

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Neuropathologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Paulus-

Einfluss von AMOG/ β 2 auf Adhäsion und Migration
von Gliomzellen in vitro

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Schmidtpeter, Sandra

aus Hamm

2006

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. W. Paulus

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. S. Thanos

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Neuropathologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Paulus-
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Paulus
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. S. Thanos

ZUSAMMENFASSUNG

Einfluss von AMOG/β2 auf Adhäsion und Migration von Gliomzellen in vitro
Schmidtpeter, Sandra

Gliomzellen infiltrieren aggressiv, z. T. als einzelne Zellen das umgebende Hirngewebe. In diesen als diffuse Invasion bezeichneten Prozess sind Komponenten der extrazellulären Matrix einerseits und zelluläre Adhäsionsmoleküle andererseits involviert.

Die β2-Untereinheit der Na⁺,K⁺-ATPase wurde ursprünglich als gliales Adhäsionsmolekül identifiziert (adh^esion molecule on glia), welches während der Entwicklung des Nervensystems in Adhäsions- und Migrationsvorgänge von Neuronen und Astrozyten involviert ist.

Hier wurde die Expression des AMOG/β2 in Gliomen untersucht, sowie sein Einfluss auf die Adhäsion und Migration von Gliomzellen. Es wurde gezeigt, dass die Expression von AMOG/β2 in Gliomen verringert ist und in Glioblastomzellen nicht mehr nachgewiesen werden kann.

Um die Funktion von AMOG/β2 in der Gliomzellinvasion zu untersuchen, wurden AMOG/β2 negative C6TL-Rattengliomzellen mit dem AMOG/β2-Expressionsplasmid transfiziert, um die Funktion des Adhäsionsmoleküls in diesen Zellen wieder herzustellen.

Für die in-vitro-Versuche wurde der Klon B1 mit der stärksten AMOG/β2-Expression im Western-Blot und in der indirekten Immunfluoreszenz verwendet.

Die Migration dieser Zelllinien wurde auf den Substraten Matrigel und Myelin in Abhängigkeit von der AMOG/β2-Expression untersucht. Zudem wurde das Adhäsionsverhalten der Ursprungszelllinie C6TL und den C6-AMOG-Zellen auf Matrigel und Myelin verglichen.

Auf Myelin zeigten sich keine Unterschiede bezüglich des Adhäsions- und Migrationsverhaltens.

Die Reexpression von AMOG/β2 in C6TL-Zellen führte zu erhöhter Adhäsion und signifikant verminderter Migration auf Matrigel, verglichen mit der Ursprungszelllinie C6TL. Zudem stieg die Adhäsion der C6-AMOG-Zellen mit steigender Matrigelkonzentration (Konzentration von 1µg/ml- 500 µg/ml). Bei der höchsten Matrigelkonzentration war die Adhäsion der AMOG/β2-positiven Zellen mehr als drei mal so hoch wie bei AMOG/β2-negativen Zellen.

Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass der Verlust von AMOG/β2 in Gliomzellen die Gliominvasion beeinflusst und somit bei der diffusen Invasion des Gehirns involviert ist.

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2006

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	
1.1. Pathologie der Gliome	1
1.2. Die Rolle der Extrazellulärmatrix (ECM) bei der Gliominvasion	7
1.3. Basalmembran	8
1.4. AMOG/ β 2 (<u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule <u>O</u> n <u>G</u> lia)	10
1.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	12
2. MATERIALIEN UND METHODEN	
2.1. Material	
2.1.1 Chemikalien	13
2.1.2 Allgemein verwendete Puffer	14
2.1.3 Antibiotika	15
2.1.4 Enzyme	
2.1.4.1 Enzyme in der Zellkultur	15
2.1.4.2 Restriktionsenzyme	15
2.1.5 Sequenzierprimer	15
2.1.6 Plasmide	16
2.1.7 Eukaryotische Zellkultur	17
2.1.8 Nährmedien und Lösungen	18
2.1.9 Antikörper	18
2.1.10 Geräte	19
2.2. Methoden	
2.2.1 Kultivierung von Säugetierzellen	
2.2.1.1 Allgemeine Handhabung	20
2.2.1.2 Auftauen von Säugetierzellen	20
2.2.1.3 Mediumwechsel und Subkultivierung von Säugetierzellen	20
2.2.1.4 Langzeitlagerung und Kryokonservierung von Zellen	21
2.2.1.5 Zellzahlbestimmung	22
2.2.2 Präparation von Nucleinsäuren	
2.2.2.1 Linearisierung von DNA	22
2.2.2.2 Analytische Agarose-Gelelektrophorese	23

2.2.2.3 Phenolextraktion und Ethanol­fällung	23
2.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA	24
2.2.2.5 DNA- Sequenzierung	24
2.2.3 Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA	
2.2.3.1 Stabile Transfektion	25
2.2.3.2 Selektion mit Zeozin	26
2.2.3.3 Picken von Kolonien	26
2.2.4 Indirekte Immunfluoreszenz	
2.2.4.1 Beschichten der Deckgläser mit Poly-L-Lysin	27
2.2.4.2 Herstellung der Deckglaskulturen	27
2.2.4.3 Fixierung	27
2.2.4.4 Antikörperinkubation	27
2.2.4.5 Mikroskopie	28
2.2.5 Luciferaseassay	28
2.2.6 Gesamtzelllysate für Western-Blots	29
2.2.7 Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry	30
2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.2.9 Western-Blot	31
2.2.10 Extraktion von Myelin	32
2.2.11 In vitro Versuche	
2.2.11.1 Monolayermigrationsassay	34
2.2.11.2 Adhäsionsassay	36

3 ERGEBNISSE

3.1 Reexpression von AMOG/β2 in stabil transfizierten Gliomzelllinien	
3.1.1 Transfektion mit pBI-AMOG	38
3.1.2 Regulation der AMOG/β2- Expression	39
3.1.3 Nachweis des rekombinanten AMOG/β2 im Western-Blot	41
3.1.4 Nachweis des rekombinanten AMOG/β2 in der indirekten Immunfluoreszenz	42
3.1.5 Nachweis von AMOG/β2 in Biopsien von humanen Gliomen	43

3.2 In vitro Migration und Adhäsion	
3.2.1. In vitro Migration	44
3.2.2 Adhäsionsassay	46
4 DISKUSSION	
4.1 Die Rolle von AMOG/ β 2 in der Gliominvasion	48
4.2 Regulation der Genexpression	54
4.3 Ausblick	56
5 ZUSAMMENFASSUNG	57
6 LITERATURVERZEICHNIS	59
7 LEBENSLAUF	65
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	66

1 EINLEITUNG

1.1. Pathologie der Gliome

Epidemiologie:

