

Technische Universität München
Fakultät für Medizin

Die physiologische Rolle der Aldehyddehydrogenase 1 in Schwann-
Zellen und ihr Beitrag zur neoplastischen Transformation benigner
Schwannzell-Tumore

Michael Griessmair

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung eines Doktors der Medizin (Dr.med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Lars Maegdefessel

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Jürgen Schlegel
2. Priv.- Doz. Dr. Friederike Schmidt-Graf

Die Dissertation wurde am 09.01.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 16.05.2023 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
PUBLIKATION	5
1. EINLEITUNG	6
1.1. PROBLEMSTELLUNG	6
1.2. SCHWANN-ZELLEN	7
1.3. SCHWANNOME	9
1.4. ALDEHYDDEHYDROGENASE 1 FAMILIE	10
1.6. REZEPTORTYROSINKINASEN ERBB REZEPTORFAMILIE	13
1.6.1. <i>Der MAPK-Signalweg</i>	14
1.6.2. <i>Der PI3K-Signalweg</i>	15
1.7. ERBB2 MUTATION IN SCHWANNOMEN	17
1.8. NAB2 ALS TRANSKRIPTIONSREGULATOR IN SCHWANN-ZELLEN UND SCHWANN-ZELLTUMOREN	18
1.9. NAB2- STAT6 FUSIONSPRODUKT IN SOLITÄREN FIBRÖSEN TUMOREN	19
1.10. ZIELSETZUNG	20
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1. MATERIAL	22
2.1.1 <i>Technische Ausstattung</i>	22
2.2.1 <i>Kultivierung von Schwannomzelllinien</i>	27
2.3. IMMUNHISTOCHEMIE	29
2.4. PROTEINANALYSE	30
2.4.1 <i>Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford</i>	30
2.5. ZELLBIOLOGISCHE ASSAYS	34
2.5.1 <i>MTT Assay</i>	34
2.6. POLYMERASEKETTENREAKTION	35
2.6.1 <i>RT- Polymerasekettenreaktion</i>	35
2.6.3 <i>cDNA Synthese</i>	36
2.6.4 <i>Primer für die RT PCR</i>	36
2.6.5 <i>Auftrennung mittels Agarosegel</i>	36
2.7. ZELLKULTURVERSUCHSAUFBAUTEN	37
2.7.1 <i>Simulation von oxidativem Stress durch H₂O₂ in RT4D6P2T und RN22 Zellen</i>	37
2.7.2 <i>Inhibition der PI3K und MAPK in RT4D6P2T und RN22 Zellen</i>	38
2.7.3 <i>Inhibition der ALDH1 mit/ ohne Simulation von oxidativem Stress durch H₂O₂</i>	38
3. ERGEBNISSE	40
3.1. ALDH1A1 UND ALDH1A3 EXPRESSION IN SCHWANNOMEN UND SCHWANNOMZELLINIEN	40
3.2. EFFEKT VON OXIDATIVEM STRESS AUF DIE ALDH1A3 EXPRESSION	43
3.3. EFFEKT VON OXIDATIVEM STRESS AUF DIE EXPRESSION VON NAB2	45
3.4. MORPHOLOGIE VON SCHWANNOMZELLINIEN UNTER ALDH1 INHIBITION UND ZUGABE VON OXIDATIVEM STRESS	46
3.5. ERBB2 MUTATION IN RN22 UND RT4D6P2T SCHWANNOMZELLINIEN	51
3.6. MORPHOLOGIE VON SCHWANNOMZELLINIEN UNTER PIK3K, MAPKK, UND EGFR INHIBITOREN	52
3.7. VIABILITÄTSMESSUNGEN SCHWANNOMZELLINIEN	55
3.7.1 <i>Effekte von ALDH1 Inhibition</i>	55
3.7.2 <i>Effekte aus Kombination von ALDH1Inhibition und oxidativem Stress</i>	56
3.8. EINFLUSS DES PI3K- UND MAPK- SIGNALWEGES AUF DIE ALDH1A3 EXPRESSION	57
4. DISKUSSION	59
4.1. ALDH1 EXPRESSION IN NICHT NEOPLASTISCHEN UND NEOPLASTISCHEN SCHWANN-ZELLTUMOREN	60
4.2. GESTEIGERTE ALDH1A3-EXPRESSION IN SCHWANNOMZELLINIEN DURCH OXIDATIVEN STRESS	61
4.3. PROLIFERATIONSSTOPP IN SCHWANNOMZELLINIEN DURCH DIE INHIBITION VON ALDH1A3	62

4.4. MUTATION IM ERBB2 REZEPTOR.....	63
4.5. EINFLUSS DES PI3K- UND MAPK- SIGNALWEGES AUF PROLIFERATION VON SCHWANNOMZELLINIEN UND DIE ALDH1A3- EXPRESSION	64
4.6. VERGLEICH RT4D6P2T- UND RN22- SCHWANNOMZELLINIE	65
4.7. NAB2 ALS MÖGLICHER ALDH REGULATOR	67
ZUSAMMENFASSUNG	68
DANKSAGUNG.....	69
BIBLIOGRAFIE.....	70

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
ALDH	Aldehyddehydrogenase
EGR	Early growth response <i>protein</i>
ErbB2/Her2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
ErbB3/Her3	Human Epidermal Growth Factor Receptor 3
ERK	Extrazellulär regulierte Kinasen
GDP	Guanosindiphosphat
Grb2	Growth factor receptor bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
RAR	Retinoic Acid Receptor
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RXR	Retinoid X Receptor
SH2/3	Src-homology 2/3
SOS	Son of Sevenless
PIP2	Phosphatidylinositol-3,4-diphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PDK1/2	Phosphoinositide- dependent kinase 1/2
PH Domäne	Pleckstrin- Homology
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
ENU	Ethylnitrosourea
NAB	NGFI-A-binding protein
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
DEAB	N,N-diethylaminobenzaldehyde
DSF	Disulfriam

Publikation

Titel:

ALDH1 – A new immunohistochemical diagnostic marker for Schwann cell-derived tumor

Autoren:

Friederike Liesche, Michael Griessmair, Melanie Barz, Jens Gempt, Jürgen Schlegel
Abteilung für Neuropathologie, Institut für Pathologie, Abteilung für Neurochirurgie,
Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, München Deutschland

Zeitschrift:

Clinical Neuropathology, Volume 38 (2019) - July/August (168 - 173)

1. Einleitung

1.1. Problemstellung

Aldehyddehydrogenasen haben in den letzten Jahren in der Tumorforschung zunehmend an Bedeutung gewonnen. Dabei sind sie nicht nur ein wichtiger diagnostischer Marker der Pathologie geworden (Vassalli, 2019), sondern zeigen sich auch als Resistenzfaktor in verschiedenen Tumorentitäten gegenüber Strahlen- und Chemotherapie (Chang et al., 2018; Januchowski et al., 2013). Physiologisch spielen sie neben der Detoxifizierung von Aldehyden aus der Lipidperoxidation eine entscheidende Rolle in Differenzierungs- und Proliferationsprozessen (Singh et al., 2013). In Tumorzellen scheint eine ALDH-Expression zu erhöhter Resistenz gegenüber therapiebedingtem oxidativem Stress zu führen (Douville et al., 2009; Moreb, 2008). So konnte beispielsweise eine Therapieresistenz von ALDH1 positiven Glioblastomzellen gezeigt werden (Schafer et al., 2012).

Bisher ist wenig über die Rolle der Aldehyddehydrogenasen im peripheren Nervensystem bekannt. Doch insbesondere Schwann-Zellen benötigen für die Myelinisierung sowie Regeneration der Axone von peripheren Nerven einen effektiven und hohen Metabolismus. Dabei entstehen durch die Lipidperoxidation der Zellmembran über 200 verschiedenen Aldehyde (Kidd et al., 2013; Ravera & Panfoli, 2015), welche abgebaut werden müssen. Dies legt eine mögliche Expression von ALDH in Schwann-Zellen bzw. Schwann-Zelltumoren nahe, die jedoch bislang nicht nachgewiesen wurde.

In Myelinierungs-, Differenzierungs- und Proliferationsprozessen von Schwann-Zellen stellt der ErbB2/ErbB3 Rezeptor mit der konsekutiven Aktivierung intrazellulärer Signalwege, welche auch in der onkologischen Forschung von zentraler Bedeutung sind, eine Schlüsselrolle dar (Birchmeier & Nave, 2008). Ein möglicher Einfluss dieser Signalwege auf die ALDH-Expression würde viel Aufschluss über die bislang wenig erforschte prätranskriptionelle Regulation der ALDH-Expression geben (Poturnajova et al., 2021).

Ein möglicher Einfluss könnte als Modell für Regulationsmechanismen für aus der Neuralleiste stammende Zellen verwendet werden.

1.2. Schwann-Zellen

Da in den letzten Jahren wenig aktuelle Literatur zu Schwann-Zellen und Regulationsmechanismen publiziert wurde, wird in der folgenden Arbeit vor allem Primärliteratur aus den Neunziger- und Zweitausender-Jahren zitiert.

Schwann-Zellen sind die glialen Zellen des peripheren Nervensystems und übernehmen als Hüllzellen verschiedene Aufgaben.

Durch die Regulation des Extrazellulärmilieus der Nervenzellen sorgen sie für effiziente elektrochemische Erregungsausbreitung an den Axonen. Dabei muss zwischen myelinisierenden und nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen unterschieden werden. Erstere können Axone mit einer markhaltigen Myelinscheide umgeben. Mit der Ausbildung dieser markhaltigen Myelinscheide bilden sie die Grundlage der saltatorischen Erregungsleitung entlang der Axone der Nervenfasern. In diesem Fall umhüllt eine Schwann-Zelle genau ein Axon. Zweitere bilden marklose Axonscheiden, welche mehrere Axone ummanteln können. Dies bildet die Grundlage für die kontinuierliche Erregungsleitung.

Des Weiteren sind sie essenziell für die Energiebereitstellung der Axone. Im Falle einer Läsion können sie Überreste der Nervenzelle phagozytieren und die Basis für die Regeneration bilden (Bhatheja & Field, 2006). Zudem agieren sie als antigenpräsentierende Zellen gegenüber T-Zellen.

Embryologisch stammen Schwann-Zellen aus der Neuralleiste, welche Ursprung von verschiedenen Zellarten, wie beispielsweise Melanozyten oder endokrinen Zellen, sind. Die beteiligten Signalkaskaden, welche die einzelnen Entwicklungsstadien bestimmen, sind Gegenstand aktueller Forschung. Jedoch scheint dem Transkriptionsfaktor SOX10 eine Schlüsselrolle im Entwicklungsprozess zuzukommen (Mirsky et al., 2008). Durch Inaktivierung von SOX10 in Mausmodellen resultierte ein Entwicklungsstopp von peripheren glialen Zellen (Britsch et al., 2001).

Zwei weitere wichtige Transkriptionsfaktoren sind Krox-20 und Oct-6. Wobei diese insbesondere in der Reifung der myelinisierenden Schwann-Zelle aus einer unreifen Schwann-Zelle von Bedeutung sind. Der Unterschied ist, dass Oct-6 sowohl in myelinisierenden als auch in nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen nachgewiesen wurde (Jessen & Mirsky, 2005).

Über die letzten Jahre kamen den axonalen Neuregulinen eine zunehmende Bedeutung im Differenzierungsprozess der Schwann-Zellen zu (Nave & Trapp, 2008). Neureguline agieren als Liganden von ErbB-Rezeptoren. Auf Schwann-Zellen wird ErbB2 und ErbB3 exprimiert, welche

eine funktionelle Einheit bilden (Vartanian et al., 1997). Während ErbB2 die Tyrosinkinaseaktivität besitzt, bindet Neuregulin 1 ausschließlich an ErbB3. (Birchmeier & Nave, 2008; Sliwkowski et al., 1994). Über eine Heterodimerisierung der beiden Rezeptoren kommt es zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalwege (vgl. Abbildung 1) (Newbern & Birchmeier, 2010). Zudem scheint Sox10 die Expression von ErbB3 zu induzieren (Britsch et al., 2001).

1.3. Schwannome

Schwannome (im deutschsprachigen Raum teilweise auch Neurinome genannt) sind benigne Tumore der peripheren Nervenscheiden ausgehend von Schwann-Zellen.

Makroskopisch zeigen sich die Tumore derb und gekapselt. Histologisch können zwei Bilder unterschieden werden; die Antoni A- und Antoni B Formation. Erstere zeigt sich faserreich mit langen schmalen Zellen, wobei sich die Zellkerne palisadenartig aufreihen. Die zweite kennzeichnet sich durch eine faserärmere Formation mit geringer mitotischer Aktivität (Sobel, 1993). Das maligne Potential der Tumore ist sehr gering.

Prinzipiell können Schwannome in jedem Teil des peripheren Nervensystems entstehen. Gehäuft gehen sie jedoch vom vestibulären Anteil des Nervus vestibulochochlearis im Bereich des Kleinhirnbrückenwinkels aus, weswegen die Symptomatik, Klinik und Therapie im Folgenden lediglich exemplarisch für diese beschrieben wird. Meist treten sie unilateral auf. Ein bilaterales Auftreten ist meist mit einer Neurofibromatose Typ 2 assoziiert.

Trotzdem sie ein sehr geringes malignes Entartungspotenzial haben und unter WHO Grad I klassifiziert werden (Louis et al., 2021), können sie abhängig von der Lokalisation zu einer schweren Symptomatik führen.

Zu den Leitsymptomen des Vestibularisschwannoms zählen progredienter Hörverlust, Tinnitus und Schwindel. Weitere Symptome sind in der Regel abhängig von der Tumorausdehnung. Dabei kann es zu einer Beteiligung anderer Hirnnerven, insbesondere des Nervus facialis und teilweise des Nervus trigeminus im Bereich des Hirnstamms kommen, woraus halbseitige Gesichtslähmungen und Missempfindungen resultieren können (Goldbrunner et al., 2020).

Die jährliche Inzidenz liegt bei etwa 1-1,5/100000. Am häufigsten sind dabei Menschen nach dem 30. Lebensjahr betroffen.

Diagnostisch kommen in der Regel Magnetresonanztomographien, Audiometrien und Nervenfunktionsprüfungen zum Einsatz. Das MRT stellt jedoch das Diagnostikum der 1. Wahl dar (Yildiz et al., 2022).

Die Behandlung richtet sich meist nach der Symptomatik sowie dem Wachstumsverhalten des Tumors. Meist erfolgt die primär operative Resektion, welche mikrochirurgisch als auch radiochirurgisch mittels Cyberknive erfolgen kann, mit anschließender histologischer Beurteilung. In einzelnen Fällen, insbesondere bei Patienten mit Neurofibromatose 2, kann

eine medikamentöse Therapie mit Bevacizumab versucht werden, um das Tumorwachstum zu hemmen (Hadjipanayis et al., 2018).

1.4. Aldehyddehydrogenase 1 Familie

Aldehyddehydrogenasen sind eine Gruppe von Enzymen, welche endogene und exogene Aldehyde mittels NAD(P)⁺ oder CoA abhängiger Oxidation zu Carbonsäuren abbauen. Bisher sind 19 funktionelle Gene und mehrere Pseudogene für verschiedene ALDHs bekannt, (Jackson et al., 2011), welche unterschiedlich in menschlichen Geweben exprimiert werden. Eine besonders starke Expression findet sich in der Niere, Leber und der Lunge.

Grundsätzlich kann die Aldehydbildung in Zellen durch unterschiedliche Prozesse induziert werden. So führen beispielsweise radikale Sauerstoffspezies zur Lipidperoxidation der Zellmembran, welche die Bildung von über 200 verschiedenen Aldehyden induziert (Dix & Aikens, 1993). Doch die Funktion der Aldehyddehydrogenasen geht über den Abbau von oxidativen Stressprodukten hinaus.

So spielt insbesondere die Isoform ALDH1 in Differenzierungs- und Proliferationsprozessen verschiedener Zellen eine Rolle, unter anderem durch die Beteiligung am Retinsäureweg. ALDH1 oxidiert hierbei All-Trans-Retinal und 9- Cis Retinal zu Retinsäure (Duester, 2000). Im Nucleolus kann Retinsäure an zwei Rezeptoren binden: den "Retinoic acid receptor (RAR)" und den „Retinoid X Receptor (RXR)". Durch die Komplexbildung kann Retinsäure an das „Retinoic acid-response element" binden und über die Rekrutierung verschiedener Cofaktoren zur Aktivierung von verschiedenen Genen führen. Dies spielt eine große Rolle in physiologischen Prozessen, wie auch in der Regeneration, Aufrechterhaltung und Entwicklung des Nervensystems (Maden, 2007).

Darüber hinaus haben Aldehyddehydrogenasen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung als Tumorstammzellmarker und Resistenzfaktor in der onkologischen Forschung gewonnen. Dabei stellt sich ALDH1 mit ihren Untergruppen als besonders bedeutsam dar (Rasper et al., 2010).

Aber auch in normalen Stammzellen konnte eine erhöhte Aktivität von Aldehyddehydrogenasen nachgewiesen werden (Tomita et al., 2016). Es ist jedoch davon auszugehen, dass die einzelnen Funktionen zwischen Tumor und gesundem Gewebe divergieren. Als entscheidender Unterschied ist das Mikromilieu der Zellen zu nennen. (Tomita et al., 2016). Das Tumorstammzellmilieu ist von Hypoxie, Inflammation und schlechter

Bereitstellung von Metaboliten gekennzeichnet ist, wohingegen das der normalen Stammzelle eher ausgewogen ist (Mbeunkui & Johann, 2009; Morrison & Spradling, 2008). Die Gründe für die Varianz in verschiedenen Geweben und die Regulation sind noch Gegenstand derzeitiger Forschung.

Allerdings ist bisher wenig über die Regulation der Enzymgruppe bekannt. Bisher konnte ein Einfluss des WNT Signalweges über Aktivierung von b-Catenin auf die Expression von ALDH1A1 gezeigt werden (Cojoc et al., 2015). Zudem gibt es Hinweise für den Einfluss von AKT auf die Expression ALDH1A1 über die Regulation von b-Catenin (Sarabia-Sanchez et al., 2020). Bei der Regulation der Isoform ALDH1A3 scheint das Onkogen K-Ras über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors C/EBP β ein Schlüsselregulator zu sein (Kong et al., 2016). Diese Modelle beziehen sich jedoch hauptsächlich auf maligne Zellen.

1.5 Funktionsweise von ALDH Inhibitoren

Die einzelnen Aldehyddehydrogenasen ähneln sich in ihrem enzymatischen Mechanismus, zeigen jedoch dennoch entscheidende Differenzen. Dabei sind sie aus drei Untereinheiten aufgebaut: Je einer Oligomerisations-, Katalytischen- und Kofaktoren-Bindungs-Domäne. Mittels des Kofaktors NADP⁺ setzen sie Aldehyde in Carbonsäurederivate um. Lediglich ALDH6A1 nutzt CoA als Kofaktor (Koppaka et al., 2012).

Es gibt verschiedene Substanzen, die durch unterschiedliche Mechanismen Aldehyddehydrogenasen in ihrer Aktivität hemmen. In dieser Arbeit soll nur auf die inhibitorischen Effekte von DEAB (4-(Diethylamino)benzaldehyde) und Disulfiram eingegangen werden.

DEAB fungiert im Gegensatz zu klassischen Inhibitoren wahrscheinlich als langsames kompetitives Substrat (Russo et al., 1988). Der genaue Funktionsmechanismus ist derzeit weitgehend unbekannt. Es wird diskutiert, ob DEAB mehr die zytosolische ALDH1 als mitochondriale ALDH2 inhibiert. Dies konnte bisher nicht hinreichend geklärt werden.

Dagegen hemmt der aktive Metabolit Diethylthiocarbamat von Disulfiram über seine hohe Affinität die Aldehyddehydrogenase selektiv und irreversibel. Aufgrund der Enzymarchitektur von ALDH1 hemmt Disulfiram diese besser als ALDH2 (Moore et al., 1998). Über Zwischenstufen entstehen verschiedene potente Metabolite, welche verschiedene ALDHs unterschiedlich stark inhibieren. (Koppaka et al., 2012)

1.6. Rezeptortyrosinkinasen ErbB Rezeptorfamilie

Rezeptortyrosinkinasen gehören zu den Transmembranrezeptoren. Auf der extrazellulären Seite besitzen sie eine Bindungsstelle für Liganden, welcher über eine Transmembrandomäne mit den beiden intrazellulären Untereinheiten in Verbindung steht (Ullrich & Schlessinger, 1990). Bei Bindung eines Liganden kommt es zu einer Dimerisierung mit anschließender Autophosphorylierung der Tyrosinreste der beiden intrazellulär liegenden Untereinheiten. Die Aktivierung dieser Rezeptoren erfolgt üblicherweise durch Wachstumsfaktoren.

Die ErbB- Rezeptorfamilie gehört zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Bereits als Monomer kann ein ErbB- Rezeptor eine geringe Aktivität aufweisen. Erst durch die Ligandenbindung mit der darauffolgender Heterodimerisierung mit einer der anderen ErbB- Rezeptoruntereinheiten, kann ein Rezeptor seine volle katalytische Wirksamkeit entfalten.

