberg
Blutröhrchen BD Vacutainer Plasma Lithium-Heparin 6ml	368886	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Deckgläser	BB 024040A1	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Falcon Polystyren-Röhrchen 12x75 mm	352235	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Falcon Polystyren-Röhrchen, 15 ml	2095	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Filter-Folie 40 Mikron Nylon-Netz		Erhalten über Flow Cytometry Core Facility, Bonn
Greiner Polystyren-Röhrchen 5 ml	115101	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich

Beschreibung	Produkt-Nummer	Firma
Greiner Polypropylen-Röhrchen Cellstar®	188271	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Kryoröhrchen Cryovial® mit Außengewinde	T309-2	Simport Plastics, Beloell, Qc, Kanada
Metallkanülen Terumo® 21G und 27G	NN-21381R35 bzw. NN-2719R35	Terumo Deutschland, Eschborn
Mikropipetten Delbrück Na-Hep 20 µl	BRA 708660	Brand GmbH und Co KG, Wertheim
Objektträger, geschnitten mit Mattrand	11102	Engelbrecht, Edermünde
PCR-Tubes, 0,5 ml	710913, 710905	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen Gilson Tupac yellow (200 µl) und blue (1000 µl)	G 23810, G 23818 A	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen Safeguard 10 µl, 200 µl, 1000 µl	81-1011, 81-1040, 81-1050	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Reagiergefäße 1,5 ml Polypropylen	72.690	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	0030 120.086, 0030 120.094	Eppendorf, Hamburg
SuperFrost-Objektträger, Menzel-Gläser®	J 1800AMNZ	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Whatman-Papier Chromatography Paper 3 Chr	3003-911	Whatman plc, Brentford, UK

9.4 Bezugsquellen für Bestecke und Geräte

9.4.1 Operationsbesteck

Beschreibung	Produkt-Nummer	Firma
Anatomische Pinzette	BD027R	Aesculap, Tuttlingen
Chirurgische Pinzette	BD552R	Aesculap, Tuttlingen
Durogrip Nadelhalter nach Castroviejo	BM002R	Aesculap, Tuttlingen
Irisschere und Fadenschere, gerade spitz/spitz	BC110R	Aesculap, Tuttlingen
Pinzette, spitz, gebogen	1021	Bochem Laborbedarf, Weilburg
Wundspreizer nach Alm, stumpf	BV010R	Aesculap, Tuttlingen
M-Federschere nach Jacobson, gebogen	F0024R	Aesculap, Tuttlingen
Mikro-Pinzette, Uhrmachertyp	BD343R	Aesculap, Tuttlingen

9.4.2 Geräte Operation und Sektion

Beschreibung	Produkt-Nummer	Firma
Heizkissen	HK 11	Alaska
Heizkissen	TM 222	Beurer, Ulm
Humidity/ Temperature Meter	HAT-3004	Lutron, Coopersburg, PA, USA
Kaltlicht-Lampe	KI 150B	Schott, Mainz
Plexiglas-Narkosekammern		Werkstatt des Uniklinikums Essen
Pumpe Air Compressor	Type 604	DeVilbiss Company, Jackson, Tennessee, USA

Beschreibung	Produkt-Nummer	Firma
Rotlichtlampe Infraphil	HP 1540	Philips
Stereo-Operationsmikroskop OpMi-1	8575 8	Zeiss, Oberkochen
Waage	822-61	Kern, Ballingen-Frommern

9.4.3 Geräte Blutentnahme, Gewebeschnittherstellung, Histologische Färbungen, Immunhistochemie, FACS, PCR, Gelelektrophorese