Die *Inzidenz* intrakranieller Tumoren liegt in Europa bei 5-7 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner und Jahr. Bei einigen Hirntumoren hat die Inzidenz in den letzten Jahren zugenommen. Hierzu zählen zerebrale Lymphome und Plexuspapillome. Die häufigsten primär intrakraniellen Tumoren sind Gliome. Trotz der modernen Diagnostik und Therapie liegt die mittlere Überlebenszeit bei 15 Monaten (13; 51)

Tumoren des ZNS zeigen häufig eine Bevorzugung bestimmter Lokalisationen und *Altersgruppen*. Der Anteil der Hirntumoren an den malignen Tumoren beträgt bei Erwachsenen 1-4%, bei Kindern 20-25% und steht hier nach den Leukämien an zweiter Stelle der Neoplasien im Kindesalter. Bei kongenitalen Tumoren (Krankheitsbeginn in der Perinatalperiode) dominieren Teratome (> 50%), bei Säuglingen Astrozytome und Plexuspapillome, bei Kindern Astrozytome und Medulloblastome. Bei über 60 Jahre alten Patienten kommen vor allem Meningeome (35-40%), WHO-Grad-IV-Tumore (20-25%) und Hypophysenadenome (10-20%) vor.

Die *Geschlechtsverteilung* weist eine deutliche Dominanz des weiblichen Geschlechts bei Meningeomen (m: w etwa 0,5), Neurinomen und zum Teil pilozytischen Astrozytomen auf. Die meisten übrigen Tumore sind beim männlichen Geschlecht häufiger: Medulloblastome (m: w etwa 1,6), Hämangioblastome, Hämangioperizytome, Kraniopharyngeome, Epidermoide und Keimzelltumoren (51).

Ätiologie und Pathogenese

Trotz ausgedehnter epidemiologischer Studien konnten bisher keine eindeutigen Umweltfaktoren identifiziert werden, die für die Entstehung von Hirntumoren verantwortlich sind.

Durch chemische Karzinogene wie Alkylnitrosoharnstoffe (ENU und MNU) können bei Ratten, Kaninchen und anderen Tieren meist nach einigen Monaten Gliome, seltener Gliosarkome und andere maligne periphere Nervenscheidentumoren induziert werden. Die Karzinogene bewirken eine Alkylierung der DNA-Basen, was schließlich zu Basenfehlpaarungen, Punktmutationen und Onkogenaktivierung führt. Inwiefern die

Ergebnisse dieser tierexperimentellen Studien auf den Menschen übertragbar sind, ist unklar.

Des Weiteren können im Tierexperiment Viren (u. a. ASV, Adenoviren, SV40, JC, BK) nach zerebraler Inokulation Hirntumoren induzieren. Bei humanen Hirntumoren gibt es ebenfalls Hinweise auf eine virale Beteiligung bei deren Entstehung (51).

Gesichert ist allein die gelegentliche Induktion von Hirntumoren durch therapeutische Dosen ionisierender Strahlen. Bestrahlung des Kopfes, auch in geringen Dosen, kann die Inzidenz von Meningeomen um den Faktor 10 und die von glialen Tumoren um den Faktor 3 bis 7 erhöhen mit einer Latenzzeit von 10 bis mehr als 20 Jahren nach der Exposition (35).

Tumoren des ZNS treten ungewöhnlich häufig im Rahmen erblicher Tumorsyndrome wie z. B. den Phakomatosen auf. Zusätzlich prädisponieren Immundefizienzsyndrome wie das Wiskott-Aldrich-Syndrom zu primär zerebralen Lymphomen (36).

Klinik:

Die klinische Symptomatik der Hirntumoren wird geprägt durch Hirndruckzeichen wie morgendliches Erbrechen, Kopfschmerzen, Visusstörungen, Stauungspapille und psychische Veränderungen (Merkfähigkeits- und Konzentrationsstörungen). Je nach Lokalisation des Tumors können neurologische Herdsymptome auftreten, z. B. Hemiparese, Aphasie, Ataxie oder hormonelle Störungen. Häufig treten auch generalisierten Krampfanfälle auf. Je maligner der Tumor, desto kürzer die Anamnese. 3-10% der Hirntumoren sind symptomlos und werden autoptisch diagnostiziert (35; 51).

Diagnose:

Der Standard der bildgebenden Verfahren in der Tumordiagnostik ist das MRT mit und ohne Kontrastmittel in drei Ebenen. MRT mit Gadolinium-Enhancement ist die Methode der Wahl (35).

Klassifikation:

Die Gliederung der Tumoren stützt sich auf die revidierte WHO-Klassifikation (Kleihues u. Cavenee 2000 (28); s. folgende Übersicht), die sich inzwischen weltweit durchgesetzt hat.

Nach der WHO-Klassifikation werden die Tumoren in vier Malignitätsgrade eingestuft, von den benignen Grad-I-Tumoren, die theoretisch durch eine Operation komplett entfernt werden können, bis zu den histologisch hochmalignen Grad-IV-Tumoren.

WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems

Tumoren des neuroepithelialen Gewebes

- **Astrozytäre Tumoren**
- Diffuses Astrozytom (Grad II); Varianten: fibrillär, protoplasmatisch, gemästetzig
- Anaplastisches Astrozytom (Grad III)
- Glioblastom (Grad IV); Varianten: Riesenzellglioblastom, Gliosarkom
- Pilozytisches Astrozytom (Grad I)
- Pleomorphes Xanthoastrozytom (Grad II)
- Subependymales Riesenzellastrozytom (Grad I)

Des weiteren zählen zu den Tumoren des neuroepithelialen Gewebes:

- **Oligodendrogliale Tumoren**
- **Mischgliome**
- **Ependymale Tumoren**
- **Plexus-choroideus Tumoren**
- **Gliale Tumoren ungeklärten Ursprungs**
- **Neuronale und gemischt neuronal-gliale Tumoren**
- **Neuroblastische Tumoren**
- **Tumoren des Pinealisparenchyms**
- **Embryonale Tumoren**

In der WHO-Klassifikation der Tumore des Nervensystems schließen sich noch folgende nicht weiter erläuterte Tumoren an:

- **Tumoren der Hirn- und Rückenmarksnerven**

- **Tumoren der Meningen**
- **Lymphome und hämatopoetische Tumoren**
- **Keimzelltumoren**
- **Tumoren der Sellaregion**
- **Metastatische Tumoren**

Pathologie:

In einigen Aspekten unterscheiden sich Tumoren des ZNS von denen anderer Organe. Die klassischen Merkmale der Malignität (infiltrativ-destruktives Wachstum und Metastasierung) gelten nur eingeschränkt. Die Tumordinfiltration bleibt in der Regel auf das Gehirnparenchym beschränkt. Ein Übergreifen auf benachbarte Strukturen (Dura, Knochen) findet nur selten statt. Hierfür dürften gliaspezifische Zell-Matrix-Interaktionen eine wesentliche Ursache sein (51; 62).