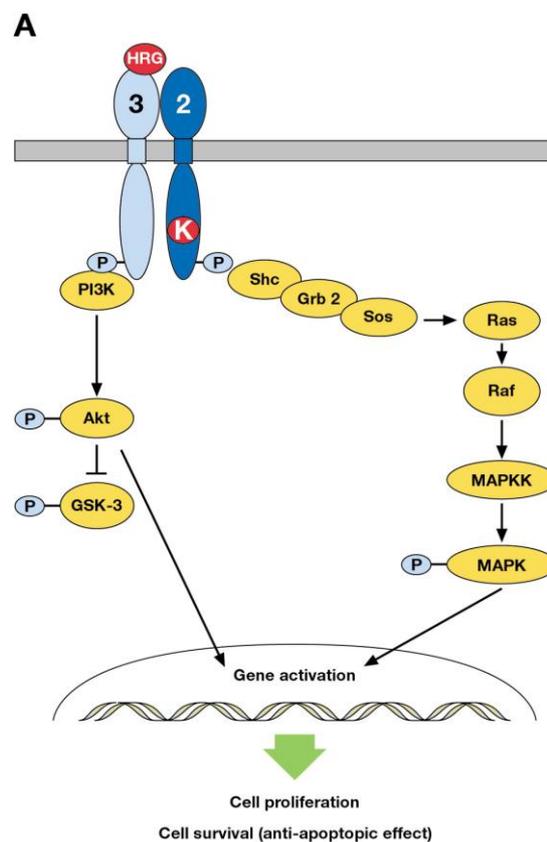


Abbildung 1: Darstellung der ErbB2/3 Heterodimerisierung aus (Baselga, 2002)

Durch die Autophosphorylierung der Tyrosinreste kommt es zur weiteren Aktivierung von Signalkaskaden. Hierzu gehören unter anderem der MAPK und PI3K Signalweg.

1.6.1. Der MAPK-Signalweg

Grundsätzlich können drei Subklassen der „Mitogen- Activiated- receptor- kinases“ unterschieden werden: Extrazellulär Signal regulierte Kinasen (ERK), Jun N-Terminal Kinase (JNK)1/2/3 und die p38 Isoformen (Dhillon et al., 2007).

Funktionell bilden die MAP-Kinasen ein Kommunikationsmodul zwischen den extrazellulären Signalen und der intrazellulären Regulierung von Wachstum, Proliferation oder Zelltod (Alam et al., 2013)

Im speziellen Fall der Schwann-Zellen/ Schwannome bindet Heregulin extrazellulär an den ErbB2/ErbB3- Rezeptor. Hierdurch kommt es zu einer Autophosphorylierung der Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Der Komplex aus den Proteinen Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) kann insbesondere über seine SH2 Domänen mit dem phosphorylierten Rest des ErbB- Rezeptors kommunizieren (Lowenstein et al., 1992). Mit dem SOS (Son of Sevenless) Protein interagiert Grb2 insbesondere über seine SH3 Domänen (Simon & Schreiber, 1995).

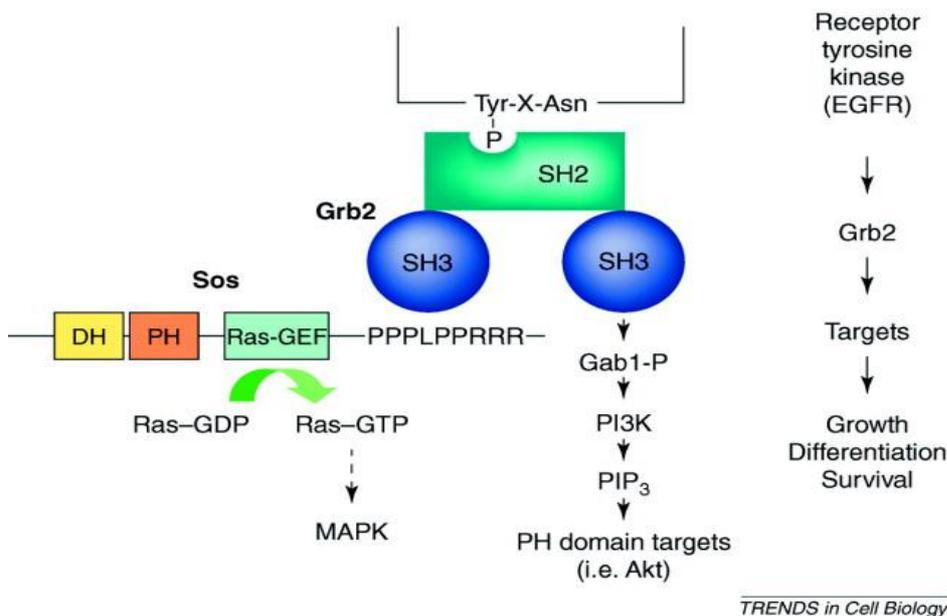


Abbildung 2: Kommunikation des GRB2 Proteins über seine SH2 und seine zwei SH3 Domäne; aus (Pawson et al., 2001)

Durch die Interaktion des Ras Proteins mit dem SOS Protein kommt es zu einem Austausch von GDP zu GTP, wodurch das Ras Protein in seine aktive Form übergeht.

Die aktivierte Form des Ras Proteins setzt die Signalkaskade fort, indem es das Raf-Protein phosphoryliert, welches wiederum die MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase) aktiviert.

Die genannte MAPKK führt über ein Threonin/Tyrosin Phosphorylierung zur Aktivierung der MAPK (Mitogen- acitvated kinase auch ERK1/2), welche die Fähigkeit besitzt in den Nucleus einzudringen und dort Transkriptionsfaktoren durch eine erneute Phosphorylierung zu aktivieren. Durch die Steuerung der Transkriptionsfaktoren kommt es zu einer Regulation verschiedener Prozesse, welche eine große Bedeutung in Proliferations- und Differenzierungsprozessen in der Zelle spielen (Zhang & Liu, 2002).

1.6.2. Der PI3K-Signalweg

In physiologischer Expression spielen die einzelnen Unterformen der PI3K eine ausschlaggebende Rolle in der Weiterleitung von Signalen, die in der Zelle zu Wachstum, Proliferation, Adhäsion oder Migration führen. Zudem zeigen sie antiapoptotische Effekte. In verschiedenen Tumorentitäten konnte eine erhöhte Aktivität gefunden werden, welche entsprechend zu unkontrollierter Proliferation oder Migration führen kann (Fruman et al., 2017).

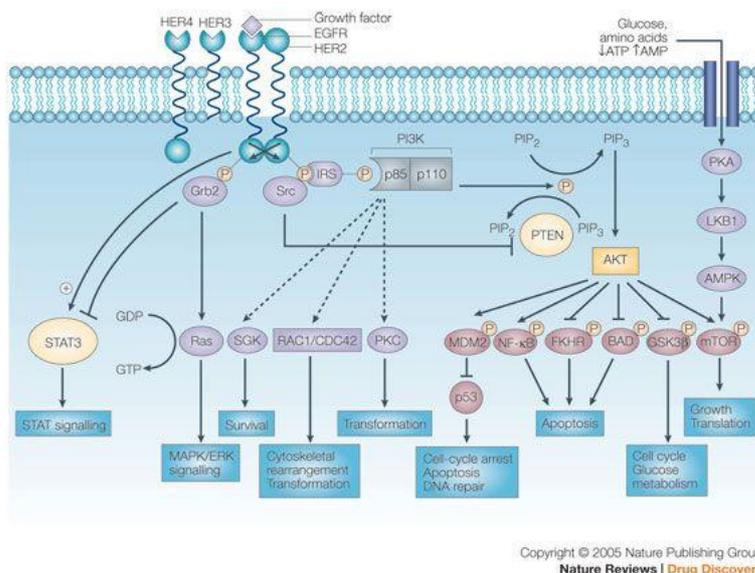


Abbildung 3: Der Einfluss des PI3K Signalweges auf zelluläre Prozesse; aus (Hennessy et al., 2005)

Durch die Bindung eines extrazellulären Transmitters an die außenständige Domäne der RTK erfolgt die intrazelluläre Phosphorylierung und Dimerisierung. Die PI3K kann im weiteren Schritt mit ihrer P85- Untereinheit mit der SH2 Domäne des Rezeptors interagieren, wodurch

sie durch Phosphorylierung aktiviert wird. Über die p110- Untereinheit erfolgt die Phosphorylierung der membranständigen PIP2 (Phosphatidylinositol-3,4-diphosphate) zur PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate), welche Proteine mit einer PH Domäne (Pleckstrin- Homology) an die Zellmembran bringt. Das primäre Ziel der PIP3 ist die AKT, auch Proteinkinase B genannt (Hennessy et al., 2005). Durch die Rekrutierung an die Zellmembran erfolgt eine Konformationsänderung der AKT. Hierbei exponieren die zwei Aminosäuren Serin 473 und Threonin 308, durch deren Phosphorylierung die AKT in ihre aktivierte Form die pAKT übergeht. Die Phosphorylierung der beiden Aminosäuren erfolgt über die PDK1 und PDK2 (Blume-Jensen & Hunter, 2001)

Das Enzym PTEN greift als entscheidender Regulator in den Signalweg ein. Über die Dephosphorylierung der PIP3 zu PIP2 greift es negativregulatorisch in den Signalweg ein. Somit funktioniert es als Tumorsuppressor (Lee et al., 2018) In verschiedenen Tumoren konnte der Funktionsverlust der PTEN durch Mutation nachgewiesen werden (Endersby & Baker, 2008).

1.7. ErbB2 Mutation in Schwannomen

Durch die perinatale Exposition von Rattenembryos gegenüber Ethylnitrosourea zeigte sich eine hohe Inzidenz von neuroektodermalen Tumoren (Rajewsky, 1983). In genomischen Analysen konnte eine Punktmutation im Gen von ErbB2 nachgewiesen werden. Anstatt eines Thymins in Position 2012 der Basensequenz kommt es zu einem Einbau eines Alanins. Durch die Punktmutation codiert das Basentriplet GAG Glutamat anstelle eines Valins durch CTG an Stelle 664 (Bargmann et al., 1986). Diese Aminosäuresequenz bildet die Transmembrandomäne des Rezeptors, welcher sich durch den Wechsel strukturell verändert. Die Änderung in der Transmembrandomäne führt zu einer gesteigerter intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität und somit zu einer stärkeren Aktivierung der zellulären Signalwege (Bargmann & Weinberg, 1988; Stern et al., 1988).

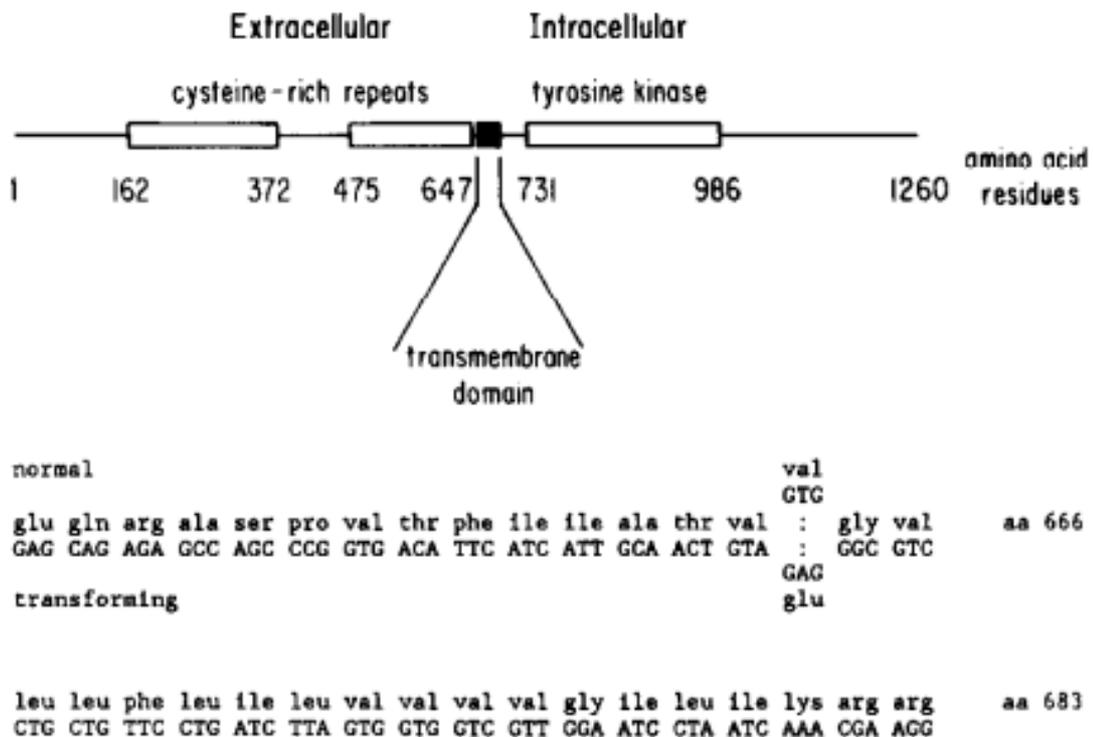


Abbildung 4: Mutation im ErbB2 Gen; aus (Bargmann et al., 1986)

1.8. NAB2 als Transkriptionsregulator in Schwann-Zellen und Schwann-Zelltumoren

Es konnte nachgewiesen werden, dass NAB Proteine in der Regulation von Schwann-Zellproliferation eine wichtige Rolle spielen. NAB Proteine wirken auf der Transkriptionsebene, indem sie die transkriptionelle Aktivität von EGR-Proteinen modulieren (Svaren et al., 1996). EGR Proteine übernehmen eine wichtige Funktion in der Regulation von Myelinisierungsprozessen (Le et al., 2005). Das Auftreten von Mutationen kann Ursache für schwere hereditären Neuropathien sein (Warner et al., 1999).

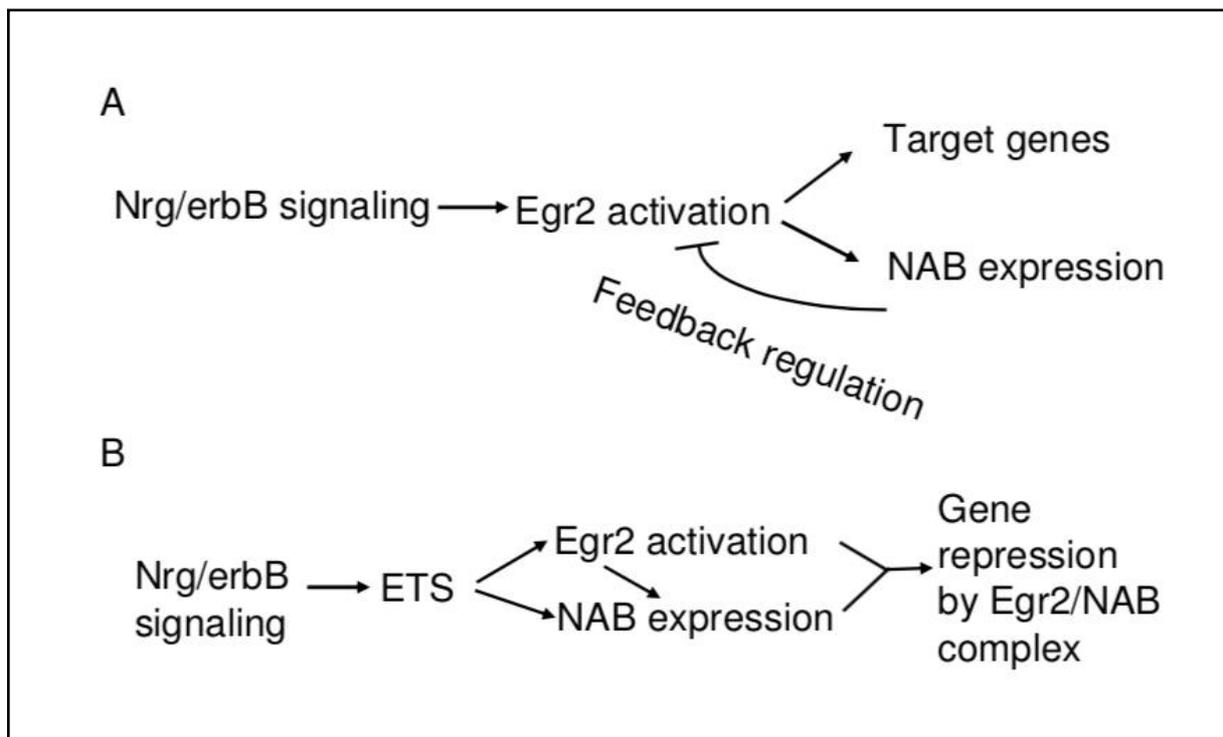


Abbildung 5 Stellung der NAB Expression im Neuregulin- und ErbB-Signalweg; aus (Srinivasan et al., 2007)

EGR2 besitzt eine konservierte R1 Bindungsdomäne, welche die Interaktionsstelle für NAB-Proteinen bildet (Russo et al., 1995). Dabei sind NAB Proteine aus zwei Domänen aufgebaut, einer NCD1 und einer NCD2 Domäne. Erstere interagiert mit der EGR R1 Domäne, zweitere spielt eine Rolle in der transkriptionellen Regulation (Swirnoff et al., 1998).

NAB2 fungiert hierbei als negativer Feedbackregulationsmechanismus (Kumbrink et al., 2005; Kumbrink et al., 2010).

1.9. NAB2- STAT6 Fusionsprodukt in solitären fibrösen Tumoren

Durch mehrere sequenzielle Analysen konnte eine intrachromosomale Genfusion des Repressors NAB2 und dem Aktivator STAT6 (Signal transducer and activator of transcription 6) in solitären fibrösen Tumoren nachgewiesen werden (Chmielecki et al., 2013; Robinson et al., 2013). Der eigentliche Repressor NAB2 fällt durch das Fusionsprodukt unter die transaktivierende Domäne von STAT6 (Tai et al., 2015). Durch Genfusion verliert NAB2 seine eigentliche Funktion als transkriptioneller Repressor und wird zu einem potenziellen Aktivator von EGR abhängigen Genen, was zu neoplastischen Prozessen führen kann. Die Überexpression von NAB2 und STAT6 führte zu gesteigerter Proliferation in Zellkulturexperimenten und zeigte Effekte auf die Expression von EGR abhängigen Genen. (Robinson et al., 2013)

1.10. Zielsetzung

Aldehyddehydrogenasen haben in den letzten Jahren in der Tumorforschung sowohl in der Diagnostik als auch als Resistenzfaktor in der Therapie zunehmend an Bedeutung gewonnen. Bisher ist jedoch wenig über die Zusammenhänge der Enzymregulation bekannt (Poturnajova et al., 2021). Ziel dieser Arbeit ist es, diese Zusammenhänge an Schwann-Zellen bzw. Schwannomzellen, als Vertreter der Neuralleistenzellen, besser zu verstehen.

Zunächst sollte geprüft werden, ob in Schwann-Zellen bzw. benignen Schwann-Zelltumoren ALDH1 exprimiert wird. Hierzu sollten immunhistochemisch Schwann-Zell- und Schwann-Zelltumor-Präparate (benigne und maligne) auf eine mögliche ALDH1 Expression untersucht werden.

Zur Bestätigung der immunhistochemischen Ergebnisse wurden die zwei Schwannomzelllinien RT4D6P2T und RN22, als Modell für Schwann-Zellen, für Zellkulturexperimente in die Arbeit miteingeschlossen und zunächst mittels Western Blot Analyse auf ihre ALDH1-Expression untersucht.

Um ein besseres Verständnis über die physiologische Rolle der ALDH1 in Schwann-Zellen zu erlangen, sollten mögliche Auswirkungen einer ALDH1-Inhibition mittels DEAB und DSF geprüft werden. Dabei sollten Effekte auf die Vitalität, Proliferation und die Zellmorphologie analysiert werden.

Im weiteren Schritt sollte die mögliche Rolle der ALDH1 im Detoxifizierungsprozess nach oxidativem Stress untersucht werden. Hierzu sollte ein Teil der Zellen vor der Simulation von oxidativem Stress durch H_2O_2 eine Inhibition der ALDH1 (mittels DEAB bzw. DSF) erhalten.

Ob die Inhibition zu erhöhter Vulnerabilität gegenüber oxidativem Stress führt, sollte mittels Viabilitäts-Assays untersucht werden.

Um Erkenntnisse über die Enzymregulation zu erhalten, sollten im weiteren Verlauf tumorbiologisch relevante Signalwege untersucht werden. Hierfür sollte zunächst das ErbB2-Gen in den zwei Schwannomzelllinien mittels PCR auf eine mögliche Punktmutation untersucht werden, welche durch eine Änderung der Transmembrandomäne zu einer gesteigerten intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität führt (Bargmann & Weinberg, 1988; Stern et al., 1988).

Im Anschluss sollten der PI3K- und MAPK- Signalweg näher beleuchtet werden. Durch die gezielte zellkulturelle Blockierung beider Signalwege sollten zunächst morphologische Veränderungen in den beiden Schwannomzelllinien mikroskopisch betrachtet werden. Ein

möglicher Effekt auf das Proteinlevel der ALDH1 sollte mittels Western-Blot-Proteinanalyse geprüft werden.