Name	Produkt-Nummer	Firma
ACAS ICH-Systems (Leitz Orthoplan Mikroskop mit 20er Plan-Objektiv, CCD Kamera (JVC TK 870), elektrisch bedienbaren Objektträgertisch)		Dr. Olaf Ahrens, Labor für Messtechnische Beratung und Entwicklung, Bargterheide
Agarosegel Gießrahmen	S2 Casting Boot	Life Technologies (Gibco BRL), Gaithersburg, MD, USA
Analysewaage	LC820-OCE	Sartorius, Göttingen
Binokular	HBO 50/AC Axiovert25	Zeiss, Oberkochen
Digital-Kamera	1G 8339976	Olympus, Japan
FACS-Calibur™ Flow Cytometer – 4 Color	343202	Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Gelelektrophorese-Kammer (Sequenzierung, Gelelectrophoresis Apparat)	Model S2	Life Technologies (Gibco BRL), Gaithersburg, MD, USA
Gelkammern		Biometra Medizinische Analytik GmbH, Göttingen
Geltrockner Drygel Sr.	SE 1160	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
Haifischzahnkämme 67 well Mylar	49-21-123	Labtech International GmbH, Burkhardttdorf
Heizrührer IKA-Combimag	Typ RCT	Janke & Kunkel KG, Staufen i. Breisgau
Inhalationsnarkosegerät	Sulla 19	Drägerwerk AG, Lübeck
Kryostat Microm	Typ HM 560	Microm GmbH, Walldorf
Mikroskop	BX51TF	Olympus, Japan
Mikroskop mit Netzmikrometer	Axiophot, Netzmikrometer 474068-0000-000	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle	NN 3256	Panasonic
Mischgerät	Typ Reax	Heidolph Elektro, Kehlheim
Neubauer-Zählkammer		Brand GmbH und Co KG, Wertheim
pH-Meter	CG 840	Schott Instruments GmbH, Mainz
Pipette Eppendorf 0,1-10µl	Reference®(Variabel)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Gilson2-200µl/100-1000µl	Pipetman®P	Gilson, Middleton, WI, USA
Präzisionswaage	AC120S	Sartorius, Göttingen
Spannungsgerät Electrophoresis Powersupply	PH-st 500	Biotec Fischer GmbH, Reiskirchen
Thermocycler Biometra®	Tpersonal 20	Biometra Medizinische Analytik GmbH, Göttingen

Name	Produkt-Nummer	Firma
Ultrapure Water System Elix®5 und Milli-Q Biocel	ZLX S5005Y, ZMQS 50F01	Millipore, Billerica, MA USA
UV- Transilluminator	GelDoc 1000	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Zentrifuge	Megafuge 3.0RS	Heraeus Instruments, Osterode

9.5 EDV-Programme

Name	Firma
ACAS ICH 1 und 2	Dr. Olaf Ahrens, Labor für messtechnische Beratung und Entwicklung, Bargterheide
CellQuest™ Pro Version 3	Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FloJo Version 6.2	TreeStar Corporation, Ashland, OR, USA

9.6 Lösungen und Puffer

9.6.1 Mc Ilvain-Puffer (Citronensäure-Phosphat, pH 6,0)

Reagenz	Menge
0,1 M C ₆ H ₈ O ₇ ·1H ₂ O	368 ml
0,2 M Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	632 ml in Teilen hinzu, bis pH auf 6,0 eingestellt ist

9.6.2 10-fach-Ladepuffer für Silber- und Agarosegele

Reagenz	Menge
EDTA 0,5 M	0,5 ml
XCFF (Xylene Cyanol FF)	6 mg
Bromphenolblau	6 mg
In Formamid lösen	24,5 ml

9.6.3 FACS-Puffer

Reagenz	Menge
PBS-Puffer	100 ml
Natriumazid	100 µl
Bovines Serum Albumin	1g

9.6.4 50-fach TAE-Puffer (pH 8,4)

Reagenz	Menge
Tris Base	542 g
Essigsäure	57,1 ml
0,5 M EDTA	100 ml
A. bidest	ad 1000 ml
auf pH 8,4 titrieren	

9.6.5 5-fach TBE-Puffer (pH 8,4)

Reagenz	Menge
Tris Base	270 g
Borsäure	137,5 g
EDTA	18,6 g
A. bidest	ad 5000 ml
auf pH 8,4 titrieren	

9.6.6 Paraformaldehyd-Lösung 4%

Reagenz	Menge	Schritt
HO(CH ₂ O) _n H	30 g	Lösen
A. bidest	200 ml	
1 M NaOH	tropfenweise	hinzugeben, bis pH 8,3-8,5 und auf 60°C erhitzen, bis Lösung klar erscheint
Doppelt PBS	200 ml	Hinzugeben
Einfach PBS	320 ml	Hinzugeben

9.6.7 dNTP-Lösung 40 mM

Reagenz	Menge
dATP (100 mM)	40 µl
dTTP (100 mM)	40 µl
dGTP (100mM)	40 µl
dCTP (100mM)	40 µl
Ampuwa-Wasser	240 µl