In den meisten malignen Neoplasien sind Intravasation/ Extravasation oder die Ausbreitung entlang des lymphatischen Systems ein Teil der Tumorprogression. Dies führt zur Metastasierung über das Gefäßsystem und lymphatische System. Im Gegensatz dazu infiltrieren Gliomzellen aggressiv z. T. als einzelne Zellen das umgebende Hirngewebe (23). Dieser, als Invasion bezeichnete Prozess, beschreibt das aktive Einwachsen von Tumorzellen in das normale Gewebe, das mit einer Destruktion der normalen Gewebsstruktur einhergeht. Sowohl die extrazelluläre Matrix (ECM), Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, als auch Proteasen und deren Inhibitoren sind in die Interaktionen zwischen Tumorzellen und normalem Gewebe involviert (61). Sogar niedrig maligne Gliome zeigen diese diffuse Infiltration. Dies impliziert, dass Tumorzellinvasion nicht vom Malignitätsgrad abhängig ist. Trotz der diffusen lokalen Invasion vermögen die Tumorzellen nur äußerst selten außerhalb des Nervensystems zu metastasieren. Eine plausible Erklärung für dieses paradoxe Verhalten könnte sein, dass Tumorzellen von primären Hirntumoren die „protektive“ vaskuläre Basalmembran nicht überschreiten können (31).

Da extensive Migration von unreifen neuroektodermalen Zellen bei der Entwicklung des Gehirns eine große Rolle spielt wird vermutet, dass Gliomzellen und fetale Zellen ähnliche Mechanismen für ihre Migration im Gehirnparenchym nutzen (9).

Das invasive Wachstum lässt sich in mehrere Schritte untergliedern:

- **Dissoziation** des Zellverbandes
- **Enzymatische Degradation** extrazellulärer Gewebematrix
- Aktive Bewegung (**Migration**) der Tumorzellen
- **Angiogenese**

Bei der **Tumorzelldissoziation** kommt es zu einer Separierung einzelner Tumorzellen aus dem organisierten Tumorzellverband, die durch die Verminderung oder den Verlust von interzellulären Haftstrukturen mit Auflösung der Zell-Zell-Adhäsionen ermöglicht wird.

Ein wesentlicher Schritt des aktiven Voranwachsens ist die temporäre und reversible **Degradation der ECM**, wie z. B. der Basalmembranen. Wesentlich beteiligt sind hierbei degradierende Enzyme, wie z. B. Kollagenasen, Cystein- und Serinproteasen, sowie Metalloproteinasen. Gliomzellen exprimieren unterschiedliche Subtypen der MMP (Matrixmetalloproteinasen), wovon Gelatinase A (MMP-2) und Gelatinase B (MMP-9) am stärksten exprimiert werden (65). Diese Metalloproteinasen können durch Inhibitoren gehemmt werden, die sowohl von Tumorzellen als auch von normalen Zellen gebildet werden. Diese sogenannten „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMP-1 und TIMP-2) hemmen Metalloproteinasen und verhindern damit die Degradation der ECM. Das invasive Tumorwachstum wird u.a. von der Relation zwischen Enzymen und ihren Regulationsproteinen bestimmt (7; 47).

Es folgt die **Migration**, die aktive Fortbewegung der Tumorzellen in die enzymatisch eröffneten Gewebsstrukturen. Dieser Vorgang wird durch spezifische Adhäsionsmoleküle wie Integrine, Cadherine, Selektine und Mitglieder der Immunglobulinfamilie wie N-CAM, I-CAM und V-CAM unterstützt. Die extrazelluläre Domäne der Integrine ermöglicht den Tumorzellen eine Adhäsion an Laminin, Fibronectin oder Vitronectin. Die intrazelluläre Domäne dagegen stellt den Fixpunkt für die Bewegungen durch die Aktinfilamente dar (34).

Es ist bekannt, dass das Wachstum von Gliomen und anderen soliden Tumoren von der **Angiogenese** abhängig ist. Die Angiogenese spielt bei der Gliomzellproliferation, -invasion und -migration eine Rolle. Denn Gliomzellen nutzen einerseits die neu entstandenen Gefäße als Leitstrukturen für die Invasion ins gesunde umgebende Hirngewebe und rekrutieren andererseits Endothelzellen, um den wachsenden Tumor zu

vaskularisieren und um MMPs für die weitere Invasion zu sezernieren. Diese Prozesse scheinen beispielsweise durch die streng regulierte und gekoppelte Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) durch die Gliomzellen bzw. flk-1 (Rezeptor für VEGF) durch aktivierte Endothelzellen vermittelt zu werden (19; 23; 42).

Prognose:

Bei den meisten Hirntumoren ist die Operation die Therapie der Wahl. Je nach histologischer Diagnose, klinischem Verlauf, Lokalisation des Tumors und Alter des Patienten erfolgen zusätzlich Bestrahlung und/ oder Chemotherapie (51).

Durch das invasive Wachstum werden auch funktionell wichtige Areale vom Tumor infiltriert, so dass die radikale chirurgische Resektion dieser Tumoren beim Patienten nahezu immer signifikante neurologische Defizite hinterlässt. Die Alternativen zur radikalen Resektion sind partielle Resektion oder stereotaktische Biopsien.

Gliome sind strahlensensibel. Bei der Bestrahlung werden Dosen zwischen 55 und 65 Gy angewendet. In der Regel wird ein den eigentlichen Tumor angrenzendes Areal von ca. 2 cm mitbestrahlt, sog. involved-field Radiotherapie (45). Allerdings lässt sich durch Strahlentherapie lediglich die Progression verzögern (31).

Für die Therapie der anaplastischen Gliome und der Glioblastome stehen verschiedene Chemotherapien zur Verfügung. Abhängig vom Gesundheitszustand des Patienten, seinem Alter und dem histologischen Differenzierungsgrad des Tumors sowie der Dauer der Symptome zeigten sich unterschiedliche Verlängerungen der Lebenszeit bei Patienten, die zusätzlich im Anschluss an Strahlentherapie eine Chemotherapie erhielten (35). Die am häufigsten verwendeten Agentien sind alkylierende Substanzen oder Antimetabolite. Temodal (Temozolomid) ist als Chemotherapeutikum bei malignen Gliomen zugelassen. Bei Patienten mit einem Rezidiv eines malignen Glioms wurde eine Chemotherapie mit Temozolomid gut vertragen und in einigen Fällen konnte die Progression der Erkrankung verzögert werden (58). PCV (Procarbacin, CCNU, Vincristin) ist eine Kombinationschemotherapie, die sowohl bei anaplastischen Oligodendrogliomen, anaplastischen Astrozytomen und mit weniger hohen Ansprechraten auch zur Behandlung von Glioblastomen eingesetzt wird (59) Obwohl die meisten Chemotherapeutika systemisch appliziert werden, wurden auch fokale

Methoden entwickelt, z. B. in Form von intraarterieller Chemotherapie oder intrathekaler Applikation (31).