Insgesamt war das Ziel der Arbeit ein umfassendes Bild über die physiologische Rolle, sowie die Regulation von ALDH1 in Schwann-Zellen bzw. Schwannomzellen zu erlangen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Technische Ausstattung

Gerät	Modell	Hersteller
96-well plates cooler	Z606634-1EA	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Aqualine water bath	AL12	LAUDA-Brinkmann, Lauda-Königshofen, Germany
Autoclave	VX-120	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Germany
Centrifuge	5417R/5425	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Freezingcontainers	CoolCell®LX	Biocision, Hannover, Germany
Gel imaging system	E-Box CX5	Peqlab, Erlangen, Germany
Heater mixer	53355	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Microcentrifuge	063089(1R)	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Mini cooler	C12R	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Germany
pH-meter	EL-20	Mettler Toledo, Gießen, Germany
Power supply	PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories, Inc., Munich, Germany
Real-time PCR system	Lightcycler® 480 II	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
Shaker	Minishaker MS1	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany
Thermal cycler	2233	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Tissue cooling plate	TES Valida	Medite GmbH, Burgdorf, Germany
X-ray film processor	Konica SRX-101A	Konica Minolta GmbH, Langenhagen, Germany

Tabelle 1: Ausstattung

2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Substanz	Nummer	Hersteller
Acetic acid	7332.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Acrylamide	3029.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Ammoniumperoxosulphate(APS)	9592.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Aqua Poly/Mount	18606	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstraße, Germany
DEAB		
Dimethylsulfoxide(DMSO)	A994.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
DSF		
Dulbecco's Modified Eagle Medium GlutaMAX-I, high Glucose (DMEM)	41966052	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany
Ethanol	T171.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	CN06.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Fetal Bovine Serum (FBS)	S0415	Biochrom AG, Berlin, Germany
Hydrogen peroxide solution (H ₂ O ₂)	H1009	Sigma Aldrich, Munich, Germany
ImmPACT DAB	SK-4 105	BioZol, Eching, Germany
Isopropanol	9866.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
LY294002	9901S	Cell signaling technologies, Frankfurt am Main
Page Ruler Plus	26619	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany
PD98509	9900	Cell signaling technologies, Frankfurt am Main
Penicillin-Streptomycin	P4333	Sigma-Aldrich, Munich, Germany
Phosphate Puffered Saline(PBS)	14190250	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany
Primescript™ RT Reagent Kit	RR037A	TAKARA Clontech, Av du Pdt Kennedy St-Germain-en-Laye, France
Protease/Phosphatase inhibitor cocktail (100X)	5872	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, Germany
Skimmed milk powder	T145.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Sodium chloride (NaCl)	9265.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	2326.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany

Temed	2367.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Thiazolyblue(MTT)	4022.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Tris	0188.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Tween-20	9127.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany

Tabelle 2 Reagenzien

2.1.3. Antikörper

Antikörper	Spezies	Firma	Nummer
Akt	Kaninchen	Cell- Signaling Technologies	#9272
p-Akt	Kaninchen	Cell- Signaling Technologies	#9272S
p-42/44 MAPK	Kaninchen	Cell- Signaling Technologies	#9102
P-p42/44 MAPK	Kaninchen	Cell- Signaling Technologies	#4376S
ALDH1a3	Kaninchen	Novus	#NBP2-15339
Vinculin	Kaninchen	abcam	Ab129002

Tabelle 3: Antikörper

2.1.4. Immunhistochemische Präparate

In die Immunhistochemie wurden 91 histologische Präparate eingeschlossen, die alle aus dem Archiv der Pathologie des Klinikum Rechts der Isar, Technische Universität München, stammen, nachdem sie im Zeitraum von 2014-2018 in der Klinik für Neurochirurgie des Klinikum Rechts der Isar gesammelt wurden. Für die Verwendung der Präparate ist ein Ethikvotum erteilt worden.

Die histologischen Präparate setzten sich aus folgenden Entitäten zusammen: 67 Schwann-Zelltumore, unter welchen 56 Schwannome (30 spinale Schwannome, 19 vestibuläre Schwannome, und 7 periphere Schwannome), 6 maligne periphere Nervenscheidentumore und 5 Neurofibrome waren.

Zudem wurden tumoröse Schwann-Zellläsionen inkludiert, ein Morton- Neurom, 2 traumatische Neurome und 4 Weichteilpräparate mit peripheren Nerven.

Zudem wurden 17 Nicht- Schwann-Zelltumore als Kontrolle eingeschlossen. Hierbei handelte es sich um 15 Meningeome (6 WHO-Grade I Meningeome, 7 WHO II Meningeome, 2 WHO III Meningeome), 1 Leiomyosarkom, 1 gastrointestinaler stromaler Tumor (GIST).

Gewebe/Tumorentität	N	Median (Verteilung) in Jahren	Alter	
			männlich	weiblich
Schwannome, WHO-Grad I	56	55 (15-82)	29 (52%)	27
– Vestibularisschwannom	19	57 (28-82)	8 (42%)	11 (58%)
– Spinales Schwannom	30	55 (15-81)	16 (53%)	14 (47%)
– Peripheres Schwannom	7	52 (29-78)	5 (71%)	2 (29%)
Neurofibrom, WHO-Grad I	5	52 (29-80)	4 (80%)	1 (20%)
MPNST	6	68 (52-81)	3 (50%)	3 (50%)
Meningeome	15	68 (37-78)	8 (53%)	7 (47%)
– WHO-Grad I	6	61 (40-78)	3 (50%)	3 (50%)
– WHO-Grad II	7	68,5 (38-57)	5 (71%)	2 (29%)
– WHO-Grad III	2	77,5 (77-78)	0 (0%)	2 (100%)
GIST	1	66	0 (0%)	1 (100%)
Leiomyosarkom	1	44	0 (0%)	1 (100%)
Periphere Nerven	4	72 (27-82)	2 (50%)	2 (50%)
Traumatisches Neurom	2	25,5 (24-27)	1 (50%)	1 (50%)
Morton Neurom	1	52	0 (0%)	1 (100%)

Tabelle 4 Patientenverteilung bezogen auf die immunhistochemisch geprüften Tumorentitäten, modifiziert nach (Liesche et al., 2019)

Die Auswertung erfolgte nach dem Immunreaktiven Score (IRS), entwickelt von Remmele und Stegner (Remmele & Stegner, 1987). Dieser setzt sich aus der Anzahl der gefärbten Zellen und der Intensität zusammen. Die Intensität wird mit einem Score von 0-3 bewertet (0 keine Positivität, 1 schwach, 2 moderat 3 starke Reaktion). Die Anzahl der gefärbten Zellen wird in

Prozent angegeben. Hierbei reicht die Klassifikation von 0 bis 4 (0: 0 %, 1: 1-10%, 2: 11-50%, 3: 51-80% und 4: 81-100% gefärbte Zellen). Das Produkt der beiden Werte bestimmt den IRS Score.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Kultivierung von Schwannomzelllinien

In die Experimente wurden die etablierten Schwannomzelllinien RN22 (Pfeiffer & Wechsler, 1972) und RT4D6P2T (Imada & Sueoka, 1978) eingeschlossen. Die RN22 Zellen stammen von einem transplazentär durch Ethylnitrosourea (ENU) induzierten Cervikalnerven-Schwannom aus BD-IX Ratten. Die RT4D6P2T Zellen stammen ebenfalls aus einem Ethylnitrosourea-induziertem Tumor aus dem peripheren Nervensystem der Ratte.

Die Zelllinien wurden unter den üblichen Bedingungen kultiviert. (37°C, 5% CO₂). Für die Inkubation wurde Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) mit 4mM L Glutamine, 4500g/l Glucose, 1mM Natrium und 1500mg/dl, verwendet. Der FBS Anteil lag abhängig des Experimentes zwischen 0-10%. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde zunächst das Medium unter sterilen Bedingungen abgesaugt und die Zellen im Anschluss 2-mal mit 5ml sterilem PBS gewaschen (Temperatur 37°C, Phosphatgepufferte Salzlösung, 137mM NaCl, 2,7mM KCL, 12mM Gesamtphosphat). Nach einer 5-minütigen Inkubation mit 2ml Trypsin, wurde die Enzymaktivität mittels 2ml DMEM+FBS gestoppt. Darauf wurden je nach vorheriger Zelldichte 300-500µl in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit 10ml DMEM+/- 10 FBS inkubiert.

2.2.2. Gewinnung von Proteinlysaten

Nachdem das Medium unter sterilen Bedingungen abgesaugt worden war, wurden die Zellen 2-mal mit Dulbecco`s Phosphate Puffered Saline (DPBS) gewaschen. Darauf wurden den Zellen umgehend 100-200µl Radioimmunprecipitation Assay Puffer (RIPA) zugefügt. Der RIPA Puffer ist mit 10µl Proteaseinhibitor versetzt, um eine Proteindegradation und – dephosphorylation zu verhindern. Die Proteinlysate wurden nach Abkratzen mit einem Kunststoffschaber in 1,5ml Reaktionsgefäße transferiert. Die Zellen wurden mehrfach mittels Sonicator lysiert, um eine optimale Proteinextraktion zu erhalten. Darauf wurden die lysierten Zellen 15min auf Eis inkubiert, mit darauffolgender Zentrifugation mit 10000U/min für 10min. Der Proteinüberstand wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, das verbliebene Sediment verworfen. Je nach Versuchsplan wurde der Proteinüberstand bei -80° eingefroren oder unmittelbar weiterverwendet.

Chemikalie	Konzentration
SDS	0.1%
Tris-Cl	10mM
EDTA	0.5mM
Triton X -100	.1%
NaCl	140mM
Sodium deoxycholate	0.1%

Tabelle 5 Zusammensetzung RIPA Puffer

2.3. Immunhistochemie

In der Immunhistochemie werden Proteine mit Hilfe von markierten Antikörpern angefärbt und somit mikroskopisch sichtbar gemacht. Hierzu wurden die fixierten Schnitte der humanen Proben vorerst für 15min bei 56° inkubiert. Die Deparaffinisierung erfolgte durch die aufeinanderfolgende Inkubation mit Xylol, Ethanol und Wasser. Um die bei der Formalaldehydfixierung entstandenen Quervernetzungen wieder zu lösen, wurden die Proben für 30-40min im Citrat Puffer gekocht. Dadurch wurden die Antigenbindungsstellen freigelegt und konnten später von spezifischen Antikörpern erkannt werden. Nach dem Abkühlen der Schnitte in destilliertem Wasser wurden die zu markierenden Bereiche mit einem Fettstift umrandet. Zur Hemmung der endogenen Peroxidase wurden die Proben mit Wasserstoffperoxid für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit Blockingpuffer für 30min wurden die Proben mehrfach in PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht. Vor der 40 minütigen Inkubation mit einem 1:400 verdünnten sekundären Antikörper wurden die Schnitte mehrfach in PBS gewaschen und im Anschluss 30min mit einem Avidin/Biotin Komplex inkubiert. Dies ist für die spätere Darstellung der Antikörperreaktion von entscheidender Bedeutung. Anschließend wurden die Proben mit Diaminobenzidin (ImmPACT DAB, SK 4104 Vector), einem Indikator, inkubiert. Dabei sollte die Reaktion unter dem Mikroskop beobachtet werden und zum richtigen Zeitpunkt mit destilliertem Wasser gestoppt werden.

2.4. Proteinanalyse

2.4.1. Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf einer Anfärbung durch Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 (Bio Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate). Der Farbstoff bindet in saurer Lösung an die primären und aromatischen Aminosäuren, wodurch sich Proteinkomplexe bilden. In ungebundener Form hat der Farbstoff sein Absorptionsmaximum bei 470nm. Erst im gebundenen Zustand verschiebt sich das Maximum auf 595nm, wo es photometrisch bestimmt werden kann, wobei die Ausprägung des Farbumschlages von der Proteinkonzentration abhängt.

Für die Analyse wurden 4µl des Proteinlysates mit 36µl volldestilliertem Wasser verdünnt, und diese als Triplets a 10µl in eine 96 Well Platte pipettiert. Für eine Kalibrationskurve wurde ein BSA- Protein- Standard (Bio Rad Bovine Serum Albumin Standard) verwendet.

Das Dye Reagent wurde im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und durch einen Whatman Filter gefiltert. Darauf wurden je 200µl dieses verdünnten Dye Reagent auf eine 10µl Probe gegeben und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte über ein multifunktionelles Extinktionslesegerät.

Komponenten	Menge
Proben verdünnt 1:10	4 µl Probe + 36 µl ddH2O
Farbreagenz verdünnt 1:5	200 µl Gesamtprobe

Tabelle 6 Protokoll für Bradford Assay

2.4.2. SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS Polyacrylamid Gel- Elektrophorese beruht auf dem Prinzip der Proteinauftrennung nach ihrer Größe durch elektrische Spannung. Die Proteingemische wurden hierfür zunächst im Verhältnis 5:1 mit Laemmli- Puffer (4% SDS, 20% Glycerol, 10% 2-Mercaptoethanol, 0.004% Bromphenol blue und 0.125 M Tris HCl, pH 6.8) + DTT (Dithiothreiol) vermischt. Das im Puffer enthaltende SDS wirkt als anionischen Tensid zur Neutralisierung der Proteinladungen. DTT

verhindert als stark reduzierendes Molekül die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbrücken. Um die Sekundär-/Tertiärstruktur der Proteine aufzubrechen, wurden die Protein- SDS Gemische bei 95° für 5min erhitzt. Dabei werden deren Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen, wodurch die einzelnen Proteine eine anionische Aufladung erhalten. Somit können sie nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Gele für die Elektrophorese wurden zweischichtig aus einem unten liegenden Separationsgel und dem darüber liegenden Sammelgel gegossen. Nachdem das Separationsgel zwischen den vertikalstehenden zwei Glasplatten polymerisiert war, wurde das Sammelgel aufgegossen. Die Bildung der einzelnen Gelkammern wurde durch das Einfügen eines Probenkamms (10 bzw. 15 Fächer) in das Sammelgel vor der Polymerisation erzielt.

Substanz	5% Sammelgel	12% Separationsgel
H2O	2,75 ml	2,45ml
1,5M TRIS ph 6,8/ 8,8	500µl	1,9ml
SDS 10%	40µl	75µl
Acrylamid 30%	650µl	3,0ml
APS 10%	40µl	75µl
Temed	4µl	3µl

Tabelle 7: Zusammensetzung der Gele für SDS- Page

Nach Fertigstellung der Gele wurden die Proteinlysate in gleichen Gesamtproteinmengen in die einzelnen Gelkammern pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 180 Volt. Abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins betrug die Laufzeit 1-1,5 Stunden.

Stoff	Volumen	Konzentration
Tris	30.3g	0.25M
Glycin	144.1 g	2M
SDS	10g	1%
Gesamt	1 l	

Tabelle 8 Running Puffer 10x

2.4.3. Western Blot Analyse

Nach der Proteinauftrennung über SDS-PAGE wurden die Proteine mit der Wet-Blot-Methode auf eine PVDF Membran übertragen. Hierzu wurde zwischen einer Kassette ein Stapel aus verschiedenen Filtern und Membranen gebaut. Dabei ist besonders auf die richtige Reihenfolge zu achten, da die Proteine später zu Anode übertragen werden. Die Übertragung erfolgt durch das Einfügen der Kassette in eine Transfer-Box, welche mit Transferpuffer gefüllt ist. Es wurde eine konstante Spannung von 100Volt für eine Stunde angelegt. Um ein starkes Erhitzen des Transferpuffer zu verhindern, wurde neben der konstanten Spannung, Kühlpacks in die Transferbox gelegt.

Stoff	Volumen	Konzentration
Tris	30.3g	0.25M
Glycin	142,6g	2M
Gesamt	1 l	

Tabelle 9 Transfer Puffer 10x

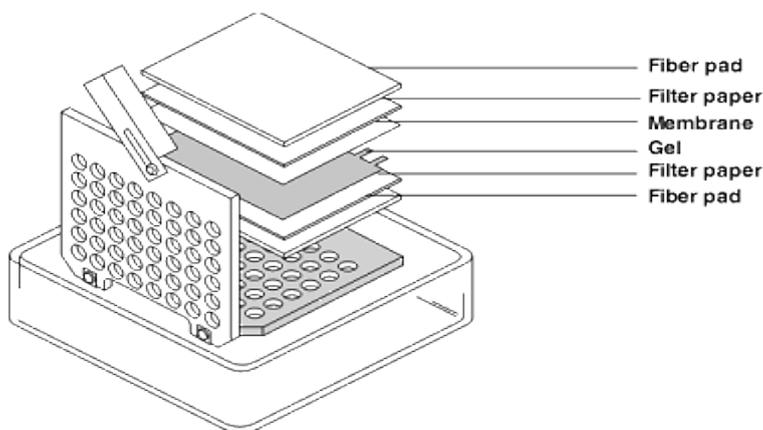


Abbildung 6 Mechanismus einer schematisch dargestellten Wetblot Kassette, aus ThermoSc

Nach dem erfolgreichen Transfer wurden die Membranen in Rotiblock (ca. 5ml pro Membran) für 1 Stunde inkubiert, wodurch freie Proteinbindungsstellen blockiert wurden. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4 Grad über Nacht, wurden die Membranen für 3x5-10min mit TBS- T gewaschen.

Stoff	Volumen	Konzentration
Tris	24,2g	0.2M
NaCl	87,66g	1.5M
Gesamt	1 l	

Tabelle 10 TBS Puffer 10x

Auf die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 45min bei Raumtemperatur, folgten erneute Waschschrte mit TBS-T 5x5min. Währenddessen wurden die Luminol Reagenz und Peroxid Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach Beendigung erfolgte die Inkubation der Membranen in dem Luminol/Peroxid Gemisch für 5min. Die dabei entstehende Lichtreaktion wurde über einen Röntgenfilm aufgefangen.

2.5. Zellbiologische Assays

2.5.1. MTT Assay

Der Nachweis der Zellvitalität beruht auf der Fähigkeit einer vitalen Zelle den gelben, wasserlöslichen Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan zu reduzieren. Dieses geschieht durch die in der Zelle vorhandenen mitochondrialen Dehydrogenasen. Die Farbintensität, die dabei durch das Formazan entsteht, steht somit in positiver Beziehung zur Vitalität bzw. der mitochondrialen Aktivität der einzelnen Zelle.

Nach der Behandlung wurde den einzelnen Proben 200 µl MTT-Lösung beigegeben, womit sie 4 h unter den gängigen Bedingungen (37° und 5% CO₂) inkubiert wurden. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurde für die Lösung des Farbstoffes aus den Zellen, 1 ml DMSO pro Well hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 30 min in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die einzelnen Proben à 3x100 µl als Triplets in eine 96-Well-Platte pipettiert. Dabei ist besonders auf die vollständige Lösung der blauen Formazankristalle zu achten. Nach der Homogenisierung erfolgte die Extinktionsmessung bei 595 nm.

2.6. Polymerasekettenreaktion

2.6.1 RT- Polymerasekettenreaktion

Die Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion ist eine in der Molekularbiologie angewendete Technik für die Amplifizierung von einzelnen DNA-Sequenzen. Durch die Sequenzierung dieser Abschnitte lassen sich beispielsweise genetische Erkrankungen bzw. Mutationen nachweisen. Hierzu wurde zunächst die RNA isoliert und mittels einer spezifischen RNA abhängigen DNA-Polymerase in cDNA umgeschrieben. Die Amplifizierung der spezifischen DNA-Abschnitte erfolgte durch Denaturierung, Annealing, Extension. Durch eine Temperaturerhöhung auf 90-95° kommt es zu einer Denaturierung des DNA-Doppelstrangs. Als Startpunkt für die anschließende DNA-Polymerisation dient die sogenannte Primerhybridisierung (Annealing). Bei ca. 50-70°C, abhängig von den Basen und der Länge der jeweiligen Primer, binden die erstellten Oligonukleotide (Primer) an die DNA. Diese sind komplementär zu den 5`Enden der jeweiligen Einzelstränge der DNA und bilden somit den Rahmen für die DNA-Polymerase. Die folgende Extension erfolgt unter Zugabe von dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphaten) bei ca. 72°C. Somit werden aus den jeweiligen Einzelsträngen wiederum Doppelstränge synthetisiert.

2.6.2 RNA- Isolierung

Die RNA Isolierung wurde mittels eines Kits durchgeführt (All Prep DNA/RNA Mini Kit Catalog no. 80204). Hierzu wurden die Zelllinien unter den üblichen Bedingungen kultiviert, mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Nach dem Ablösen aller Zellen wurde die Reaktion mit Medium gestoppt, das Suspensat für 5 min zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Die Auflösung der Zellstruktur erfolgte über die Zugabe des RLT Plus Puffers. Die Aufreinigung der RNA wurde in mehreren Schritten gemäß des Qiagen Protokolls durchgeführt. Nach Auswaschung mit RNase freiem Wasser, wurde die RNA Konzentration mittels eines Spektrophotometers (NanoDrop 2000c) gemessen und bei -80° aufbewahrt.