9.6.8 Eosin-Lösung 1%

Reagenz	Menge
Eosin	10 ml
Thymolkristall	1 g
A. bidest	ad 1000 ml

9.7 Verzeichnis der Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A. bidest	Zweifach destilliertes entmineralisiertes Wasser
AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BD	Berlin-Druckrey
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
DAB	3,3-Diaminobenzidine
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat
dest.	Destilliert
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtNU	N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer (Fluorescence activated Cell Sorter)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
Ln./Lnn.	Lymphonodus/Lymphonodi
LOH	Loss of heterozygosity
M	Molar
M./Mm.	Musculus/Musculi
Mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major histocompatibility complex)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
Mn1	Moraxella nonliquidfaceins 1
N. trigeminus / Nn. trigemini	Nervus trigeminus / Nervi trigemini
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
SPF	Spezifisch pathogenfrei
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U	Einheiten (Units)
U/min.	Umdrehungen/Minute
ZNS	Zentrales Nervensystem

9.8 Publikationen

9.8.1 Paper

GERING, K. M., MARX, J. A., LENNARTZ, K., FISCHER, C., RAJEWSKY, M. F. and KINDLER-ROHRBORN, A. (2006):

The interaction mode of premalignant Schwann and immune effector cells during chemically induced carcinogenesis in the rat peripheral nervous system is strongly influenced by genetic background.

Cancer Res, **66**, 4708-4714.

MARX, J. A. M., ROHRBORN, A. J., KOELSCH, B. U., FISCHER, C., HERRMANN, T., PIETSCH, T., RAJEWSKY, M. F. and KINDLER-ROHRBORN, A. (2007 zur Veröffentlichung eingereicht):

Ablation of T cell immunity modulates rat strain-specific risk of developing chemically induced malignant nerve sheath tumors.

9.8.2 Abstract

MARX, J. A.-M., ROHRBORN, A. J. and KINDLER-ROHRBORN, A (2005):

Thymectomy abrogates resistance to ethylnitrosourea-induced carcinogenesis in the peripheral nervous system in BDIV rats.

Proc. Am. Assoc. Cancer Res. **46**, 920-921.

Kongressbeitrag beim "96th Annual Meeting", AACR, Anaheim, USA, 2005.

MARX, J. A.-M., ROHRBORN, A. J. and KINDLER-ROHRBORN, A (2005):

T cell depletion by thymectomy abrogates resistance to ethylnitrosourea-induced carcinogenesis in the peripheral nervous system in BDIV rats.

"Abstract of papers"

Kongressbeitrag beim "2005 Meeting on Rat Genomics and Models",

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, 2005.

9.9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Kindler-Röhrborn für die herzliche und umfangreiche Betreuung und das Wecken der Begeisterung für die Tumorforschung.

Herrn Prof. Dr. Burkhardt möchte ich für das Interesse an meiner Doktorarbeit und deren Betreuung und Begutachtung danken.

Für die Förderung meiner Arbeit durch das Graduiertenkolleg „Pathogenese von Krankheiten des Nervensystems“ der Universität Bonn, der DFG, der Mildred-Scheel-Stiftung für Krebsforschung und dem BONFOR-Programm der Universität Bonn möchte ich meinen Dank aussprechen. Dieser gilt besonders dem Sprecher des Graduiertenkollegs Prof. Dr. Propping für die Bemühungen um eine Förderung und Auslauffinanzierung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Kölsch für die Einarbeitung in einige Methoden und die Diskussionen fachlicher Fragestellungen, bei Frau Dr. Fischer für die statistische Auswertung meiner Ergebnisse, bei Herrn Haberland und Herrn Oepf für die freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit in der Tierversuchsanlage in Essen, bei Herrn Dr. Röhrborn für die Hilfe bei der Etablierung der Thymektomie, bei Herrn Prof. Dr. Herrmann für die Beratung und Anregungen im Gebiet der Immunologie und bei Herrn Dr. Endl und seinem Team der „Core Facility“ des Institutes für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie der Universität Bonn für die Einarbeitung in die Durchflusszytometrie und Bereitstellung der entsprechenden Geräte.

Zusätzlich möchte ich allen Personen aus dem Institut für Neuropathologie in Bonn, die an der Entstehung meiner Arbeit mitgewirkt haben, meinen Dank aussprechen.

Meiner Schwester Ruth möchte ich für die Durchsicht meiner Arbeit und meinen Eltern für ihre Unterstützung danken.

Und nicht zuletzt: Vielen Dank Alec für deine Geduld!

9.10 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Bei der Planung der Experimente, Einarbeitung in Methoden und der Auswertung der Ergebnisse habe ich von folgenden Personen Unterstützung erhalten:

Frau Priv.-Doz. Dr. A. Kindler-Röhrborn

Herrn Dr. rer. nat. B. Kölsch

Herrn Dr. med. A. Röhrborn

Frau Dr. sc. hum. C. Fischer

Judith Anna-Maria Marx

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5269-2



9 783835 195269 0