Trotz aller genannten modernen Therapiemöglichkeiten liegt die mittlere Überlebenszeit für WHO-Grad-IV-Tumore bei 9-12 Monaten und bei etwa 2 Jahren für anaplastische Astrozytome (WHO-Grad III). Der Hauptgrund für diese schlechte Prognose ist die diffuse Invasion einzelner Tumorzellen in das umgebende Gehirngewebe. Aufgrund der rapiden Dissimination einzelner Zellen können Glioblastome nicht als lokale oder fokale Erkrankung angesehen werden. Diese diffuse Natur der Glioblastome beschränkt die Effektivität von lokalen therapeutischen Konzepten wie chirurgischer Resektion, Bestrahlung der Tumormasse oder intrathekaler Applikation von Chemotherapeutika und erklärt letztendlich auch die hohe Rezidivrate dieser Malignome (23;31).

1.2 Die Rolle der Extrazellulärmatrix (ECM) bei der Gliominvasion

Die Invasion von Gliomen erfolgt entlang anatomischer Strukturen sowohl beim Menschen als auch bei anderen Säugetieren. Es gibt bevorzugte anatomische Strukturen, die als Substrate für die Ausbreitung von Gliomzellen fungieren, wie z. B. Basalmembranen von Blutgefäßen, der subependymale Raum, die Glia limitans externa sowie Nervenfaserbündel der weißen Substanz. All diese anatomischen Strukturen enthalten eine Vielfalt von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix. Die ECM des Gehirns besteht hauptsächlich aus Laminin, Kollagen Typ IV, Tenascin und Glykosaminoglykanen. Die vier Hauptglykosaminoglykane der grauen und weißen Substanz des Gehirns sind Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Keratinsulfat und Heparansulfat (20). Die vaskulären Basalmembranen enthalten zusätzlich Heparansulfatproteoglykane, Kollagen Typ I, Fibronectin, Vitronectin und Entaktin (10;23).

Die ECM beeinflusst biologische Eigenschaften neuroepithelialer Tumorzellen wie Proliferation, Migration und Differenzierung, z. T. durch direkte Interaktionen, z. T. durch Bindung von Wachstumsfaktoren an Matrixkomponenten. Im Vergleich zum normalen Gehirn ist die ECM in Tumoren verändert, wobei einige Komponenten neoexprimiert werden (z.B. verschiedene β 1-Integrine, Tenascin, Vitronectin, Osteopontin und Kollagen VIII). Astrozytäre Tumorzellen können selten in vivo,

häufig in vitro Basalmembranen und eine fibröse Matrix produzieren. Für die intrakranielle Invasion und die diffuse Infiltration der Gliome ist die Wechselwirkung zwischen Tumorzelle und Matrix verantwortlich. Beispielsweise die Produktion bestimmter matrixdegradierender Enzyme und eine Veränderung der Matrixrezeptoren (überwiegend β 1-Integrine) und anderer Adhäsionsmoleküle (NCAM, L1, CD24) auf der Tumorzelloberfläche (52; 56; 61).

Die Bestandteile der ECM bilden wichtige Strukturen der großen Blutgefäße und der Glia limitans externa. Es ist bislang nicht vollständig geklärt, ob die vorhandene ECM oder Zell-Zell-Interaktionen die Migration der Gliomzellen unterstützen. Es wurde zudem gezeigt, dass die von den Tumorzellen produzierte ECM einen Promotor für die Migration darstellt (18). Dies lässt vermuten, dass die Tumorzellen selbst ein Substrat produzieren können, das ihre Motilität fördert.

1.3 Basalmembran

Bei der Entstehung von malignen Tumoren spielt die Basalmembran eine entscheidende Rolle, denn erst wenn sie überschritten ist, spricht man von invasivem Wachstum. Das entscheidende Merkmal maligner Tumoren liegt in der Fähigkeit ihrer Tumorzellen, das normale Gewebe zu durchsetzen (Invasion) und zu zerstören. Dies führt zu Einbrüchen in Lymph- und Blutgefäße, die Anlass zu Verschleppung und Weiterwachsen des Tumors an anderer Stelle sind (Metastasierung). Gliomzellen sind zwar fähig zur Invasion, offensichtlich aber nicht zur Metastasierung. Denn die Metastasierung setzt das Eindringen in den Metastasierungsweg voraus.

Die Basalmembran ist die Hauptstruktur für die Dissemination von Gliomen im ZNS. Pathologische und experimentelle Methoden haben bestätigt, dass Gliomzellen bevorzugt entlang der Basalmembranen migrieren. Allerdings können Gliomzellen die Basalmembranen nicht penetrieren, um das vaskuläre Lumen zu erreichen. Die gliazugewandte Seite der Basalmembran kann von den Gliomzellen zerstört und penetriert werden, der endotheliale Teil der Basalmembran bleibt aber intakt. Dies könnte das scheinbare Fehlen von systemischen Metastasen erklären (10; 53)

Die Basalmembran liegt der dem Bindegewebe zugewandten Oberfläche von Epithelien, Endothelien, Muskel- und Nervenfasern sowie der Oberfläche des ZNS an.

Ihre Funktion liegt in der Erhaltung der Architektur der Zellschichtung, als Barriere für den Durchtritt von Entzündungs- und Tumorzellen und als Substrat für Zelladhäsion, -wachstum und -differenzierung. Die Basalmembran besteht elektronenmikroskopisch aus zwei Schichten, der *Basallamina* und der *Lamina reticularis*. Die *Basallamina* wird weiter in *Lamina rara* und *Lamina densa* unterteilt.

Die *Lamina reticularis* enthält retikuläre Kollagenfibrillen (Mischung aus Kollagen III und I). Die Hauptkomponenten der *Basallamina* sind Fibronektin, Proteoglykane und Glykosaminoglykane, Entaktin, Nidogen sowie Laminin. Das wichtigste Adhäsionsmolekül der *Basallamina* ist der Laminin-/Nidogenkomplex, der sowohl an Adhäsionsrezeptoren der Zelloberfläche als auch an verschiedene extrazelluläre Komponenten bindet: Kollagen Typ IV der Lamina densa, Seitenketten von Proteoglykanen (8; 10; 11; 52; 54).

Im Gehirn bilden Basalmembranen einen wichtigen Teil der Blut-Hirn-Schranke.