2.6.3. cDNA Synthese

Nach der vollständigen RNA Isolation erfolgte die Umschreibung durch ein Reverse Transkriptase KIT (Takara Prime Script RT Kit). Für die Erstellung der cDNA werden verschiedene Bausteine benötigt. Oligodesoxyribonukleotide binden in Kombination mit Primern an komplementäre Stellen der RNA und bilden die Grundlage für die Reverse Transkriptase. Die Reverse Transkriptase schreibt bei 85° mit dNTPs die RNA in cDNA um.

2.6.4 Primer für die RT PCR

Das Entwerfen der Primer erfolgte über das Primer Design Pubmed auf der Grundlage der zu untersuchenden Gensequenz.

Gen	Nummer	Sequenz (5'-3')	Produktlänge (BP)
ErbB2	NM_017003.2	forw TCAGAGACCTGCTTTGGATCG reve GTCAGCGGCTCCACTAACTC	386
ErbB2	NM_017003.2	forw CGAGTGTCAGCCTCAAAACA reve AGCACCTTCACCTTCCTTAGC	483

Tabelle 11 Primer für Mutationsanalyse im ErbB2 Gen

2.6.5 Auftrennung mittels Agarosegel

Die Größenauftrennung der einzelnen DNA-Stränge erfolgte mittels der Agarose Gelelektrophorese. Durch die negative Ladung der DNA-Stränge trennen sich die einzelnen Stränge nach Größe und Ladung auf, wobei DNA-Stränge geringerer Größe schneller zur positiv geladenen Anode wandern. Die Agarose bildet Quervernetzungen und dient somit als Hindernis für die wandernden Moleküle. Durch die Verwendung von Markern lassen sich die entstandenen Banden ihrer Größe nach zuordnen.

2.7. Zellkulturversuchsaufbauten

2.7.1. Simulation von oxidativem Stress durch H_2O_2 in RT4D6P2T und RN22 Zellen

Beide Schwannomzelllinien wurden am gleichen Tag ausgesät und parallel, wie folgend beschrieben, behandelt. Insgesamt wurden für jede der beiden Zelllinien 4 Proben sowie eine unbehandelte Kontrolle ausgesät. 12 Stunden nach der Aussaat erfolgte die Behandlung mit H_2O_2 (Probe 1/3 $200\mu M$, Probe 2/4 $500\mu M$). Probe 1 ($200\mu M$) und Probe 2 ($500\mu M$) wurden 18h nach Aussaat bzw. 6h nach Behandlung lysiert. Die Lyse der Probe 3 ($200\mu M$), Probe 4 ($500\mu M$) sowie der unbehandelten Kontrolle wurde 36h nach Aussaat bzw. 6h nach Behandlung durchgeführt.

Die Kultivierung verlief unter den beschriebenen Bedingungen.

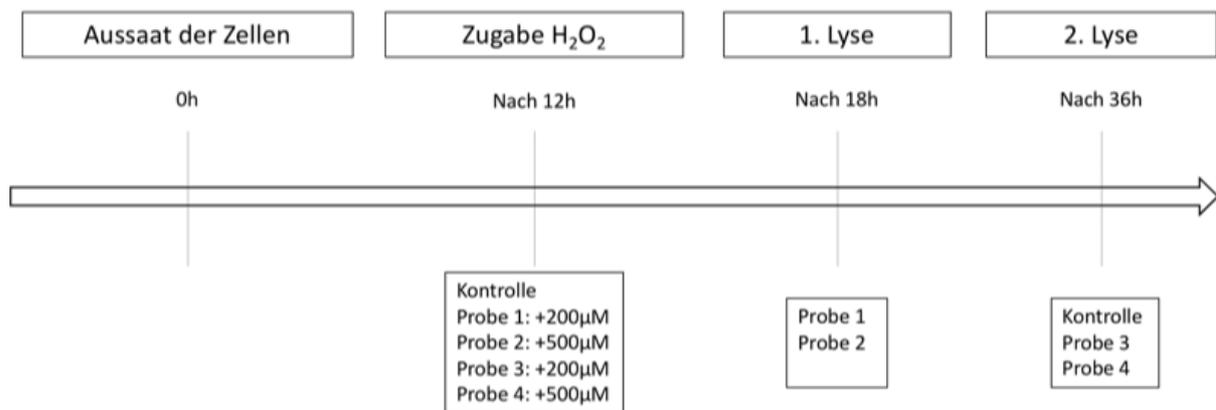


Abbildung 7 Chronologische Darstellung der Simulation von oxidativem Stress mit H_2O_2 an den Zelllinien RT4D6P2T und RN22 Exemplarisch für eine Zelllinie 0h: Aussaat von 4 Proben sowie eine unbehandelte Kontrolle, nach 12h: Behandlung von 2 Proben mit $200\mu M$ bzw. $500\mu M$, 18h: Lyse je eine Probe mit 200 bzw. $500\mu M$, 36h Lyse der anderen beiden Proben mit 200 bzw. $500\mu M$ sowie der unbehandelten Kontrolle

2.7.2. Inhibition der PI3K und MAPK in RT4D6P2T und RN22 Zellen

Die Zellen wurden 12 Stunden vor Behandlungsbeginn ausgesät und mit 1% FCS unter den standardisierten Bedingungen kultiviert. Auch unter der Behandlung enthielt das Medium 1% FCS. Für eine bessere Beurteilbarkeit wurde eine Kontrolle mit 10% FCS und 1% FCS ausgesät. Die Inhibition der PI3K erfolgte mittels LY294002 in der Konzentration 20µM über 48 Stunden, wobei der Inhibitor nach 24 Stunden erneuert wurde, um einen konstanten Wirkspiegel zu gewährleisten. Das Versuchsdesign wurde analog für die MAPK durchgeführt, wobei die Substanz PD98059 in der Konzentration 50µM verwendet wurde.

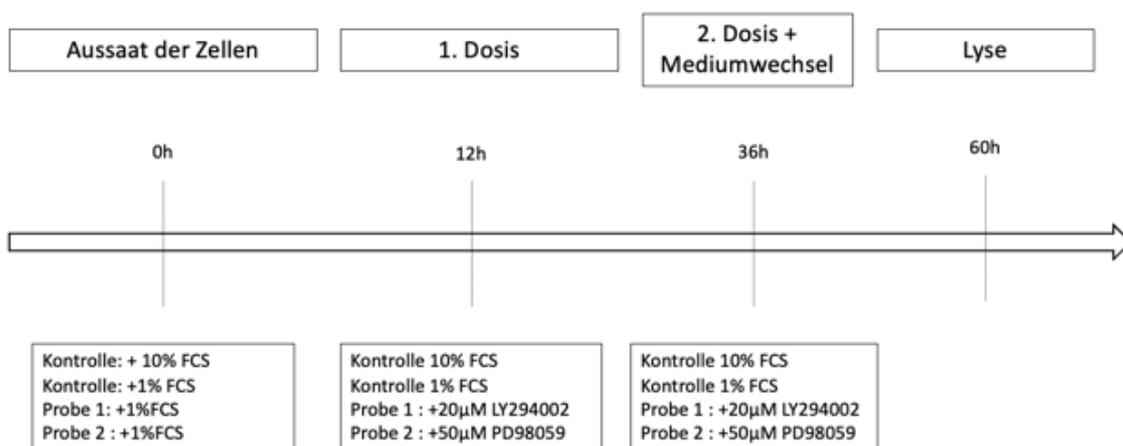


Abbildung 8 Ablauf der PI3K und MAPK Inhibition mit LY294002 und PD98059 Exemplarisch für eine Zelllinie: 0h: Aussaat der zwei Kontrollen 10%FCS/1%FCS sowie der Probe 1/2, 12h: Zugabe von 20µM LY294002 zu Probe 1 und 50µM PD98059 zu Probe 2, 36h: Mediumwechsel in den zwei Kontrollen sowie Erneuerung der Dosierung von Probe 1 und 2, 60h Lyse der zwei Kontrolle sowie der zwei Proben

2.7.3. Inhibition der ALDH1 mit/ ohne Simulation von oxidativem Stress durch H₂O₂

Um den möglichen Effekt einer ALDH1 Inhibition auf die Proliferation bzw. Vitalität in den Zelllinien beurteilen zu können, wurden die Proben mit DEAB in den Konzentrationen 200µM und 300µM und DSF 2µM und 3µM über 24h behandelt, nachdem sie zuvor 24h ohne Behandlung am Nährboden anwachsen konnten. 29 Stunden nach Aussäen der restlichen Proben wurde eine Proliferationskontrolle in den Versuch eingefügt, um einen möglichen Proliferationsstopp durch ALDH1-Inhibition erkennen zu können. Der Zeitraum der Proliferationskontrolle bis zur Lyse war somit identisch zu den Proben von ihrer Aussaat bis zum Behandlungsbeginn. Nach 48h wurden die Hälfte der Proben zusätzlich mit H₂O₂

behandelt, um eine höhere Vulnerabilität der Zellen mit ALDH1 Inhibition gegenüber oxidativem Stress zu sehen.

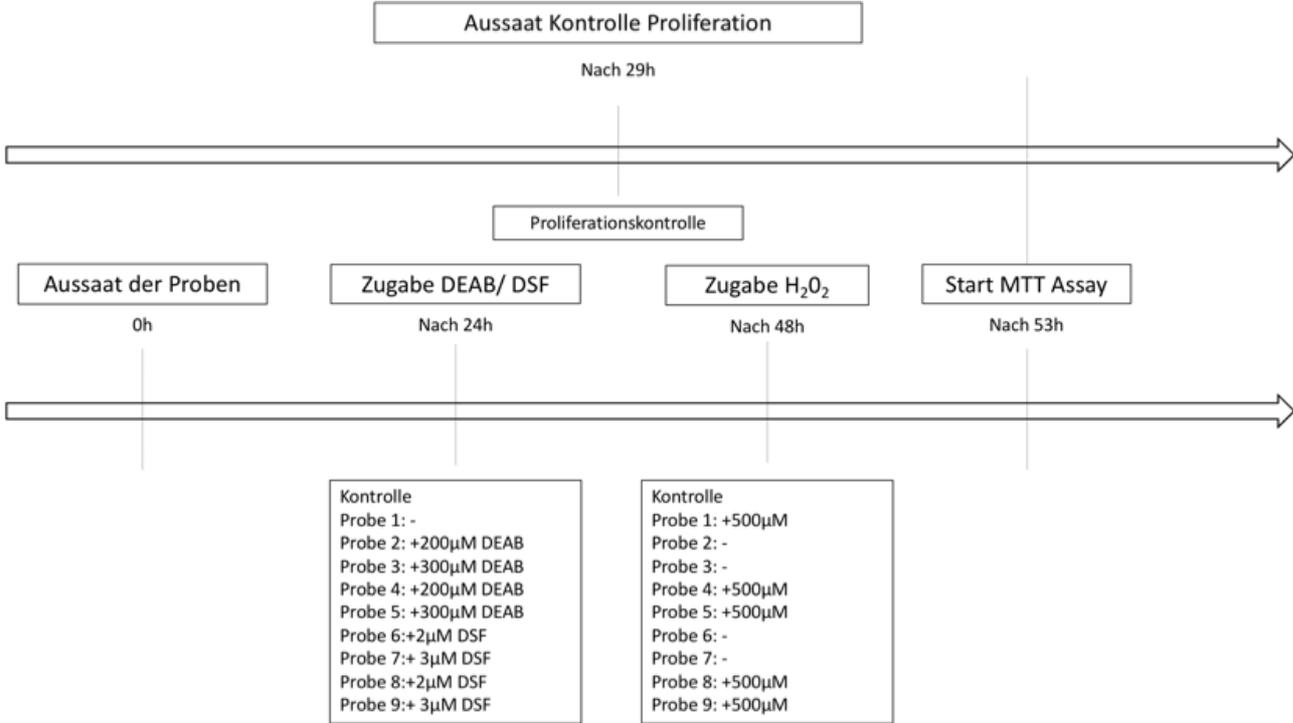


Abbildung 9: Schematische Darstellung der ALDH1 Inhibition mit DEAB/ DSF in Kombination mit H₂O₂ in RT4D6P2T und RN22 Zellen, Oberer Zeitstrahl Aussaat der Proliferationskontrolle 29h nach Aussaat der Probe, Unterer Zeitstrahl: 0h Aussaat der Proben, 24h: Zugabe DEAB und DSF, 48h: Zugabe von H₂O₂ zu einem Teil der Proben, 53h: Start des MTT Assays aller Proben, der Kontrolle sowie der Proliferationskontrolle

3. Ergebnisse

3.1. ALDH1A1 und ALDH1A3 Expression in Schwannomen und Schwannomzelllinien

Bei allen positiven Proben war die immunhistochemische Reaktion für ALDH1 im Zytosol lokalisiert. In allen Schwannomen und Neurofibromen konnte eine starke Färbung von ALDH1 nachgewiesen werden.

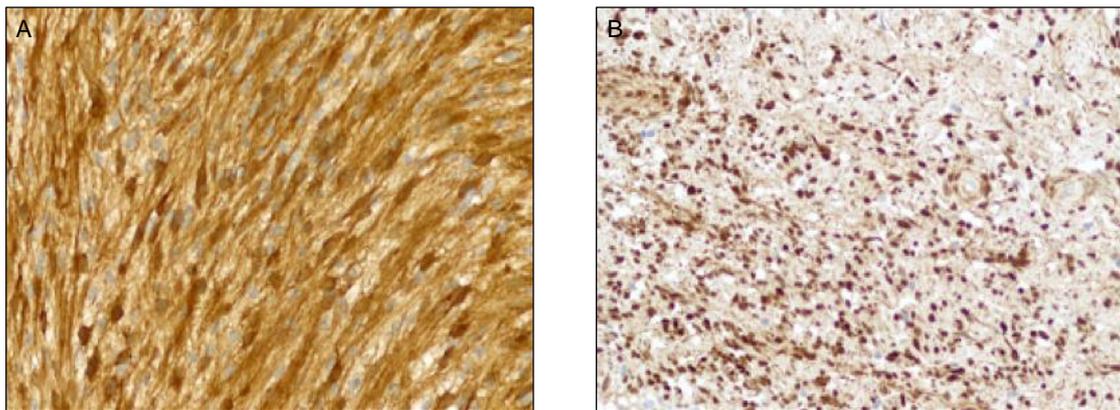


Abbildung 10 A: ALDH1- Expression in Schwannome und in B: ALDH1-Expression in Neurofibromen, aus (Liesche et al., 2019)

Sowohl die physiologischen Schwann-Zellen als auch die traumatischen Neurome und das Morton- Neurom zeigten eine ausgeprägte Expression von ALDH1 (IRS12). Alle Schwann-Zellen und Schwann-Zelltumore waren außerdem positiv für S100.

Die malignen peripheren Nervenscheidentumore (MPNSTs) zeigten dagegen eine stärkere Verteilung des IRS Scores 2-6. Dennoch waren alle positiv für ALDH1. Eine Probe der MPNST war fast vollständig negativ für S100 mit nur vereinzelt positiven Zellen, obwohl eine starke Expression von ALDH1 vorhanden war.

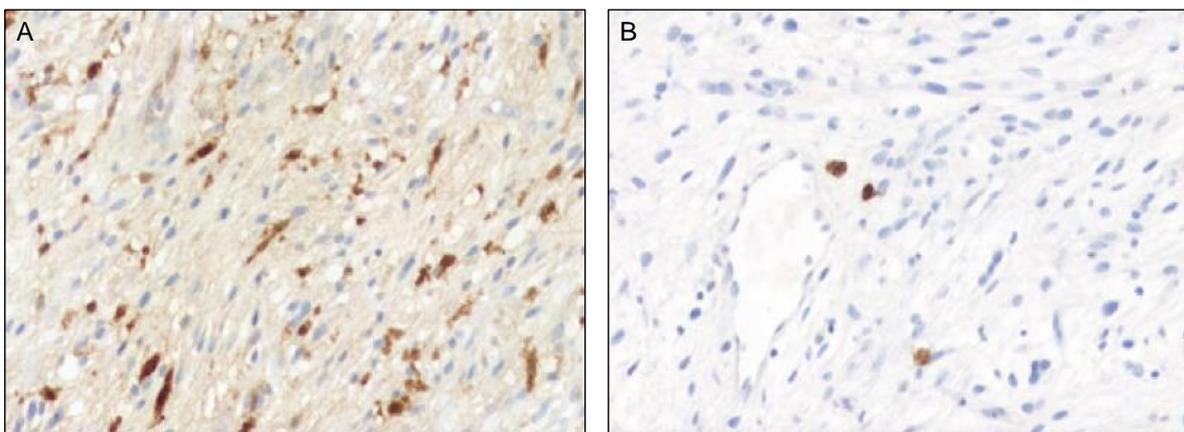


Abbildung 11 MPNST: A: Überwiegende Expression ALDH1 B: Vereinzelt positive Zellen für S10, aus (Liesche et al., 2019)

Sowohl die Meningeome, das Leiomyosarkom, als auch der gastrointestinale stromale Tumor waren negativ für ALDH1 (IRS 0). Lediglich endotheliale Zellen und Makrophagen zeigten eine positive ALDH1 Immunreaktion.

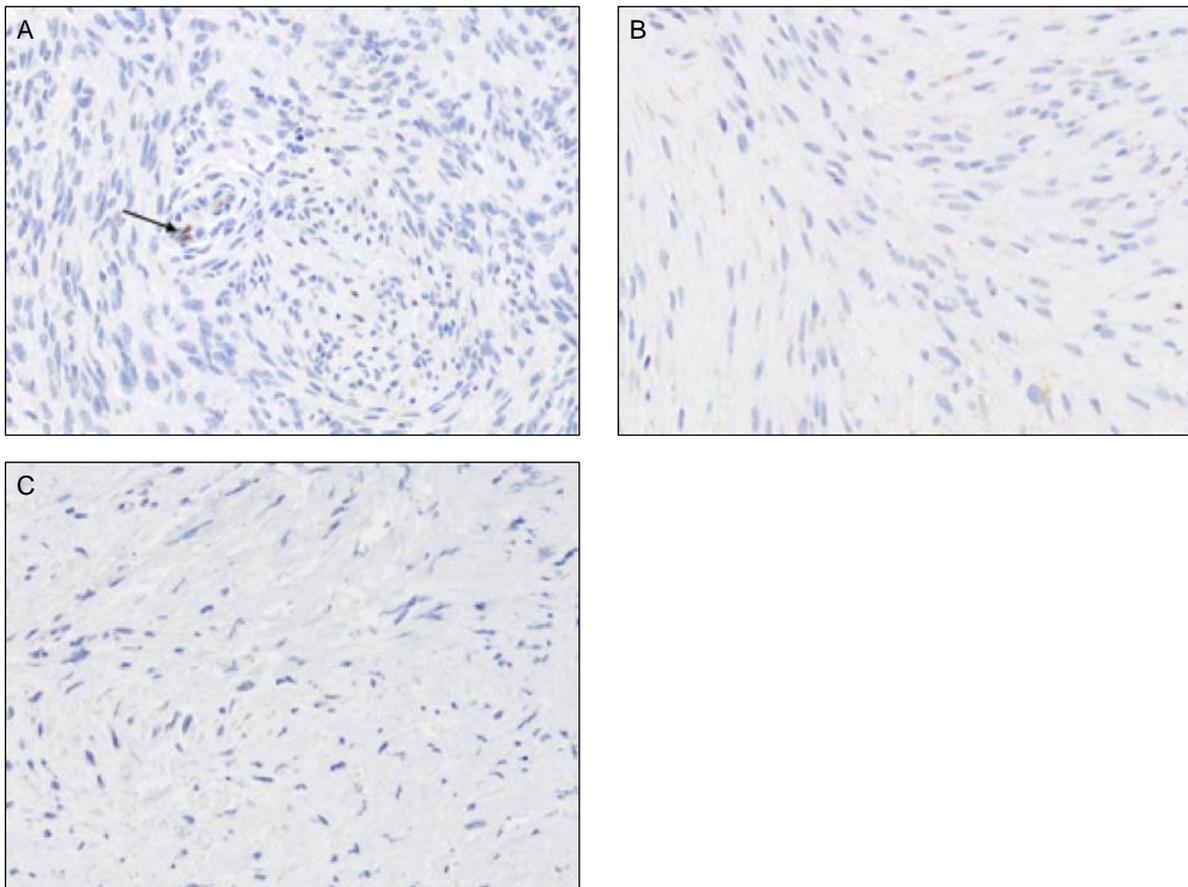


Abbildung 12 A: Keine ALDH1 Immunreaktion in Meningeomen B: Auch für GIST keine positive ALDH1 Reaktion C: Kein Nachweis von ALDH1 in Leiomyosarkomen, aus (Liesche et al., 2019)

Die Schwannome zeigten sowohl eine starke Expression von ALDH1A1 und ALDH1A3.