Typ IV Kollagen	Bildet die Grundstruktur der Lamina densa der Basalmembran
Glykoproteine, wie Fibronektin, Vitronektin, Tenascin	Verankerung von Zellen in der extrazellulären Matrix; binden an der Zelloberfläche an Integrine
Proteoglykane	Spielen bei der Haftung und Wanderung von Zellen in der extrazellulären Matrix eine Rolle; perizelluläre Proteoglykane binden und aktivieren verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. FGF, TGFβ)
Laminin	Bindet an Kollagen Typ IV der Lamina densa der Basallamina und an Heparansulfatseitenketten von Glykosaminoglykanen; Hat wachstumsfaktorähnliche Funktion; stimuliert u. a. das Auswachsen und die Elongation von Nervenzellfortsätzen

Tabelle 1.2 Wichtige Bestandteile der ECM und Basalmembranen und ihre Hauptfunktionen

1.4 AMOG/ β 2 (Adhesion molecule on glia)

AMOG/ β 2 ist ein Ca^{2+} -unabhängiges Transmembranprotein, das zur Immunglobulinfamilie der Adhäsionsmoleküle zählt und ein Molekulargewicht von 45-50 kDa aufweist. Es wurde zunächst als Zelladhäsionsmolekül beschrieben, das die Neuronen-Astrozyten-Interaktion, nicht aber die Astrozyten-Astrozyten-Adhäsion, in vitro vermittelt. Weitere Untersuchungen ergaben, dass AMOG/ β 2 mit der α -Untereinheit der Na^+, K^+ -ATPase kopurifiziert wird. Sequenzanalysen zeigten, dass AMOG die β 2-Untereinheit dieser Ionenpumpe bildet. Deshalb wird AMOG auch als AMOG/ β 2 oder β 2-Untereinheit der Na^+, K^+ -ATPase bezeichnet (2).

Die Neuronenmigration, die über Oberflächenkontakte zwischen migrierenden Neuronen und Astrozytenfortsätzen vermittelt wird, kann durch monoklonale AMOG/ β 2-Antikörper gehemmt werden, wahrscheinlich durch die Inhibierung der Neuronen-Glia-Adhäsion (3).

In situ wird AMOG/ β 2 von Astrozyten im Cerebellum während kritischer Entwicklungsstadien der Granularzellmigration exprimiert. Es ist ebenfalls vorübergehend auf Bergmann-Glia-Zellen im frühen postnatalen Cerebellum während der Granularzellmigration nachweisbar. AMOG/ β 2 mRNA kann ab dem 18. embryonalen Tag nachgewiesen werden. Die Expression nimmt bis zum Erwachsenenalter bis auf das Zehnfache zu. Im adulten Gehirn ist der Nachweis von AMOG/ β 2 in der grauen Substanz stärker als in der weißen Substanz, mit der stärksten Expression im cerebellären Kortex (50).

Anfangs ging man davon aus, die AMOG/ β 2 Expression sei auf das ZNS beschränkt, doch später wurde AMOG/ β 2 in unterschiedlicher Menge in einer Vielzahl anderer embryonaler und adulter Gewebe und Organe, wie Herz, Niere, Milz, Prostata und Skelettmuskulatur nachgewiesen (43).

Im ZNS scheint die AMOG/ β 2-Expression auf Astrozyten beschränkt zu sein, es kann im peripheren Nervensystem aber auch auf Photorezeptorzellen in der Retina und in Schwannzellen des Nervus ischiadicus nachgewiesen werden (38; 50). Eine verstärkte AMOG/ β 2-Expression in proliferierenden Schwannzellen deutet darauf hin, dass AMOG/ β 2 als Adhäsionsmolekül in der Regeneration peripherer Nerven eine Rolle spielt (27).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass AMOG/ β 2 das Neuritenwachstum von kleinen cerebellären Neuronen fördert. Das verstärkte Neuritenwachstum auf AMOG/ β 2 transfizierten Fibroblasten konnte durch spezifische Antikörper gegen AMOG/ β 2 gehemmt werden. Vermutlich kann AMOG/ β 2 mit einem unbekanntem neuronalen Rezeptor interagieren und so das Neuritenwachstum verstärken. Diese Adhäsionseigenschaften konnten für die β 1-Untereinheit der Na^+, K^+ -ATPase nicht gefunden werden (46).

Die Rolle von AMOG/ β 2 als Adhäsionsmolekül konnte in *in vitro* Assays gezeigt werden, in denen AMOG/ β 2 enthaltende Liposomen eine zelltypenspezifische Bindung aufwiesen. Es erfolgte eine Interaktion der AMOG/ β 2 enthaltenden Liposomen mit kleinen cerebellären Körnerzellen und Phäochromozytom P12-Zellen, nicht aber mit Neuronen des Rückenmarks, Oligodendrozyten, Astrozyten oder Fibroblasten (4).

Die Na^+, K^+ -ATPase besteht aus zwei Untereinheiten. Der katalytischen α -Untereinheit, welche die Bindungsstellen für ATP, Natrium, Kalium und Herzglykoside umfasst, sowie der β -Untereinheit, die für die Pumpaktivität erforderlich ist (32). Es wird vermutet, dass die β -Untereinheit für die richtige Faltung des Komplexes und die korrekte Lokalisation des Proteins in der Zellmembran verantwortlich ist.

Eine funktionelle Assoziation von AMOG/ β 2 mit der Na^+, K^+ -ATPase wurde zuerst in einem Experiment gezeigt, in dem AMOG/ β 2-Antikörper, die Astrozyten in Kultur zugefügt wurden, zu einer getriggerten Pumpaktivität führten (22)

AMOG/ β 2-knockout-Mäuse zeigten eine normale intrauterine und frühe postnatale Entwicklung. Ab dem 16. postnatalen Tag konnten motorische Koordinationsstörungen, Tremor und Paralyse beobachtet werden. 2-3 Tage nach Auftreten dieser Symptome starben die Mäuse. Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten erweiterte Seitenventrikel, ein Hirnödem, Anschwellen der Astrozytenendfüße im Hirnstamm, sowie eine Degeneration von Photorezeptorzellen in der Retina. Diese Veränderungen resultieren offensichtlich aus Veränderungen im ionischen Gleichgewicht durch die defekte Ionenpumpe (38).

Somit hat AMOG/ β 2 eine duale Funktion: Einerseits als Teil einer Ionenpumpe, andererseits als Adhäsionsmolekül in der Entwicklung des ZNS.

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Mitglieder der Immunglobulinfamilie der Adhäsionsmoleküle sind sowohl in normale als auch in pathologische Prozesse der Migration von Zellen involviert. Im Falle von Gehirntumoren spielt die Invasion einzelner Tumorzellen in das umgebende gesunde Hirngewebe eine wesentliche Rolle

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob AMOG/β2 eine Bedeutung in der Gliominvasion hat. Es wurden bereits einige Adhäsionsmoleküle wie zum Beispiel L1, Integrine, CD44 und Cadherine identifiziert, die vermutlich die Invasion von Gliomzellen begünstigen (52). Eine mögliche Funktion von AMOG/β2 als Adhäsionsmolekül gründet sich auf Ergebnisse vorheriger Studien. Denn AMOG/β2 spielt eine Rolle in der Zellmigration und -adhäsion während früher postnataler Prozesse (3).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid, Bisacrylamid	Bio Rad, Hercules, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxidisulfat)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserum Albumin)	Roth, Karlsruhe
ECL+	Amersham Pharmacia, UK
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd (37%)	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd (25%)	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Kaliumferricyanid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumferrocyanid	Sigma, Deisenhofen
Luciferin	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Matrigel	Becton Dickinson, Bedford, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
SDS (Sodium Dodecylsulfate)	Roth, Karlsruhe
Smart-Ladder DNA-Marker	Eurogenetec, Seraing, Belgien
Temed	Sigma, Deisenhofen
Toluidinblau	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen

Tween 20	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Roth, Karlsruhe
(5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -D-galaktopyranosid)	

Alle weiteren Standard- Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen Merck, Darmstadt und Roth, Karlsruhe bezogen.

2.1.2 Allgemein verwendete Puffer

10x Auftragspuffer: 0,084 g Bromphenolblau

10 ml ddH₂O

10 ml Glycerol

PBS pH 7,4:

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄

TAE-Puffer pH: 8,5:

10 mM Tris-Acetat

1 mM EDTA

TE-Puffer pH: 8,0:

10 mM Tris/ HCl

1 mM EDTA

Weitere Lösungen und Puffer sind bei den Beschreibungen der jeweiligen Methoden aufgeführt.

2.1.3. Antibiotika

Tetracyclinhydrochlorid (Stocklösung 1 mg/ml) Sigma, Deisenhofen
Zeozin (Stocklösung 100 mg/ ml) Invitrogen, San Diego, CA, USA

2.1.4 Enzyme

2.1.4.1 Enzyme in der Zellkultur

β-Galaktosidase Sigma, Deisenhofen

2.1.4.2 Restriktionsenzyme

AatII

Bgl II

EcoR I

Xba I

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs GmbH, Schwalbach/ Taunus bezogen.

2.1.5 Sequenzierprimer

AMOGfrw

5`-GCA GCA GTC GTA TAT CTG AC-3`

AMOGrev

5`-ATT CCA GAA GCA TCC ACA G-3

Die verwendeten Primer wurden von MWG- Biotech AG, Ebersberg bezogen.

2.1.6 Plasmide

pBI-2 Expressionsplasmid

pBI-AMOG Expressionsplasmid (s. unten)

pZeotTA Expressionsplasmid (s. unten)

Die Plasmide pBI-AMOG und pZeotTA wurden von Frau Inge Baur und Herrn Dr. Volker Senner (Institut für Neuropathologie, Münster) kloniert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

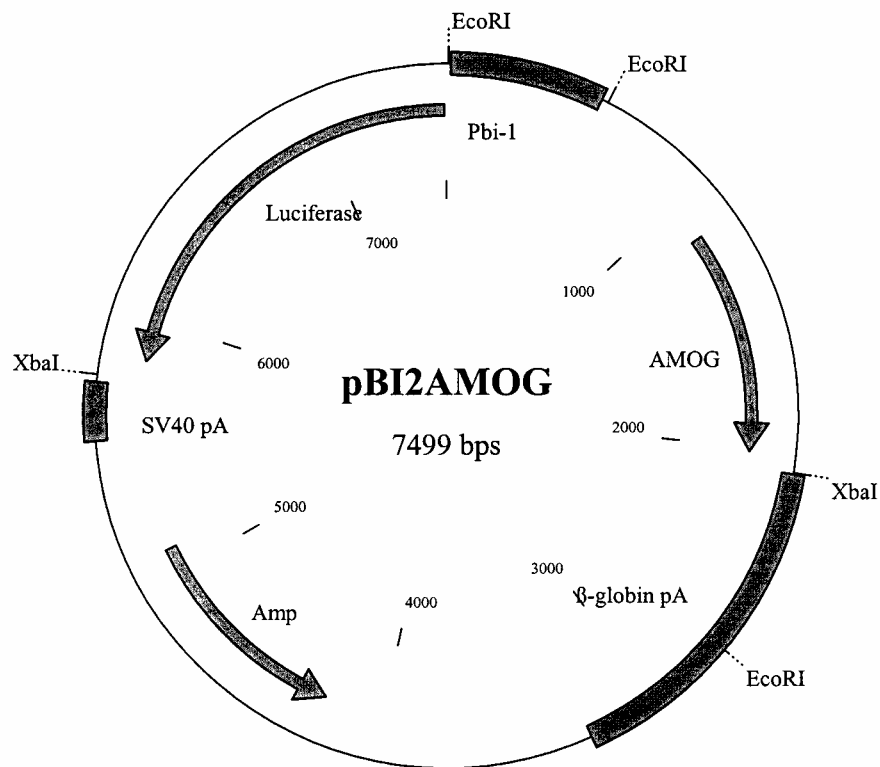


Abb.2.1 pBI-AMOG Expressionsplasmid

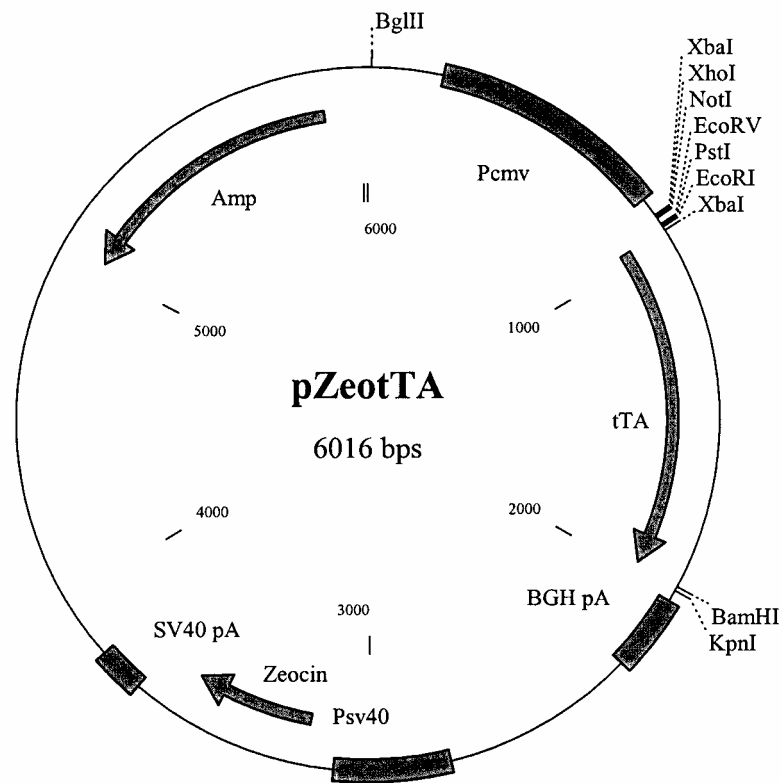


Abb 2.2 pZeotTA Expressionsplasmid

2.1.7 Eukaroytische Zellkultur

Zelllinien:

C6 Rattengliomzellen (Benda und Mitarbeiter, 1968): Rattengliomzellen mit fibroblastenähnlichem Wachstum

C6TL Rattengliomzellen (Paulus und Mitarbeiter, 1997): C6-Rattengliomzellen mit einem tetracyclinabhängigen Transaktivator und dem Reportergen *lacZ*.