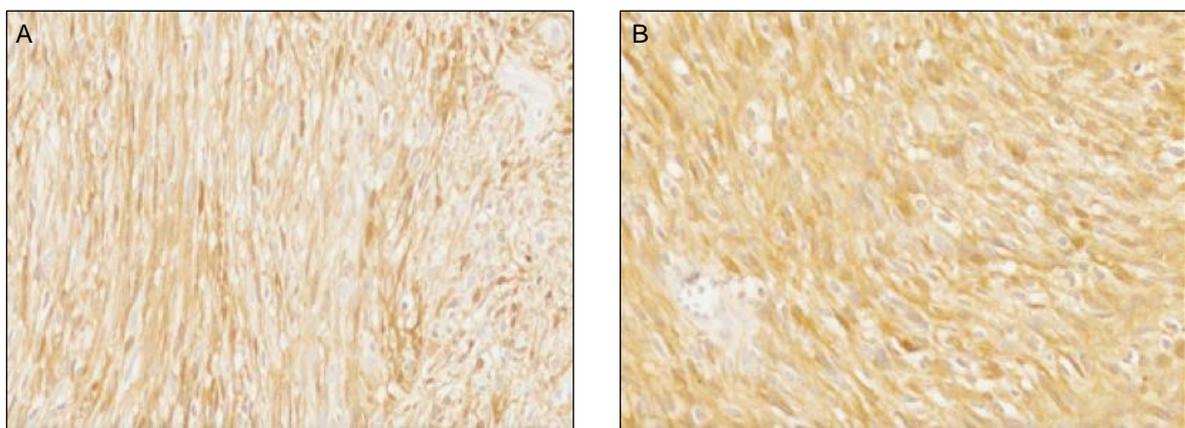


Abbildung 13 A: Expression von ALDH1A1 in Schwannom B: Expression von ALDH1A3 in Schwannome, aus (Liesche et al., 2019)

Gewebe/Tumorentität	Nachweis von ALDH1 im Zytoplasma	IRS (Verteilung)	Mittelwert
Schwannome, WHO-Grad I	56/56 (100%)	12 (12-12)	
– Vestibularisschwannome	19/19 (100%)	12 (12-12)	
– Spinale Schwannome	30/30 (100%)	12 (12-12)	
– Periphere Schwannome	7/7 (100%)	12 (12-12)	
Neurofibrome, WHO-Grad I	5/5 (100%)	12 (12-12)	
MPNST	6/6 (100%)	4 (2-6)	
Meningeome	0/15 (0%)	0 (0-0)	
– WHO-Grad I	0/6 (0%)	0 (0-0)	
– WHO-Grad II	0/7 (0%)	0 (0-0)	
– WHO-Grad III	0/2 (0%)	0 (0-0)	
GIST	0/1 (0%)	0 (0-0)	
Leiomyosarkome	0/1 (0%)	0 (0-0)	
Periphere Nerven	Schwann-Zellen: 4/4 (100%)	Schwann- Zellen: 12 (12-12)	
Traumatische Neurom	Schwann-Zellen: 2/2 (100%)	Schwann-Zellen: 12 (12-12)	
Morton-Neurom	Schwann-Zellen: 1/1 (100%)	Schwann-Zellen: 12 (12-12)	

Tabelle 12 Immunhistochemische Positivität und der mittlere IRS Score, modifiziert aus (Liesche et al., 2019)

3.2. Effekt von oxidativem Stress auf die ALDH1A3 Expression

An der Zelllinie RT4D6P2T zeigte sich durch die Simulation von oxidativem Stress eine Regulation des ALDH1A3 Levels. Vinculin als Proteinquantitätskontrolle war bei allen Proben auf dem gleichen Level. Das ALDH1A3 Level unterschied sich zwischen der Kontrolle von dem der H₂O₂ behandelten Zellen. Nach 6h mit 200µM war kein signifikanter Anstieg zu sehen, erst durch die Erhöhung der Konzentration auf 500µM ließ sich der ALDH1A3 Spiegel beeinflussen. Ein besonders großer Anstieg war bei der Behandlung mit 200µM über 24h zu sehen.

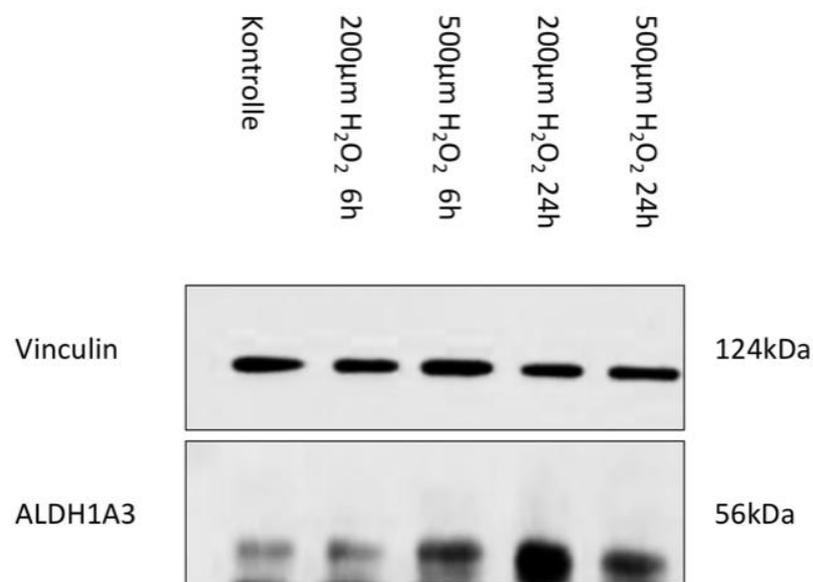


Abbildung 14 ALDH1A3 Expression in RT4D6P2T Zellen unter Simulation von oxidativem Stress mittels H₂O₂. Anordnung der Proben von links nach rechts: 1. Kontrolle 2. 200µM H₂O₂ über 6h 3. 500µM H₂O₂ über 6h 4. 200µM H₂O₂ über 24h 5. 500µM über 24h

Auch in der RN22 Zelllinie zeigte sich eine Dynamik in der ALDH1A3-Expression abhängig von der H₂O₂ Konzentration und Behandlungsdauer. Es ergibt sich die Tendenz, dass insbesondere die Behandlungsdauer von 24h sowohl mit 200µM als auch mit 500µM zu einer gesteigerten ALDH1A3 Expression führt. Lediglich die Kontrollgruppe fällt aus dem Muster der Dynamik. Hier zeigten sich ähnlich hohe Level, wie in den behandelten Zellen über 24h. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zelllinien ein ähnliches Verhalten in der ALDH1A3 Expression zeigen.

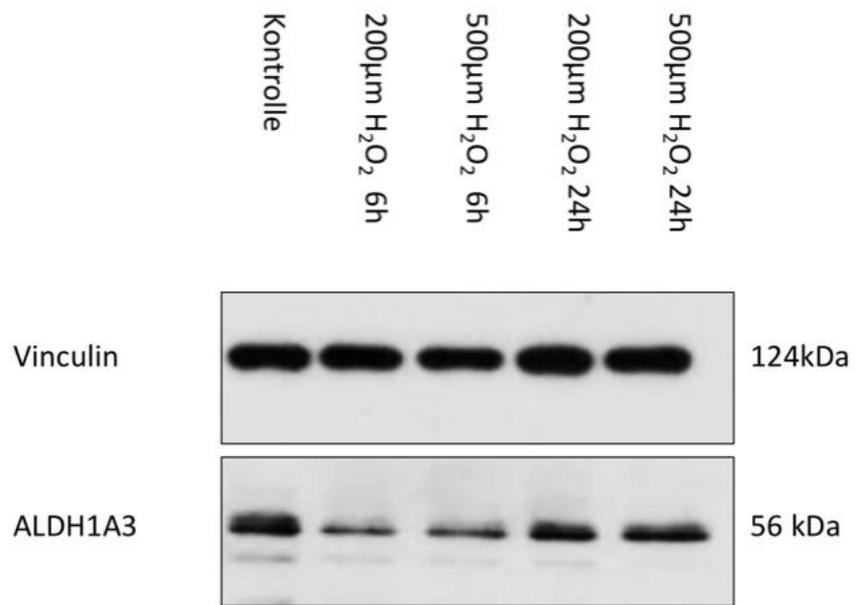


Abbildung 15 ALDH1A3 Expression in RN22 unter H₂O₂ mit 200 μM/500 μM über 6h/24h

3.3. Effekt von oxidativem Stress auf die Expression von NAB2

Exemplarisch wurde an der Zelllinie RT4D6P2T die Simulation von oxidativem Stress durch H_2O_2 durchgeführt. Dabei fiel auf, dass die NAB2 Expression durch die Zugabe von H_2O_2 nach unten reguliert bzw. niedriger exprimiert wurde. Unter der niedrigeren Konzentration von $200\mu M$ über 6h konnte noch kein signifikanter Effekt erzielt werden, erst durch die höhere Konzentration von $500\mu M$ ergab sich ein Abfall der Proteinkonzentration. Die tiefere Konzentration von $200\mu M$ erzielt erst bei längerer Inkubation über 24h einen Effekt. Der Unterschied zwischen $200\mu M$ und $500\mu M$ über 24h ist marginal. Es lässt sich jedoch ein Trend feststellen, dass die Zugabe von oxidativem Stress die Expression von NAB2 negativ beeinflusst. In der RN22 ließen sich keine stringenten Ergebnisse reproduzieren.

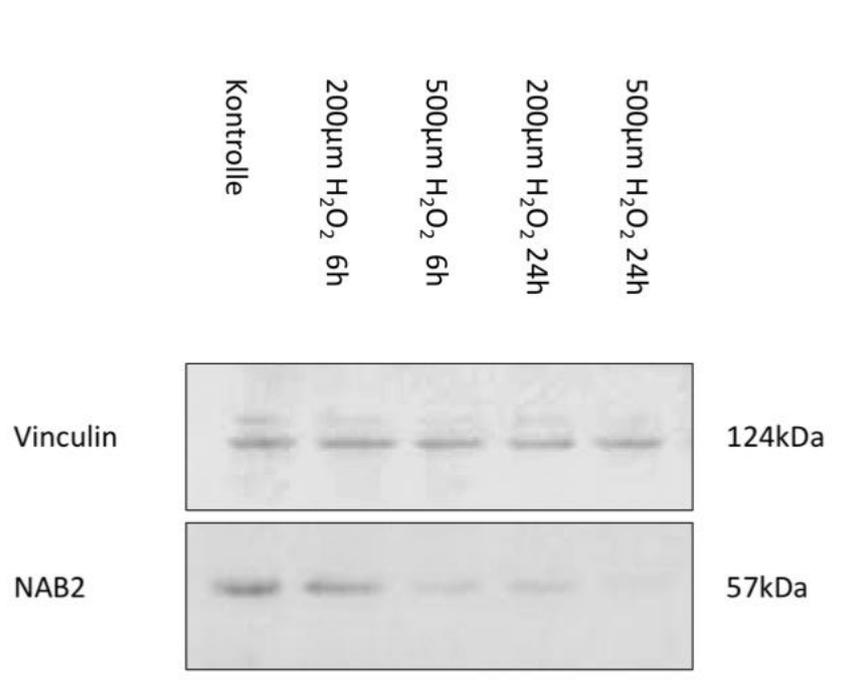


Abbildung 16 NAB2 Expression in RT4D6P2T unter H_2O_2 mit $200\mu M/500\mu M$ über 6h/24h

3.4. Morphologie von Schwannomzelllinien unter ALDH1 Inhibition und Zugabe von oxidativem Stress

In der RT4D6P2T Kontrollgruppe bildeten die Zellen ein monomorphes Zellbild mit hoher Konfluenz. Die Zellen standen über spindelförmige Ausläufer miteinander in Kontakt. Nach der Zugabe von H_2O_2 reduzierte sich die Konfluenz der Zellen, nicht jedoch deren Morphologie, sie behielten ihre polygonale Form mit spindelförmigen Ausläufern. Unter der Behandlung mit DEAB ließ sich eine Wachstumshemmung beobachten. Über den Zeitraum von 24h kam es unter der höheren Dosierung mit $300\mu\text{M}$ zu keiner Zunahme der Konfluenz. Als Referenzwert galt eine RT4D6P2T Proliferationskontrolle. Diese wurde 29h später als die übrigen Proben mit der gleichen Zellzahl ausgesät (Abbildung 9). Diese sollte den Zeitraum von der Aussaat der Proben bis zum Behandlungsbeginn darstellen.

Unter der Kombination von 24-stündiger ALDH1 Inhibition mit darauffolgender Simulation von oxidativem Stress mit $500\mu\text{M}$ H_2O_2 über 5h waren nur einzelne vitale Zellen zu beobachten.

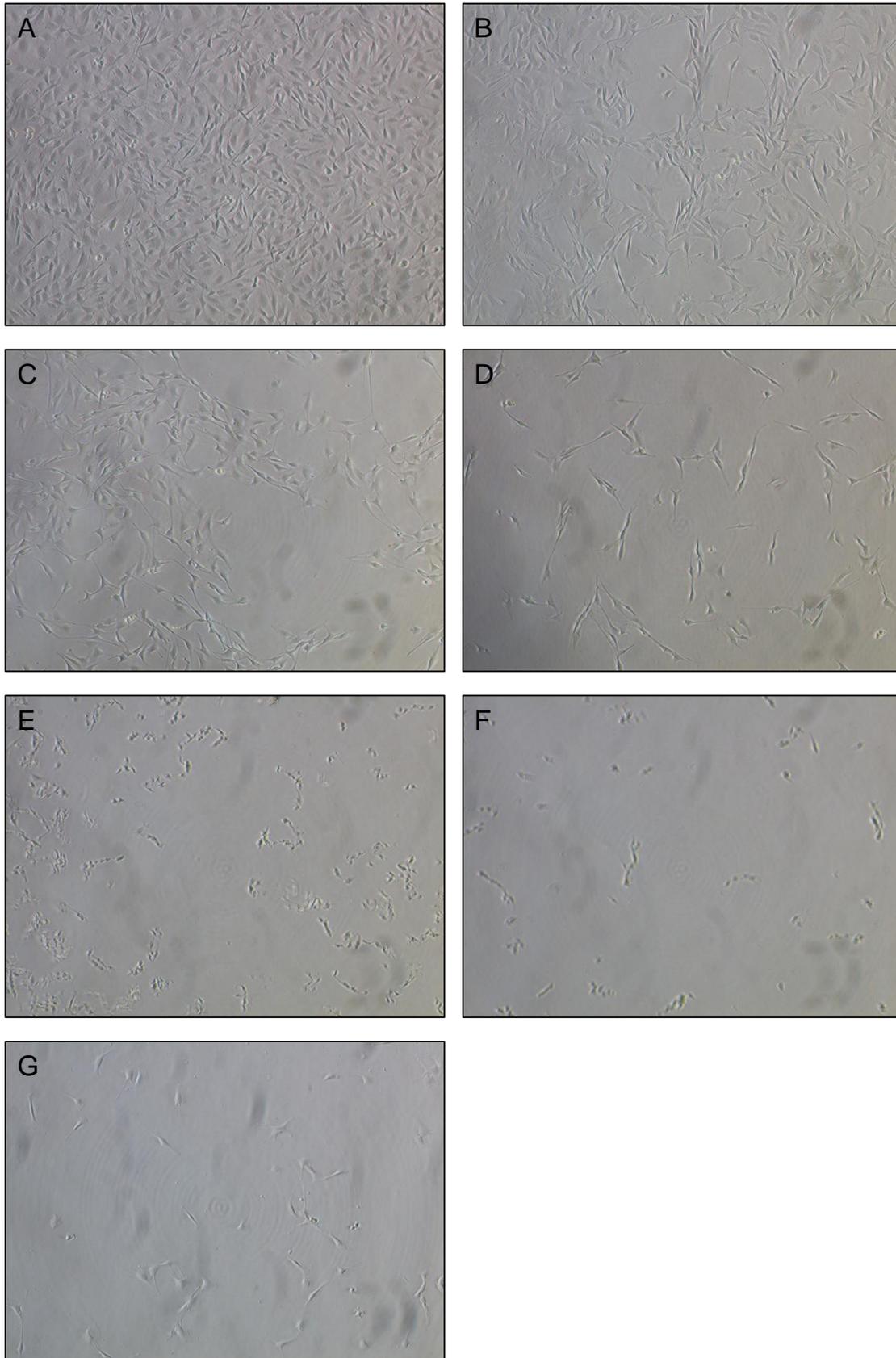


Abbildung 17 Morphologische Aspekte der RT4D6P2T Zelllinie unter der alleinigen Zugabe des ALDH1 Inhibitors (DEAB) oder in Kombination mit 500 μ M Wasserstoffperoxid (H_2O_2) **A:** Kontrolle **B:** 500 μ M H_2O_2 **C:** 200 μ M DEAB **D:** 300 μ M DEAB **E:** 200 μ M DEAB+ 500 μ M H_2O_2 **F:** 300 μ M DEAB+500 μ M H_2O_2 **G:** Proliferationskontrolle (vgl. 2.7.3. Inhibition der ALDH1 mit/ ohne Simulation von oxidativem Stress durch H_2O_2)

Auch die RN22 Zelllinie zeigte in der Kontrollgruppe eine hohe Konfluenz, bei ihnen war unter oxidativem Stress mit H_2O_2 eine Reduktion der Konfluenz zu sehen. Die übrigen Zellen bildeten gruppierte Strukturen, die kapillarähnlich miteinander in Verbindung standen. Unter ALDH1-Inhibition ließ sich ebenfalls eine Wachstumshemmung beobachten. Im Vergleich zur Proliferationskontrolle war jedoch eine höhere Zellzahl/Konfluenz zu sehen. Unter der Kombination aus ALDH1A3 Inhibition und oxidativem Stress reduzierte sich Vitalität der Zellen zwar, es waren jedoch noch kapillare Verbände aus vitalen Zellen zu beobachten.

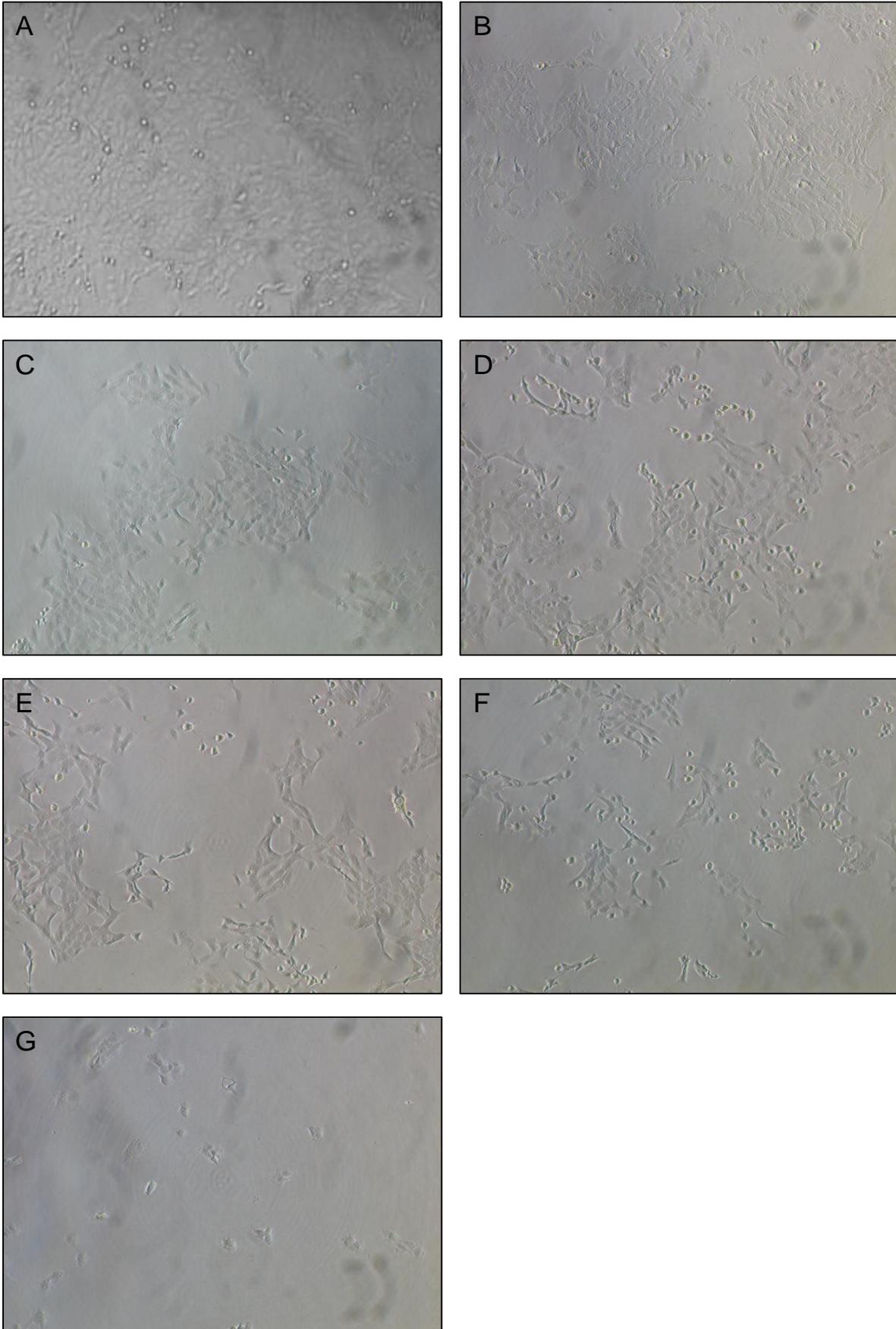


Abbildung 18 Morphologische Aspekte der RN22 Zelllinie unter der alleinigen Zugabe des ALDH1A3 Inhibitors (DEAB) oder in Kombination mit 500μM Wasserstoffperoxid (H₂O₂) **A:** Kontrolle **B:** 500μM H₂O₂ **C:** 200μM DEAB **D:** 300μM DEAB **E:** 200μM

DEAB+ 500µM H₂O₂ F: 300µM DEAB+500µM H₂O₂ G: Proliferationskontrolle(vgl. 2.7.3. Inhibition der ALDH1 mit/ ohne Simulation von oxidativem Stress durch H₂O₂)

3.5. ErbB2 Mutation in RN22 und RT4D6P2T Schwannomzelllinien

In der sequenziellen Analyse konnte in der RN22 Zelllinie eine Mutation in der ErbB2 Rezeptor codierenden Sequenz nachgewiesen werden: c.2012T>A. Hierdurch wird ein Glutamat anstelle eines Valins codiert.