U87 (Ponten und Mitarbeiter, 1968): humane Gliomzelllinie mit epithelähnlichem Wachstum, Tumor: glioblastoma-astrocytoma

U343 (Ponten und Mitarbeiter, 1968): humane Gliomzelllinie

U373 (Ponten und Mitarbeiter, 1968): humane Gliomzelllinie mit epithelähnlichem Wachstum, Tumor: glioblastoma-astrocytoma

86HG39 (Bilzer und Mitarbeiter, 1991): humane Gliomzelllinie

Die Zelllinien wurden bei 37°C und in einem Luft-Kohlendioxidgemisch (5% CO₂) im CO₂-Inkubator in DMEM mit 10% FCS kultiviert.

2.1.8 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

DMEM (Dulbecco's Modifikation des MEM) mit stabilem Glutamin

FCS (Fetal Calf Serum)

PBS ohne Ca/Mg

Penicillin G (100 U/ml)/ Streptomycin (100 mg/ml)

Trypsin/ EDTA (1%)

Alle Zellkulturmedien und -lösungen wurden von PAA, Linz, Österreich bezogen.

2.1.9 Antikörper:

Primäre Antikörper:

α 426: Ratte-Anti-Maus-AMOG-Antikörper	Bartsch, et al. (1996)
Maus-Anti-Ratte-Na,K-ATPase beta 2 fusion protein	Upstate Technology, Dundee, Scotland
Maus-Anti-Ratte-Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase β2	Transduktion Laboratories, Newington, USA
Kaninchen-Anti-Aktin (A-2066)	Sigma, Deisenhofen
(Verdünnung der Antikörper für den Western-Blot (s 2.2.8) 1:5000)	

Sekundäre Antikörper:

TRITC-konjugierter Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Sigma T6778) aus der Ziege

FITC-konjugierter Antikörper gegen Ratten-IgG (F-6258) aus der Ziege

Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen Maus-IgG (A-3682) aus der Ziege

Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen Kaninchen-IgG (S-2074) aus der Ziege

Alle Sekundärantikörper wurden von Sigma, Deisenhofen bezogen.

2.1.10 Geräte

„Hera Safe“ - Sterilbank	Heraeus, Hanau
„Lumat“ - Brutschränke	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge: Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Megafuge 1,0 R	Heraeus, Hanau
<u>Mikroskope:</u> ▪ Olympus CK 30	Olympus, Tokyo, Japan
▪ Olympus IX-50	

Sonstige Hilfsmittel:

Sedimentationszylinder für Migrationsassay:

- Innendurchmesser: 1,2 mm
- Außendurchmesser: 7,0 mm
- Höhe : 10,0 mm

(Spezialanfertigung von Merck, Darmstadt)

Chamber Slides	Nunc, Naperville, IL; USA
DP10 Digitalkamera	Olympus, Tokyo, Japan
Allgemeine Laboratoriumsmaterialien	Eppendorf, Hamburg Saarstedt, Nürnbergrecht
Röntgenfilme	Kodak, Rochester, MN, USA
Farb-Diafilme	Fuji Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf, Germany

Computerprogramme:

- Sigma Scan Pro (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA)
- Gel Documentation System Image Store 7500, Version 720 (Ultra Violet Products, Cambridge, England)

Absorptionsmessung:

Spektrophotometer Multiscan EX	Labsystems, Göteborg, Finnland
--------------------------------	--------------------------------

Zellzahlbestimmung:

CASY 1	Schärfe System, Reutlingen
(Cell Counter + Analyser System Model DT)	

2.2 METHODEN

2.2.1 Kultivierung von Säugetierzellen

2.2.1.1 Allgemeine Handhabung

Alle Arbeiten zur Kultivierung der Zellen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen unter der Sterilbank durchgeführt. Diese wurde mindestens eine halbe Stunde vor Gebrauch zunächst mit 70% Ethanol gereinigt und dann durch Umluftfiltration in einen sterilen Zustand gebracht. Alle zu verwendenden Medien, sowie PBS und Trypsin/EDTA wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Die verwendeten Medien, Geräte und weiteren Hilfsmittel wurden autoklaviert oder steril filtriert.

2.2.1.2 Auftauen von Säugetierzellen

Die Zellen wurden in Kryo-Röhrchen aus flüssigem Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bis gerade noch eine kleine Eisschicht an der Oberfläche zu sehen war. In einem Sarstedt-Röhrchen wurden 9 ml Medium vorgelegt und anschließend die aufgetaute Zellsuspension von 1 ml hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde bei RT für 5 Min. bei 500 x g abzentrifugiert und anschließend bei 37°C im Brutschrank bei 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert.

2.2.1.3 Mediumwechsel und Subkultivierung von Säugetierzellen

Das Nährmedium der Säugetierzellen wurde alle zwei bis drei Tage nach dem folgenden Schema gewechselt:

- Absaugen des Medium mit der Pasteurpipette
- Waschen der Zellen mit PBS
- Hinzufügen von neuem Medium (DMEM mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycinsulfat).

Wenn der Boden der Kulturflasche von den Zellen vollständig eingenommen wurde, erfolgte die Subkultivierung der Zellen nach folgenden Schritten:

- Absaugen des Mediums mit der Pasteurpipette
- Zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS
- Inkubieren der Zellen mit Trypsin/ EDTA für 3-5 Min. bei 37°C
- Resuspendieren der Zellen in serumhaltigem Medium zum Stoppen der proteolytischen Wirkung des Trypsins und Abzentrifugieren für 5 Min. bei RT bei 500 x g
- Verdünnen der Zellen je nach Bedarf im Verhältnis 1:3 oder 1:10
- Aussäen der Zellen auf neue Kulturgefäße und Zugabe von neuem Medium

Die Volumina für die einzelnen Lösungen sind in unten stehender Tabelle aufgeführt.