Auch in der RT4D6P2T Schwannomzelllinie zeigt die Punktmutation an der gleichen Stelle.

Zelllinie	DNA-Sequenz
RT4D6P2T	5'-3' ATTGCAACTGTAG AGGG CGTC
RN22	5'-3' ATTGCAACTGTAG AGGG CGTC

Tabelle 13: Sequenzanalyse ErbB2-Gens

3.6. Morphologie von Schwannomzelllinien unter PIK3K, MAPKK, und EGFR Inhibitoren

In der RT4D6P2T Zelllinie zeigten sich bezüglich Konfluenz und Morphologie keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe mit DMSO und ohne DMSO. Es ergibt sich ein Bild von polygonalen, monomorphen länglichen Zellen, welche über lange spindelförmige Ausläufer miteinander in Verbindung stehen. Unter Behandlung mit LY294002 zeigte sich eine reduzierte Viabilität und Konfluenz der Zellen. Morphologisch stehen die einzelnen Zellen weiterhin über lange Ausläufer in Kontakt. Die Zellkorpus ist verkleinert und aufgeheilt. Unter Zugabe von PD98059 sind viele tote Zellen zu sehen, welche keinen Kontakt mehr zum Nährboden haben. Die lebenden Zellen bilden ebenfalls Ausläufer, wobei jedoch auffällt, dass diese kürzer und kompakter sind.

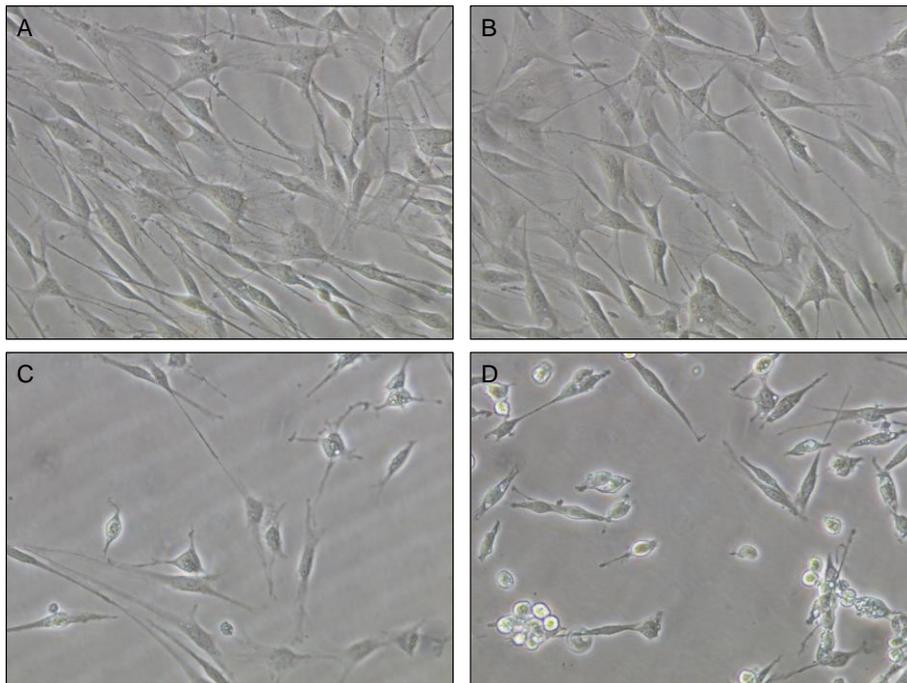


Abbildung 19 Morphologische Aspekte der Zelllinie RT4D6P2T unter Einfluss des PI3K Inhibitors (LY294002) und des MAPK-Inhibitors (PD98059) A: Kontrolle 1% FCS B: 1%FCS DMSO C: LY 20µM 72h D: 50µM PD 72h

Die RN22 Zelllinie zeigte in den beiden Kontrollen mit und ohne DMSO Zugabe eine hohe Konfluenz. Die Zellen bilden ein typisches Monolayer. Viele intrazytoplasmatische granuläre Zelleinschlüsse charakterisieren das Zellbild. Unter der Zugabe von LY294002 reduziert sich die Konfluenz und Viabilität. Die Zellen bilden Verbindungen über kapillarähnliche Strukturen. Die Granulierung des Zytoplasmas scheint reduziert zu sein. Unter der Behandlung mit PD98059 ergibt sich eine ähnliche Charakteristik.

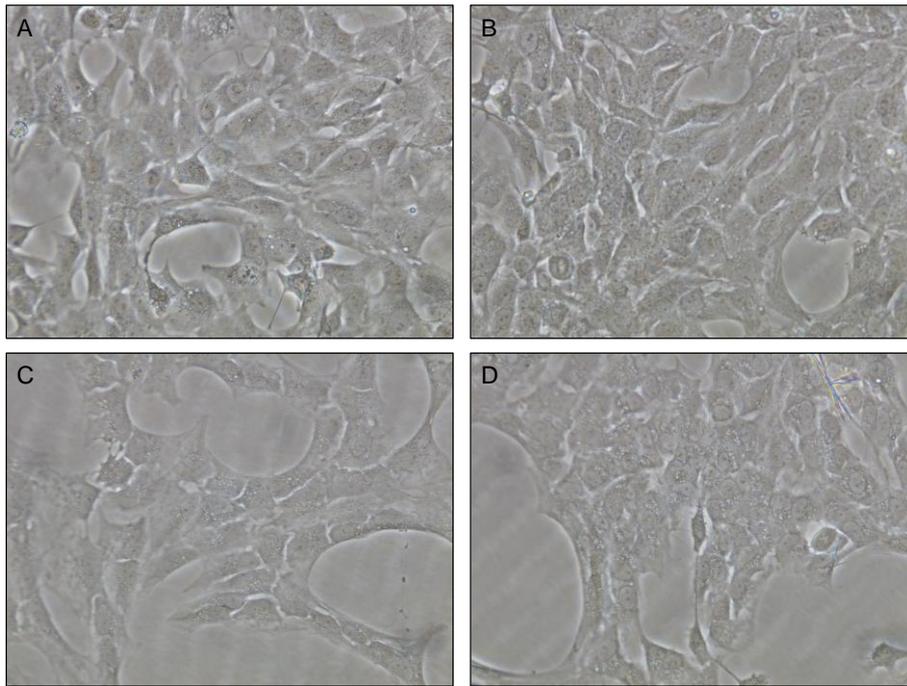


Abbildung 20: Morphologische Aspekte der RN22 Zelllinie unter Einfluss des PI3K Inhibitors (LY294002) und des MAPK-Inhibitors (PD98059) A Kontrolle + 1%FCS ohne DMSO B: Kontrolle + 1%FCS mit DMSO C: LY 20 μ M 72h D: 50 μ M PD 72h

3.7. Viabilitätsmessungen Schwannomzelllinien

3.7.1 Effekte von ALDH1 Inhibition

Wie zu erwarten, zeigten die Zellen ohne Behandlung die größte optische Dichte (OD). Die Zellen mit 200 μ M und 300 μ M DEAB wiesen eine deutlich reduzierte OD im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Auffällig war jedoch der Vergleich zwischen der Proliferationskontrolle (vgl. Abbildung 9) und der Probe mit 300 μ M DEAB Behandlung, bei denen nur minimale Unterschiede nachgewiesen werden konnten. Mikroskopisch zeigten die behandelten Zellen jedoch keinen Verlust in ihrer Vitalität, sondern lediglich in ihrer Konfluenz. Auch unter der Behandlung mit DSF zeigte sich eine Reduktion der OD. Korrelierend zu den mikroskopischen Beobachtungen fiel der Effekt verglichen zu DEAB geringer aus. Dabei sei zu erwähnen, dass DEAB spezifischer ALDH1 inhibiert als DSF.

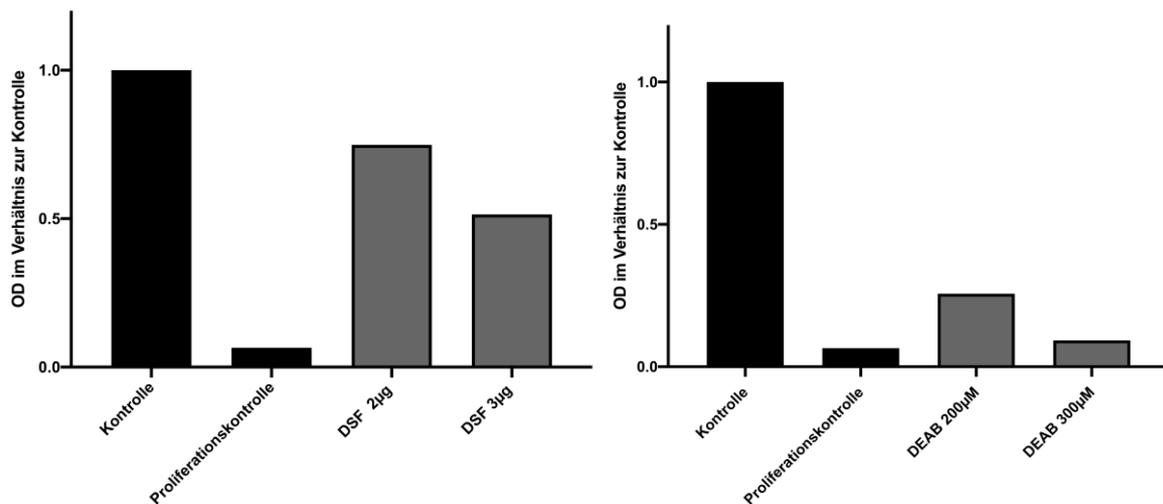
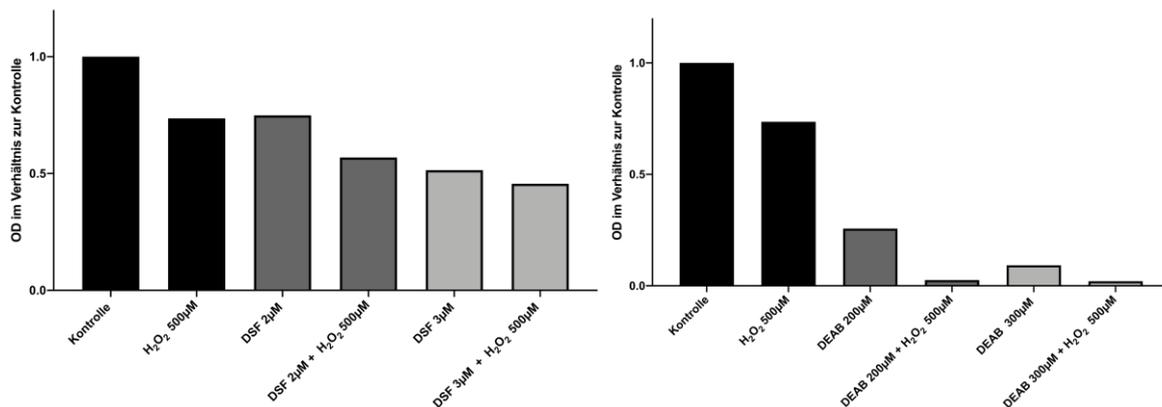


Abbildung 21 Effekte der ALDH1 Inhibition mittels DEAB und DSF

Das oben beschriebenes Experiment wurde analog für die RN22 Zelllinie durchgeführt. Nach dreimaligem Wiederholen des Versuchs ließen sich keine stringenten Effekte nachweisen. Mögliche Effekte auf das Wachstum ließen sich hier nicht bestätigen.

3.7.2 Effekte aus Kombination von ALDH1Inhibition und oxidativem Stress.

In diesem Kapitel werden zusätzlich Proben aufgeführt, in denen oxidativer Stress durch H_2O_2 simuliert wurde. Die Proben wurden ebenfalls 24h vor der Behandlung ausgesät. Nach 24h erfolgte die Behandlung mit einem der ALDH Inhibitoren. Zusätzlich zu dem Inhibitor wurde nach 24h H_2O_2 500 μ M für 5 h beigefügt. Anschließend wurde ein MTT Assay durchgeführt. Ziel des Experimentes war es die Zellen durch Inhibition der ALDH sensibler für oxidativem Stress zu machen. Unter der Behandlung mit DEAB und H_2O_2 zeigten sich zum Zeitpunkt der Messung kaum noch vitale Zellen, wie mikroskopisch bereits sichtbar. Der Effekt unter DSF in Kombination mit H_2O_2 fällt geringer aus. Es gilt allerdings zu beachten, dass die Ausgangswerte für die Zellzahl aufgrund des fehlenden Wachstums zum Zeitpunkt des H_2O_2 Beginn zwischen der Kontrollgruppe und den Proben mit vorangegangener ALDH Inhibition nicht identisch waren.



Auch hier ließen sich für die RN22 Zellen aussagekräftigen Daten sammeln. Die Reaktion auf H_2O_2 allein und in Kombination mit Inhibitor fielen geringer aus.

3.8. Einfluss des PI3K- und MAPK- Signalweges auf die ALDH1A3 Expression

Um die gleiche Proteinkonzentration in allen Proben zu garantieren, wurde Vinculin als Proteinladekontrolle mitbestimmt.

Die RT4D6P2T Schwannomzelllinie zeigte unter der Behandlung mit dem PI3K- Inhibitor LY294002 eine deutliche Reduktion des ALDH1A3 Levels. Die Zellen wurden hierfür über 48h mit einer Konzentration von 20 μ M behandelt. Nach 24h wurde das Medium einmalig gewechselt, um eine konstante Konzentration des Inhibitors zu gewährleisten. Auch unter Inhibition der MAPK zeigte sich eine Reduktion des ALDH1A3 Spiegels. Auch hier wurde das Medium nach 24h erneuert.

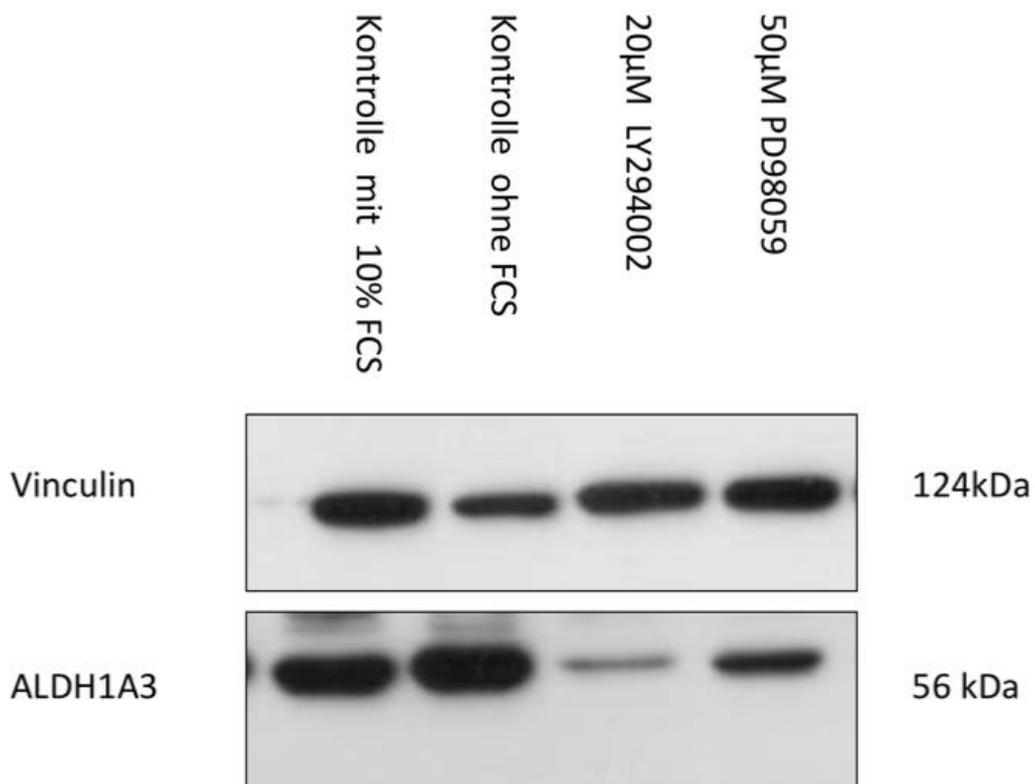


Abbildung 22 Effekte von LY294002 und PD98059 auf die Expression von ALDH1A3 in RT4D6P2T Zellen

Die Kontrolle der Behandlung erfolgte über die Proteinbestimmung von pAKT und pERK. Dabei stellt pAKT das Element unterhalb der PI3K im Signalweg dar. Durch die Inhibition der PI3K sollte AKT in ihrer nicht phosphorylierten/ aktivierten Form vorliegen. In der Western Blot Analyse zeigte sich unter der Behandlung mit LY294002 das Fehlen der pAKT Expression.

Das Protein pERK stellt analog zur pAKT das Element unter der MAPK dar und kann als Kontrollpunkt für die Wirksamkeit der Inhibition herangezogen werden. Das Level von pERK konnte gesenkt, jedoch nicht vollständig aufgehoben werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der RT4D6P2T Zelllinie sowohl durch PI3K- als auch durch MAPK-Inhibition der ALDH1A3 Level negativ beeinflusst werden konnte.

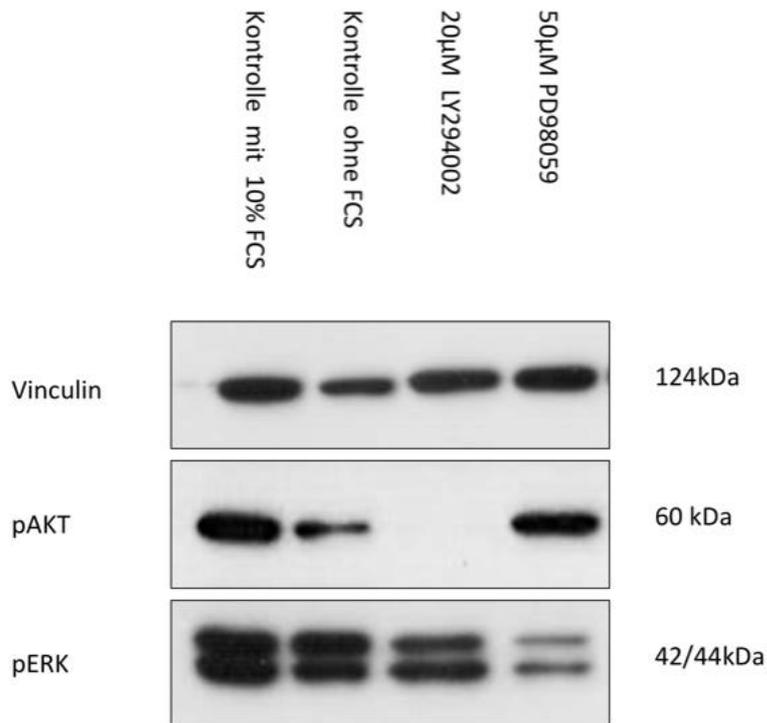


Abbildung 23 Effekte von LY294002 und PD98059 auf die Expression von pAKT und pERK in RT4D6P2T Zellen

In der RN22 Zelllinie konnten keine stringenten Effekten beobachtet werden. Eine valide Inhibition des PI3K Signalweges oder MAPK Signalweges konnte nicht erzielt werden. Eine Aussage bezüglich des Zusammenhangs der beiden Signalwege mit der ALDH1A3 Expression in RN22 Schwannomzellen kann somit auf Basis der Daten nicht getroffen werden.

4. Diskussion

Durch Myelinisierung sowie die Aufrechterhaltung und Regeneration von Axonen der peripheren Nerven benötigen Schwann-Zellen einen hohen Metabolismus. Bei der Energiebereitstellung durch Mitochondrien entstehen „Reaktive Oxidative Sauerstoffspezies“. Der daraus entstehende oxidative Stress führt zu Entstehung von Aldehyden, welche ein toxisches Potential für die Zellen besitzen. Für deren Detoxifizierung ist die Enzymgruppe der Aldehyddehydrogenasen von entscheidender Bedeutung. Durch ihren zusätzlichen Einfluss auf Differenzierungs- und Proliferationsprozesse haben sie in den letzten Jahren in der Tumorforschung an Bedeutung gewonnen.

Bisher ist über die Regulation des Enzyms wenig bekannt (Poturnajova et al., 2021). Durch seine wachsende Bedeutung als Resistenzfaktor gegenüber Strahlung und Chemotherapie in Tumorzellen, wäre es von großem wissenschaftlichem Interesse mehr über die Regulation der Enzymgruppe herauszufinden. Als eine der Schlüsselsignalwege für Proliferation und Differenzierung gelten der PI3K- und MAPK Signalweg. Neben Schwann-Zellen haben diese auch in vielen malignen Tumoren, durch deren dysregulierende Mutationen, einen hohen Stellenwert und sind Gegenstand aktueller Forschung.

Ziel dieser Arbeit war es die ALDH1 Expression primär immunhistochemisch in Schwann-Zellen und Schwannomen nachzuweisen. Dabei sollten zwei Rattenschwannomzelllinien (RN22 und RT4D6P2T) als Modell für Forschungen über Regulationsprozesse in die Arbeit aufgenommen werden. Hierbei war zunächst der Plan die Enzymexpression der ALDH1 mittels oxidativen Stresses, simuliert durch H_2O_2 , zu beeinflussen, um dadurch die posttranskriptionelle Regulation besser zu verstehen. Dabei sollte sowohl das morphologische Verhalten, die Proliferation, Vitalität und die Enzymexpression der Zellen geprüft werden.

Um Hinweise auf die prätranskriptionelle Regulation zu sammeln, sollte der Einfluss des PI3K und MAPK ins Auge gefasst werden. Mittels Inhibition der Signalwege in der Zellkultur sollten besonders Effekte auf die Expression der ALDH1 erforscht werden.

4.1. ALDH1 Expression in nicht neoplastischen und neoplastischen Schwann-Zelltumoren

Aufgrund der histologischen Ähnlichkeit zwischen Schwannomen und anderen Spindelzellähnlichen Tumoren, wurde die Diagnose mittels des diagnostischen Markers S-100 gestellt. (Stefansson et al., 1982; Weiss et al., 1983)

Immunhistochemisch konnte eine ALDH1 Expression in 56/56 Schwannomen und 6/6 Schwann-Zellpräparaten nachgewiesen werden. In allen Fällen zeigte sich der Maximalwert von 12 im IRS Score. Dabei scheint die ALDH1 Immunoreaktivität stärker als die S-100 Reaktion zu sein. Auch die Endothelzellen der intratumoralen Kapillaren und Makrophagen zeigten eine positive ALDH1 Expression. Andere Tumorentitäten mit spindelförmiger Histologie wie fibroplastische Meningeome, Sarkome oder GIST waren negativ für ALDH1. Mit steigender Malignität scheinen Schwann-Zelltumore ihre ALDH1 Expression zu verlieren. Zwar konnte in den malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST) eine 100% ALDH1 Expression gezeigt werden, der IRS Score lag jedoch im Mittel nur bei 4. Manche der MPNSTs zeigten nur vereinzelte bis hin zu keinen positiven Zellen für S-100. Dies kann das Erkennen eines Schwann-Zellursprungs verhindern und erfordert somit eine ausgiebige Prüfung.

Schwann-Zellen und benigne Schwann-Zelltumore exprimieren somit ALDH1 im Vergleich zu vielen malignen Tumoren auffallend konstitutiv und sehr stark in allen Zellen.

Durch diese Daten zeigt sich, dass ALDH1 als möglicher diagnostischer Marker genutzt werden kann, insbesondere in Kombination mit dem etablierten Marker S-100.

4.2. Gesteigerte ALDH1A3-Expression in Schwannomzelllinien durch oxidativen Stress

Durch H_2O_2 kommt es zur Produktion von reaktiven oxidativen Sauerstoffspezies und darüber zur Entstehung von Aldehyden, welche über die Aldehyddehydrogenasen detoxifiziert werden können (Upadhyay et al., 2019; Vasiliou et al., 2004). Diese Aldehyde haben für die Zelle toxisches Potential. In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob in den Schwannomzellen die ALDH1A3 in der Detoxifizierung eine Rolle spielen könnte. In der quantitativen Proteinanalyse konnte eine Hochregulation der ALDH1A3 in der RT4D6P2T Zelllinie durch Simulation von oxidativem Stress gezeigt werden. Der Anstieg fiel im Zeitintervall von 24h signifikanter aus als bei 6h. Die ALDH1A3 scheint hier in der Detoxifizierung eine Rolle zu spielen. In der RN22 zeigte sich eine ähnliche Dynamik. Besonders längere Behandlungsdauern führten zu einer stärkeren Expression. Lediglich die Kontrollgruppe ohne Behandlung zeigte eine hohe ALDH1A3 Expression. Dies passt jedoch zu den oftmals paradoxen Ergebnissen der Zelllinie RN22 aus den anderen Experimenten. Genauere Unterschiede über die Enzymfunktion gilt es in Zukunft herauszuarbeiten.

4.3. Proliferationsstopp in Schwannomzelllinien durch die Inhibition von ALDH1A3

Es wird wissenschaftlich diskutiert, ob ALDH1 eine Rolle in der Zellproliferation spielt (Muzio et al., 2012). Dabei könnten verschiedene Prozesse eine Rolle spielen. Diskutiert wird der Einfluss des Retinsäuresignalwege (Altucci & Gronemeyer, 2001), wobei ALDH1 eine Schlüsselenzym in der Synthese übernimmt (Duester, 2008). Durch die Inhibition der ALDH1 mittels siRNA konnten Effekte auf die Proliferation gezeigt werden (Vassalli, 2019).

In dieser Arbeit diente das MTT Assay, welches die mitochondriale Aktivität bestimmt, als Modell für die Zellaktivität und Zellzahl. Durch DEAB und DSF sollte die ALDH1 Aktivität inhibiert bzw. minimiert werden. In der RT4D6P2T Zelllinie zeigte sich der größte Effekt auf die Zellen bei der Inhibition mit 300µM DEAB. Vergleicht man diese Probe mit der Proliferationskontrolle (vgl. Abbildung 9) zeigt sich lediglich ein marginaler Unterschied in der optischen Dichte. Es zeigen sich hingegen auch Effekte mit DSF bzw. mit einer niedrigen Konzentration DEAB, die jedoch nicht so signifikant ausfielen. In Kombination mit den mikroskopischen Bildern lässt sich vermuten, dass die Inhibition vor allem Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat, da die sich übrigen Zellen morphologisch weiterhin vital präsentieren. Interessanterweise zeigen sich in der Schwannomzelllinie RN22 schwächere Effekte. Möglicherweise spielt die ALDH1 in RN22 Zellen für die Proliferation eine untergeordnete Rolle. Denkbar ist jedoch auch, dass die Konzentrationen höher gewählt hätten werden müssen. Es wäre von großem Interesse die Unterschiede zwischen den Zellen genauer herauszuarbeiten.

4.4. Mutation im ErbB2 Rezeptor

Durch die perinatale Exposition von Rattenembryos mit Ethylnitrosourea konnte in genomischen Analysen eine Punktmutation im Gen von ERBB2 nachgewiesen werden.

Durch den Basenaustausch von Thymin zu Alanin an Position 2012 wird an Stelle 664 der Proteinsequenz ein Glutamat anstelle eines Valins eingebaut (Bargmann et al., 1986). Die Änderung in der Transmembrandomäne führt zu einer gesteigerter intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität und somit zu einer stärkeren Aktivierung der zellulären Signalwege (Bargmann & Weinberg, 1988; Stern et al., 1988).

Sowohl in der RN22 als auch in der RT4D6P2T Zelllinie konnte mittels PCR und Genanalyse die Punktmutation nachgewiesen werden. In beiden Fällen liegt somit eine konstitutive Tyrosinkinaseaktivität vor. Infolgedessen kommt es zu einer dauerhaften Aktivierung des PI3K- und MAPK – Signalweges. Die beiden Zelllinien dienen somit als gutes Modell den Einfluss der beiden Signalwege auf die Expression der ALDH1 näher zu untersuchen.

4.5. Einfluss des PI3K- und MAPK- Signalweges auf Proliferation von Schwannomzelllinien und die ALDH1A3- Expression

Bisher ist viel über die Rolle der beiden Signalwege in der Proliferation in Schwann-Zellen und Schwannomen bekannt. Jedoch wenig über die Rolle der ALDH1 und ihre Regulierung (Poturnajova et al., 2021). In anderen Tumorentitäten konnte der Einfluss der Retinsäure gezeigt werden. So führten niedrige Dosierungen zu einer gesteigerten Proliferation durch eine EGF Signalsteigerung und höhere Dosierungen zu einer verminderten Zellproliferation über eine verminderte ERK1 Aktivierung (Crowe et al., 2003). Zudem scheint die Expression von ALDH1A1 durch b-Catenin über den WNT Signalweg gesteigert zu werden (Cojoc et al., 2015). Auch gibt es Hinweise für den indirekten Einfluss von AKT auf die ALDH1A1 Expression über die Regulation von b-Catenin (Sarabia-Sanchez et al., 2020). Bei der Regulation der Isoform ALDH1A3 scheint das Onkogen K-Ras über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors C/EBP β ein Schlüsselregulator zu sein (Kong et al., 2016).

Bisher ist jedoch nichts über den direkten Einfluss des PI3K und MAPK Signalweges auf die ALDH1 Expression bekannt.

In diesem Experiment konnte der direkte Einfluss der Signalwege auf die ALDH1A3 Expression geprüft werden.

In Vorexperimenten wurde die Zellen über 1h und 6h Stunden mit 20 μ M Ly294002 und 50 μ M PD98059 behandelt. Hier war es zwar möglich die Expression des pAKT und pERK zu minimieren, ein Effekt auf die ALDH1A3 Expression war jedoch nicht zu beobachten. Erst über ein längeres Zeitintervall von 48h war es möglich das ALDH1A3 Level zu beeinflussen. Dabei zeigte die Inhibition des PI3K Signalweges größere Auswirkungen, allerdings nur in der RT4D6P2T Zelllinie. In der RN22 Zelllinie zeigten sich keine stringenten Effekte. Auch die Mikroskopie deutet auf eine erhöhte Vulnerabilität der RT4D6P2T gegenüber der RN22 hin. In dieser Arbeit wurde lediglich der Effekt auf Proteinebene untersucht, wobei es durchaus interessant wäre, das RNA Level der ALDH1A3 nach Behandlung zu bestimmen.

Da ALDH1A3 einen Resistenzfaktor für Tumorzellen gegenüber Strahlung und Chemotherapie darstellt, wäre es von großem Interesse das Modell auf maligne Zelllinien zu übertragen (Januchowski et al., 2013). Möglicherweise übernimmt ALDH1A3 eine wichtige Position in Tumorprozessen.

4.6. Vergleich RT4D6P2T- und RN22- Schwannomzelllinie

Die beiden etablierten Schwannomzelllinien RN22 und RT4D6P2T stammen beide aus Ethylnitrosourea induzierten Schwannomen der Ratte. Beide haben eine Punktmutation im ERBB2 Rezeptor und somit eine erhöhte Tyrosinkinaseaktivität. Über mehrere Experimente zeigten sich trotz der bestehenden Gemeinsamkeiten einzelne Unterschiede.

Mikroskopisch fallen Differenzen in der Morphologie und im Wachstumsverhalten ohne Behandlung der Zellen auf. Die RT4D6P2T Zelllinie zeichnet sich durch polygonale, monomorphe längliche Zellen aus, welche über lange spindelförmige Ausläufer miteinander in Verbindung stehen. Dagegen zeigt die RN22 Zelllinie ein typisches Monolayer, charakteristisch sind viele intrazytoplasmatische granuläre Einschlüsse. Sie bilden keine spindelförmigen Ausläufer, sondern bilden kapillarähnliche Strukturen. Zudem zeigten sie ein schnelleres Wachstum verglichen zur RT4D6P2T Zelllinie.

Des Weiteren sprechen die RT4DP2T deutlich stärker auf eine Inhibition der ALDH1 an. Hier war im Gegensatz zu den RN22 ein nahezu vollständiger Proliferationsstopp zu sehen. Möglicherweise müssten die Konzentrationen in der RN22 höher gewählt werden. Dies würde zu dem bereits beschriebenen schnelleren Wachstum passen.

Interessanterweise zeigte sich jedoch in beiden Zelllinien nach der Simulation von oxidativem Stress ähnliches Muster in der ALDH1A3 Expression. Besonders die Dauer der Exposition gegenüber oxidativem Stress schien sich verstärkt auf die gesteigerte ALDH1A3 Expression auszuwirken.

Dagegen war es nur in RT4D6P2T Zelllinie möglich die ALDH1A3 mittels PI3K- und MAPK-Inhibition zu minimieren. Dabei sei jedoch zu erwähnen, dass eine valide Inhibition mit LY294002 und PD98059 in der RN22 nicht möglich war. Möglicherweise müssten andere Inhibitoren gewählt werden, um den erhofften Effekt zu erzielen. Denkbar wäre auch, dass in der RN22 Zelllinie zusätzliche Mutationen bestehen, welche die Inhibition beeinflussen oder sogar verhindern.

Zusammenfassend lässt sich hier sagen, dass die RN22 deutlicher resistenter gegenüber unterschiedlichen Behandlungen waren. Für das bessere tumorbiologische Verständnis wäre es von großem Interesse die Gründe für das mangelnde Ansprechen zu erforschen. Möglicherweise liegen zusätzliche Mutationen vor.

Als weiterer Ausblick könnte davon ausgegangen werden, dass die RN22 Zelllinie eigentlich keine benignen Eigenschaften besitzt bzw. diese im Laufe der Zeit verloren hat.

4.7. NAB2 als möglicher ALDH Regulator

NAB Proteine wirken auf der Transkriptionsebene, indem sie die transkriptionelle Aktivität von EGR Proteinen modulieren (Svaren et al., 1996). Es ist wissenschaftlich bekannt, dass diese EGR Proteine wichtige Funktionen in der Regulation in Myelinisierungsprozessen haben (Le et al., 2005). Eine mögliche Korrelation zwischen NAB2 und ALDH1A3 sollte geprüft werden.

Exemplarisch wurde an der Zelllinie RT4D6P2T die Simulation von oxidativem Stress durch H_2O_2 durchgeführt. Dabei fällt auf, dass die NAB2 Expression durch die Zugabe von H_2O_2 nach unten reguliert bzw. niedriger exprimiert wird und gleichzeitig die ALDH1A3 nach oben reguliert wird. Dieser Effekt ist erst nach längerer Behandlung von 24 Stunden zu beobachten. Die Expression der beiden Proteine scheint somit negativ miteinander zu korrelieren.

Das NAB2 als Transkriptioneninhibitor in das Gen der ALDH1A3 eingreift ist somit denkbar. Für ein genaueres Verständnis müssten in Zukunft zusätzliche Experimente durchgeführt werden. Interessanterweise exprimieren solitär fibröse Tumore ALDH1 in hohen Mengen (Bouvier et al., 2013). Durch sequenzielle Analysen konnte eine intrachromosomale Genfusion von NAB2 und STAT6 nachgewiesen werden (Chmielecki et al., 2013; Robinson et al., 2013). Dadurch verliert NAB2 seine reprimierende Wirkung, da es unter die transaktivierende Domäne von STAT6 fällt (Tai et al., 2015). Möglicherweise hat dies Einfluss auf die ALDH1 Expression, indem die transkriptionelle Inhibition des ALDH1 Gens wegfällt.

Zusammenfassung

Die Funktionen der Aldehyddehydrogenasen in biologischen Prozessen sind weitreichend. Die Enzymgruppe hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung in der onkologischen Forschung erlangt, da sie als Resistenzfaktor, aber auch in Differenzierungs- und Proliferationsprozessen diskutiert wird. Bisher ist jedoch wenig über die Regulation des Enzyms bekannt. Ziel der Arbeit war es, ein besseres Verständnis über die Hintergründe der Expression zu erlangen.

Da sich besonders in Schwann-Zellen und benignen Schwann-Zelltumoren immunhistochemisch eine sehr hohe, konstitutive Expression zeigte (Schwannome 56/56 positiv mit IRS 12/12 und Schwann-Zellen 6/6 positiv mit IRS 12/12), sollte anhand zweier etablierter Rattenschwannomzelllinien (RT4D6P2T und RN22) modellhaft einzelne Aspekte der Regulation erarbeitet werden. In der Simulation von oxidativem Stress durch H_2O_2 zeigte sich eine Hochregulation der ALDH1A3 in der RT4D6P2T und RN22 Zelllinie. Der Effekt konnte jedoch erst nach 24h, nicht schon nach 6h beobachtet werden.

Durch die Inhibition der ALDH1A3 mittels DEAB und DSF konnte ein Einfluss auf die Proliferation in den RT4D6P2T Zellen beobachtet werden. Signifikante Ergebnisse ergaben sich in der RN22 Zelllinie nicht.

Der mögliche Einfluss des PI3K- und MAPK- Signalweges auf die ALDH1A3 Expression, sollte mittels Inhibition geprüft werden. Hierfür wurde die PI3K mit LY294002 (20 μ M) und die MAPK mit PD98059 (50 μ M) inhibiert. Die Zeitintervalle reichten von 1h bis 48h. In der RT4D6P2T Zelllinie zeigte sich nach 48h sowohl in der PI3K- und MAPK- Inhibitionsgruppe eine verminderte ALDH1A3 Expression in der Westernblot- Proteinanalyse. In der RN22 war dieser Effekt nicht zu beobachten. Es zeigte sich somit ein möglicher Einfluss der beiden Signalwege auf die ALDH1A3 Expression.

Zunächst lässt sich sagen, dass ALDH1 als potenzieller diagnostischer Marker für Schwann-Zellen oder Schwann-Zelleigene Tumore verwendet werden könnte. In der Regulation zeigten sich Differenzen zwischen den Zelllinien. Es ist jedoch davon auszugehen, dass ALDH1A3 eine Rolle für Proliferationsprozesse spielt. Inwiefern der Einfluss des PI3K und MAPK Signalwege auf andere Zelllinien bzw. andere Tumorentitäten übertragbar ist, sollte in weiteren Untersuchungen geprüft werden

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Mein besonderer Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Jürgen Schlegel meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, der freundlichen Hilfe und der inspirierenden Ideengebung, die mir einen kritischen Zugang zu dieser Thematik eröffnete. Die zahlreichen Gespräche auf intellektueller und persönlicher Ebene werden mir immer als bereichernder und konstruktiver Austausch in Erinnerung bleiben.

Ferner möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe der Neuropathologie des Klinikum rechts der Isar, welche mich immer fachlich, aber auch persönlich unterstützt haben.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Freundin, Theresa Storz, für ihre unglaublich hilfreiche Unterstützung und ihr Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank aber gilt jedoch meinen Eltern, Ursula Knorrek und Josef Griessmair, die mich meinen ganzen bisherigen Lebensweg liebevoll unterstützen und immer für mich da waren. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

Bibliografie

- Alam, M., Ahmad, R., Rajabi, H., Kharbanda, A., & Kufe, D. (2013, Oct 25). MUC1-C oncoprotein activates ERK→C/EBPβ signaling and induction of aldehyde dehydrogenase 1A1 in breast cancer cells. *J Biol Chem*, *288*(43), 30892-30903.
- Altucci, L., & Gronemeyer, H. (2001, Dec). Nuclear receptors in cell life and death. *Trends Endocrinol Metab*, *12*(10), 460-468.
- Bargmann, C. I., Hung, M. C., & Weinberg, R. A. (1986, Jun 6). Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell*, *45*(5), 649-657.
- Bargmann, C. I., & Weinberg, R. A. (1988, Aug). Increased tyrosine kinase activity associated with the protein encoded by the activated neu oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(15), 5394-5398.
- Baselga, J. (2002, Aug). A new anti-ErbB2 strategy in the treatment of cancer: prevention of ligand-dependent ErbB2 receptor heterodimerization. *Cancer Cell*, *2*(2), 93-95.
- Bhatheja, K., & Field, J. (2006). Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int J Biochem Cell Biol*, *38*(12), 1995-1999.
- Birchmeier, C., & Nave, K. A. (2008, Nov 1). Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia*, *56*(14), 1491-1497.
- Blume-Jensen, P., & Hunter, T. (2001, May 17). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, *411*(6835), 355-365.
- Bouvier, C., Bertucci, F., Metellus, P., Finetti, P., Maues de Paula, A., Forest, F., Mokhtari, K., Miquel, C., Birnbaum, D., Vasiljevic, A., Jouvret, A., Coindre, J. M., Loundou, A., & Figarella-Branger, D. (2013, May 9). ALDH1 is an immunohistochemical diagnostic marker for solitary fibrous tumours and haemangiopericytomas of the meninges emerging from gene profiling study. *Acta Neuropathol Commun*, *1*, 10.
- Britsch, S., Goerich, D. E., Riethmacher, D., Peirano, R. I., Rossner, M., Nave, K. A., Birchmeier, C., & Wegner, M. (2001, Jan 1). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev*, *15*(1), 66-78.
- Chang, P. M., Chen, C. H., Yeh, C. C., Lu, H. J., Liu, T. T., Chen, M. H., Liu, C. Y., Wu, A. T. H., Yang, M. H., Tai, S. K., Mochly-Rosen, D., & Huang, C. F. (2018, Feb 9). Transcriptome analysis and prognosis of ALDH isoforms in human cancer. *Sci Rep*, *8*(1), 2713.
- Chmielecki, J., Crago, A. M., Rosenberg, M., O'Connor, R., Walker, S. R., Ambrogio, L., Auclair, D., McKenna, A., Heinrich, M. C., Frank, D. A., & Meyerson, M. (2013, Feb). Whole-exome sequencing identifies a recurrent NAB2-STAT6 fusion in solitary fibrous tumors. *Nat Genet*, *45*(2), 131-132.

- Cojoc, M., Peitzsch, C., Kurth, I., Trautmann, F., Kunz-Schughart, L. A., Telegeev, G. D., Stakhovsky, E. A., Walker, J. R., Simin, K., Lyle, S., Fuessel, S., Erdmann, K., Wirth, M. P., Krause, M., Baumann, M., & Dubrovskaya, A. (2015, Apr 1). Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by beta-Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Cancer Res*, *75*(7), 1482-1494.
- Crowe, D. L., Kim, R., & Chandraratna, R. A. (2003, May). Retinoic acid differentially regulates cancer cell proliferation via dose-dependent modulation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cancer Res*, *1*(7), 532-540.
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., & Kolch, W. (2007, May 14). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, *26*(22), 3279-3290.
- Dix, T. A., & Aikens, J. (1993, Jan-Feb). Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol*, *6*(1), 2-18.
- Douville, J., Beaulieu, R., & Balicki, D. (2009, Jan-Feb). ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev*, *18*(1), 17-25.
- Duester, G. (2000, Jul). Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem*, *267*(14), 4315-4324.
- Duester, G. (2008, Sep 19). Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell*, *134*(6), 921-931.
- Endersby, R., & Baker, S. J. (2008, Sep 18). PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis. *Oncogene*, *27*(41), 5416-5430.
- Fruman, D. A., Chiu, H., Hopkins, B. D., Bagrodia, S., Cantley, L. C., & Abraham, R. T. (2017, Aug 10). The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*, *170*(4), 605-635.
- Goldbrunner, R., Weller, M., Regis, J., Lund-Johansen, M., Stavrinou, P., Reuss, D., Evans, D. G., Lefranc, F., Sallabanda, K., Falini, A., Axon, P., Sterkers, O., Fariselli, L., Wick, W., & Tonn, J. C. (2020, Jan 11). EANO guideline on the diagnosis and treatment of vestibular schwannoma. *Neuro Oncol*, *22*(1), 31-45.
- Hadjipanayis, C. G., Carlson, M. L., Link, M. J., Rayan, T. A., Parish, J., Atkins, T., Asher, A. L., Dunn, I. F., Corrales, C. E., Van Gompel, J. J., Sughrue, M., & Olson, J. J. (2018, Feb 1). Congress of Neurological Surgeons Systematic Review and Evidence-Based Guidelines on Surgical Resection for the Treatment of Patients With Vestibular Schwannomas. *Neurosurgery*, *82*(2), E40-E43.
- Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y., & Mills, G. B. (2005, Dec). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, *4*(12), 988-1004.
- Imada, M., & Sueoka, N. (1978, Sep). Clonal sublines of rat neurotumor RT4 and cell differentiation. I. Isolation and characterization of cell lines and cell type conversion. *Dev Biol*, *66*(1), 97-108.

- Jackson, B., Brocker, C., Thompson, D. C., Black, W., Vasiliou, K., Nebert, D. W., & Vasiliou, V. (2011, May). Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics*, 5(4), 283-303.
- Januchowski, R., Wojtowicz, K., & Zabel, M. (2013, Sep). The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance. *Biomed Pharmacother*, 67(7), 669-680.
- Jessen, K. R., & Mirsky, R. (2005, Sep). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*, 6(9), 671-682.
- Kidd, G. J., Ohno, N., & Trapp, B. D. (2013). Biology of Schwann cells. *Handb Clin Neurol*, 115, 55-79.
- Kong, B., Wu, W., Cheng, T., Schlitter, A. M., Qian, C., Bruns, P., Jian, Z., Jager, C., Regel, I., Raulefs, S., Behler, N., Irmeler, M., Beckers, J., Friess, H., Erkan, M., Siveke, J. T., Tannapfel, A., Hahn, S. A., Theis, F. J., Esposito, I., Kleeff, J., & Michalski, C. W. (2016, Apr). A subset of metastatic pancreatic ductal adenocarcinomas depends quantitatively on oncogenic Kras/Mek/Erk-induced hyperactive mTOR signalling. *Gut*, 65(4), 647-657.
- Koppaka, V., Thompson, D. C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K. C., Juvonen, R. O., Petersen, D., Deitrich, R. A., Hurley, T. D., & Vasiliou, V. (2012, Jul). Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev*, 64(3), 520-539.
- Kumbrink, J., Gerlinger, M., & Johnson, J. P. (2005, Dec 30). Egr-1 induces the expression of its corepressor nab2 by activation of the nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop. *J Biol Chem*, 280(52), 42785-42793.
- Kumbrink, J., Kirsch, K. H., & Johnson, J. P. (2010, Sep 1). EGR1, EGR2, and EGR3 activate the expression of their coregulator NAB2 establishing a negative feedback loop in cells of neuroectodermal and epithelial origin. *J Cell Biochem*, 111(1), 207-217.
- Le, N., Nagarajan, R., Wang, J. Y. T., Svaren, J., LaPash, C., Araki, T., Schmidt, R. E., & Milbrandt, J. (2005). Nab proteins are essential for peripheral nervous system myelination. *Nature Neuroscience*, 8(7), 932-940.
- Lee, Y. R., Chen, M., & Pandolfi, P. P. (2018, Sep). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(9), 547-562.
- Liesche, F., Griessmair, M., Barz, M., Gempt, J., & Schlegel, J. (2019, May 27). ALDH1 - A new immunohistochemical diagnostic marker for Schwann cell-derived tumors. *Clin Neuropathol*.
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D.

- W. (2021, Aug 2). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*, 23(8), 1231-1251.
- Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D., & Schlessinger, J. (1992, Aug 7). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, 70(3), 431-442.
- Maden, M. (2007, Oct). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 8(10), 755-765.
- Mbeunkui, F., & Johann, D. J., Jr. (2009, Mar). Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol*, 63(4), 571-582.
- Mirsky, R., Woodhoo, A., Parkinson, D. B., Arthur-Farraj, P., Bhaskaran, A., & Jessen, K. R. (2008, Jun). Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *J Peripher Nerv Syst*, 13(2), 122-135.
- Moore, S. A., Baker, H. M., Blythe, T. J., Kitson, K. E., Kitson, T. M., & Baker, E. N. (1998, Dec 15). Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure*, 6(12), 1541-1551.
- Moreb, J. S. (2008, Dec). Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*, 3(4), 237-246.
- Morrison, S. J., & Spradling, A. C. (2008, Feb 22). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 132(4), 598-611.
- Muzio, G., Maggiora, M., Paiuzzi, E., Oraldi, M., & Canuto, R. A. (2012, Feb 15). Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radic Biol Med*, 52(4), 735-746.
- Nave, K. A., & Trapp, B. D. (2008). Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci*, 31, 535-561.
- Newbern, J., & Birchmeier, C. (2010, Dec). Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. *Semin Cell Dev Biol*, 21(9), 922-928.
- Pawson, T., Gish, G. D., & Nash, P. (2001, Dec). SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol*, 11(12), 504-511.
- Pfeiffer, S. E., & Wechsler, W. (1972, Oct). Biochemically differentiated neoplastic clone of Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69(10), 2885-2889.
- Poturnajova, M., Kozovska, Z., & Matuskova, M. (2021, Nov). Aldehyde dehydrogenase 1A1 and 1A3 isoforms - mechanism of activation and regulation in cancer. *Cell Signal*, 87, 110120.

- Rajewsky, M. F. (1983). Structural modifications and repair of DNA in neuro-oncogenesis by N-ethyl-N-nitrosourea. *Recent Results Cancer Res*, *84*, 63-76.
- Rasper, M., Schafer, A., Piontek, G., Teufel, J., Brockhoff, G., Ringel, F., Heindl, S., Zimmer, C., & Schlegel, J. (2010, Oct). Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. *Neuro Oncol*, *12*(10), 1024-1033.
- Ravera, S., & Panfoli, I. (2015, Oct). Role of myelin sheath energy metabolism in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*, *10*(10), 1570-1571.
- Remmele, W., & Stegner, H. E. (1987, May). [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologie*, *8*(3), 138-140. (Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe.)
- Robinson, D. R., Wu, Y. M., Kalyana-Sundaram, S., Cao, X., Lonigro, R. J., Sung, Y. S., Chen, C. L., Zhang, L., Wang, R., Su, F., Iyer, M. K., Roychowdhury, S., Siddiqui, J., Pienta, K. J., Kunju, L. P., Talpaz, M., Mosquera, J. M., Singer, S., Schuetze, S. M., Antonescu, C. R., & Chinnaiyan, A. M. (2013, Feb). Identification of recurrent NAB2-STAT6 gene fusions in solitary fibrous tumor by integrative sequencing. *Nat Genet*, *45*(2), 180-185.
- Russo, J. E., Haugwitz, D., & Hilton, J. (1988, Apr 15). Inhibition of mouse cytosolic aldehyde dehydrogenase by 4-(diethylamino)benzaldehyde. *Biochem Pharmacol*, *37*(8), 1639-1642.
- Russo, M. W., Sevetson, B. R., & Milbrandt, J. (1995, Jul 18). Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(15), 6873-6877.
- Sarabia-Sanchez, M. A., Alvarado-Ortiz, E., Toledo-Guzman, M. E., Garcia-Carranca, A., & Ortiz-Sanchez, E. (2020). ALDH(HIGH) Population Is Regulated by the AKT/beta-Catenin Pathway in a Cervical Cancer Model. *Front Oncol*, *10*, 1039.
- Schafer, A., Teufel, J., Ringel, F., Bettstetter, M., Hoepner, I., Rasper, M., Gempt, J., Koeritzer, J., Schmidt-Graf, F., Meyer, B., Beier, C. P., & Schlegel, J. (2012, Dec). Aldehyde dehydrogenase 1A1--a new mediator of resistance to temozolomide in glioblastoma. *Neuro Oncol*, *14*(12), 1452-1464.
- Simon, J. A., & Schreiber, S. L. (1995, Jan). Grb2 SH3 binding to peptides from Sos: evaluation of a general model for SH3-ligand interactions. *Chem Biol*, *2*(1), 53-60.
- Singh, S., Brocker, C., Koppaka, V., Chen, Y., Jackson, B. C., Matsumoto, A., Thompson, D. C., & Vasiliou, V. (2013, Mar). Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic Biol Med*, *56*, 89-101.

- Sliwkowski, M. X., Schaefer, G., Akita, R. W., Lofgren, J. A., Fitzpatrick, V. D., Nuijens, A., Fendly, B. M., Cerione, R. A., Vandlen, R. L., & Carraway, K. L., 3rd. (1994, May 20). Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem*, *269*(20), 14661-14665.
- Sobel, R. A. (1993, Mar). Vestibular (acoustic) schwannomas: histologic features in neurofibromatosis 2 and in unilateral cases. *J Neuropathol Exp Neurol*, *52*(2), 106-113.
- Srinivasan, R., Jang, S. W., Ward, R. M., Sachdev, S., Ezashi, T., & Svaren, J. (2007, Dec 20). Differential regulation of NAB corepressor genes in Schwann cells. *BMC Mol Biol*, *8*, 117.
- Stefansson, K., Wollmann, R., & Jerkovic, M. (1982, Feb). S-100 protein in soft-tissue tumors derived from Schwann cells and melanocytes. *Am J Pathol*, *106*(2), 261-268.
- Stern, D. F., Kamps, M. P., & Cao, H. (1988, Sep). Oncogenic activation of p185neu stimulates tyrosine phosphorylation in vivo. *Mol Cell Biol*, *8*(9), 3969-3973.
- Svaren, J., Severson, B. R., Apel, E. D., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., & Milbrandt, J. (1996, Jul). NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol*, *16*(7), 3545-3553.
- Swirnoff, A. H., Apel, E. D., Svaren, J., Severson, B. R., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., & Milbrandt, J. (1998, Jan). Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. *Mol Cell Biol*, *18*(1), 512-524.
- Tai, H. C., Chuang, I. C., Chen, T. C., Li, C. F., Huang, S. C., Kao, Y. C., Lin, P. C., Tsai, J. W., Lan, J., Yu, S. C., Yen, S. L., Jung, S. M., Liao, K. C., Fang, F. M., & Huang, H. Y. (2015, Oct). NAB2-STAT6 fusion types account for clinicopathological variations in solitary fibrous tumors. *Mod Pathol*, *28*(10), 1324-1335.
- Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T., & Hara, A. (2016, Mar 8). Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*, *7*(10), 11018-11032.
- Ullrich, A., & Schlessinger, J. (1990, Apr 20). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, *61*(2), 203-212.
- Upadhyay, S., Vaish, S., & Dhiman, M. (2019, Jan). Hydrogen peroxide-induced oxidative stress and its impact on innate immune responses in lung carcinoma A549 cells. *Mol Cell Biochem*, *450*(1-2), 135-147.
- Vartanian, T., Goodearl, A., Viehover, A., & Fischbach, G. (1997, Apr 7). Axonal neuregulin signals cells of the oligodendrocyte lineage through activation of HER4 and Schwann cells through HER2 and HER3. *J Cell Biol*, *137*(1), 211-220.
- Vasiliou, V., Pappa, A., & Estey, T. (2004, May). Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev*, *36*(2), 279-299.

- Vassalli, G. (2019). Aldehyde Dehydrogenases: Not Just Markers, but Functional Regulators of Stem Cells. *Stem Cells Int*, 2019, 3904645.
- Warner, L. E., Svaren, J., Milbrandt, J., & Lupski, J. R. (1999, Jul). Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum Mol Genet*, 8(7), 1245-1251.
- Weiss, S. W., Langloss, J. M., & Enzinger, F. M. (1983, Sep). Value of S-100 protein in the diagnosis of soft tissue tumors with particular reference to benign and malignant Schwann cell tumors. *Lab Invest*, 49(3), 299-308.
- Yildiz, E., Dahm, V., Matula, C., & Arnoldner, C. (2022, Feb). [Vestibular schwannoma: Diagnosis-Therapy-Aftercare]. *Wien Med Wochenschr*, 172(1-2), 2-7.
(Vestibularisschwannome: Diagnose - Therapie - Nachsorge.)
- Zhang, W., & Liu, H. T. (2002, Mar). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*, 12(1), 9-18.

Abbildung 1: Darstellung der ErbB2/3 Heterodimerisierung aus (Baselga, 2002).....	13
Abbildung 2: Kommunikation des GRB2 Proteins über seine SH2 und seine zwei SH3 Domäne; aus (Pawson et al., 2001)	14
Abbildung 3: Der Einfluss des PI3K Signalweges auf zelluläre Prozesse; aus (Hennessy et al., 2005).....	15
Abbildung 4: Mutation im ErbB2 Gen; aus (Bargmann et al., 1986)	17
Abbildung 5 Stellung der NAB Expression im Neuregulin- und ErbB- Signalweg; aus (Srinivasan et al., 2007).....	18
Abbildung 6 Mechanismus einer schematisch dargestellten Wetblot Kassette, aus ThermoSc	32
Abbildung 8 Chronologische Darstellung der Simulation von oxidativem Stress mit H ₂ O ₂ an den Zelllinien RT4D6P2T und RN22 Exemplarisch für eine Zelllinie 0h: Aussaat von 4 Proben sowie eine unbehandelte Kontrolle, nach 12h: Behandlung von 2 Proben mit 200µM bzw. 500µM, 18h: Lyse je eine Probe mit 200 bzw. 500µM, 36h Lyse der anderen beiden Proben mit 200 bzw. 500µM sowie der unbehandelten Kontrolle.....	37
Abbildung 9 Ablauf der PI3K und MAPK Inhibition mit LY294002 und PD98059 Exemplarisch für eine Zelllinie: 0h: Aussaat der zwei Kontrollen 10%FCS/1%FCS sowie der Probe 1/2, 12h: Zugabe von 20µM LY294002 zu Probe 1 und 50µM PD98059 zu Probe 2, 36h: Mediumwechsel in den zwei Kontrollen sowie Erneuerung der Dosierung von Probe 1 und 2, 60h Lyse der zwei Kontrolle sowie der zwei Proben	38
Abbildung 10: Schematische Darstellung der ALDH1 Inhibition mit DEAB/ DSF in Kombination mit H ₂ O ₂ in RT4D6P2T und RN22 Zellen, Oberer Zeitstrahl Aussaat der Proliferationskontrolle 29h nach Aussaat der Probe, Unterer Zeitstrahl: 0h Aussaat der Proben, 24h: Zugabe DEAB und DSF, 48h: Zugabe von H ₂ O ₂ zu einem Teil der Proben, 53h: Start des MTT Assays aller Proben, der Kontrolle sowie der Proliferationskontrolle.....	39
Abbildung 11 A: ALDH1- Expression in Schwannome und in B: ALDH1-Expression in Neurofibromen, aus (Liesche et al., 2019)	40
Abbildung 12 MPNST: A: Überwiegende Expression ALDH1 B: Vereinzelt positive Zellen für S10, aus (Liesche et al., 2019).....	41
Abbildung 13 A: Keine ALDH1 Immunreaktion in Meningeomen B: Auch für GIST keine positive ALDH1 Reaktion C: Kein Nachweis von ALDH1 in Leiomyosarkomen, aus (Liesche et al., 2019).....	41
Abbildung 14 A: Expression von ALDH1A1 in Schwannom B: Expression von ALDH1A3 in Schwannome ,aus (Liesche et al., 2019)	41
Abbildung 15 ALDH1A3 Expression in RT4D6P2T Zellen unter Simulation von oxidativem Stress mittels H ₂ O ₂ Anordnung der Proben von links nach rechts: 1.Kontrolle 2. 200µM H ₂ O ₂ über 6h 3. 500µM H ₂ O ₂ über 6h 4. 200µM H ₂ O ₂ über 24h 5. 500µM über 24h	43
Abbildung 16 ALDH1A3 Expression in RN22 unter H ₂ O ₂ mit 200µM/500µM über 6h/24h	44

Abbildung 17 NAB2 Expression in RT4D6P2T unter H ₂ O ₂ mit 200µM/500µM über 6h/24h	45
Abbildung 18 Morphologische Aspekte der RT4D6P2T Zelllinie unter der alleinigen Zugabe des ALDH1 Inhibitors (DEAB) oder in Kombination mit 500µM Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	
A: Kontrolle B: 500µM H ₂ O ₂ C: 200µM DEAB D: 300µM DEAB E: 200µM DEAB+500µM H ₂ O ₂ F: 300µM DEAB+500µM H ₂ O ₂ G: Proliferationskontrolle (vgl. 2.7.3. Inhibition der ALDH1 mit/ ohne Simulation von oxidativem Stress durch H ₂ O ₂)	47
Abbildung 19 Morphologische Aspekte der RN22 Zelllinie unter der alleinigen Zugabe des ALDH1A3 Inhibitors (DEAB) oder in Kombination mit 500µM Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	
A: Kontrolle B: 500µM H ₂ O ₂ C: 200µM DEAB D: 300µM DEAB E: 200µM DEAB+500µM H ₂ O ₂ F: 300µM DEAB+500µM H ₂ O ₂ G: Proliferationskontrolle(vgl. 2.7.3. Inhibition der ALDH1 mit/ ohne Simulation von oxidativem Stress durch H ₂ O ₂)	49
Abbildung 20 Morphologische Aspekte der Zelllinie RT4D6P2T unter Einfluss des PI3K Inhibitors (LY294002) und des MAPK-Inhibitors (PD98059) A: Kontrolle 1% FCS B: 1%FCS DMSO C: LY 20µM 72h D: 50µM PD 72h	53
Abbildung 21: Morphologische Aspekte der RN22 Zelllinie unter Einfluss des PI3K Inhibitors (LY294002) und des MAPK-Inhibitors (PD98059) A Kontrolle + 1%FCS ohne DMSO B: Kontrolle + 1%FCS mit DMSO C: LY 20µM 72h D: 50µM PD 72h	54
Abbildung 22 Effekte der ALDH1 Inhibition mittels DEAB und DSF	55
Abbildung 23 Effekte von LY294002 und PD98059 auf die Expression von ALDH1A3 in RT4D6P2T Zellen	57
Abbildung 24 Effekte von LY294002 und PD98059 auf die Expression von pAKT und pERK in RT4D6P2T Zellen	58