Volumen für Zellkulturarbeiten

Zellkultur-Gefäß	Medium	PBS	Trypsin
96 well	Ca. 200µl	Ca. 200 µl	1-2 Tropfen
24 well	1 ml	Ca. 500 µl	3-4 Tropfen
6 well	2-3 ml	Ca. 1 ml	100-200 µl
10 cm Schalen	10 ml	Ca. 5 ml	1-1,5 ml
25 cm ² Flaschen	5 ml	Ca. 2 ml	Ca 500 µl
75 cm ² Flaschen	10-15 ml	Ca. 5 ml	1-1,5 ml
175 cm ² Flaschen	20-25 ml	Ca. 10 ml	2-2,5 ml

2.2.1.4 Langzeitlagerung und Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden wie in 2.2.1.3 gewaschen, trypsinisiert und in Medium aufgenommen. Danach wurde die Zellsuspension in einem 15 ml-Röhrchen bei RT bei 500 x g für 5 Min. abzentrifugiert und anschließend das Zellpellet in Einfriermedium (1 Volumen DMSO und 9 Volumen Medium mit 10% FCS, zuvor frisch angesetzt) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde à 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert, die zunächst in einem Styroporbehälter für 12 h bei -80°C gelagert, und dann in den Flüssigstickstoffbehälter (-196°C) überführt wurden.

2.2.1.5 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem CASY 1 Model TT. Das Gerät wurde zunächst für die Zählung von fibroblastenähnlichen Zellen voreingestellt:

- Verdünnung: 1: 1000
- Probevolumen: 400 μ l
- Zähl-Bereich: 10- 30 μ m

Für die Zählung der Probe wurden die Zellen zuvor gewaschen, trypsinisiert, bei RT und 500 x g für 5 Min. abzentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml serumhaltigem DMEM aufgenommen. Ein Probenbecher wurde mit 10 ml CASYTON befüllt und anschließend 10 μ l der Zellsuspension hinzugegeben. Der Probenbecher wurde unter die Messkapillare gestellt und mit Hilfe des Gerätes wurde entsprechend der Voreinstellungen die Zellzahl der Suspension mit einer Doppelmessung bestimmt.

2.2.2 Präparation von Nucleinsäuren

2.2.2.1 Linearisierung der Plasmid-DNA

Die für die stabile Transfektion der C6TL-Zellen benötigte DNA wurde zuvor linearisiert.

Für das Plasmid pBI-2-AMOG wurden 100 μ g DNA in einem Gesamtvolumen von 100 μ l mit dem Restriktionsenzym AatII nach folgendem Ansatz linearisiert:

pBI-2-AMOG: 33 μ l pBI-2-AMOG (entspricht 100 μ g)

10 μ l Puffer 4 (NEB)

1 μ l AatII

56 μ l ddH₂O

100 μ l

Für das Plasmid pZeotTA wurden 40 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit dem Restriktionsenzym BglII nach folgendem Ansatz linearisiert:

pZeotTA: 21 µl pZeotTA (entspricht 40 µg)
 10 µl Puffer 3 (NEB)
 1 µl BglII
68 µl ddH₂O
 100 µl

Die Bedingungen des Restriktionsverdaus entsprachen den Herstellerangaben.

Die Ansätze wurden für 6h bei 37°C inkubiert.

2.2.2.2 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die Linearisierung der Restriktionsansätze wurde durch Horizontal- Elektrophorese in 0,8% Agarosegel überprüft. Die Agarose wurde zunächst in 1 x TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und in einen Gelträger gegossen. Je 1 µg der zu untersuchenden Proben wurde nach Zusatz von 10fach Auftragspuffer in eine Proben tasche des Gels aufgetragen und bei einer Feldstärke von 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Der Agarose wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugegeben, so dass die DNA-Fragmente im Gel auf einem UV-Leuchttisch bei 302 nm betrachtet werden konnten. Die Dokumentation des Gels erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationssystems „Gel Documentation System Image Store 7500, Version 7.20; (Ultra Violet Products, Cambridge, England).

Probenpuffer: 0,084 g Bromphenolblau

10 ml Glycerol

10 ml ddH₂O

2.2.2.3 Phenolextraktion und Ethanolfällung

Nach erfolgter Linearisierung wurden die in 2.2.2.1 beschriebenen Ansätze nach dem Qia Quick PCR Purification Kit Protocol nach Herstellerangaben aufgereinigt, um die modifizierenden Enzyme aus der DNA zu entfernen

2.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration und Reinheit der DNA-Lösungen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht hierbei einer Konzentration von 50µg doppelsträngiger DNA pro ml. Reine Plasmid DNA besitzt einen Koeffizienten der optischen Dichten bei 260/280 nm zwischen 1,8 und 2,0.

2.2.2.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger durch Zugabe von ddNTPs (54). Für die Durchführung wurde das SequiTerm EXEL II Long-Read DNA Sequencing Kit-ALF (Epicentre Technologies, Madison, Wisconsin, USA) verwendet. Die Sequenzierungsreaktionen wurden wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt. Die verwendeten Primer AMOGfrw und AMOGrev wurden von MWG-Biotech AG, Ebersberg bezogen (Sequenz s. 2.1.5).

Auftrennung und Analyse der Sequenz erfolgten mit dem DNA-Analyser 4200 der Firma Li-Cor.

Um die vollständige Sequenz zu bestimmen, wurden die Fragmente zunächst denaturiert, damit die einsträngigen Oligonukleotide freigesetzt werden können. Danach wurden sie einer Gelelektrophorese auf einem Polyacrylamidgel unterworfen und die Sequenz durch Ablesen von 5' nach 3' direkt aus dem Gel abgelesen. Für das Polyacrylamidgel verwendeten wir eine Fertiglösung für Sequenziergele (SequaGel XR, 1 Liter, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Germany).

2.2.3 Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

2.2.3.1 Stabile Transfektion

Zur stabilen Transfektion von Zellkulturzellen wurde das „Effectene Transfection Kit“ (QIAGEN, Hilden, Germany) verwendet. Um die Effizienz der Integration der Plasmid-DNA zu erhöhen, wurde diese vor dem Transfer linearisiert. Das Plasmid pBI-AMOG wurde mit dem Restriktionsenzym AatII, das Plasmid pBZeotTA mit dem Restriktionsenzym BglII linearisiert.

Zur Herstellung der Transfektionslösung wurden 28,6 ml DNA-Gemisch (2,75 µl linearisiertes pZeotTA und 25,875 µl linearisiertes pBI-AMOG) mit EC-Puffer vermischt und auf ein Endvolumen von 1200 µl gebracht. Anschließend wurden 34,8 µl Enhancer (entspricht 8 µl Enhancer/µg DNA) zugefügt und für 2-5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 120 µl Effectene-Transfektionsreagenz zu dem DNA-Enhancer-Gemisch. Nach kurzem Vortexen wurde die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diesem Transfektionsgemisch wurden anschließend 7200 µl DMEM hinzugefügt.

Am Vortag der Transfektion wurden etwa 1×10^5 Zellen pro Vertiefung in einer 6-well Schale ausgesät. Pro Vertiefung wurden 3 ml DMEM vorgegeben. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen zwei mal mit PBS gewaschen und pro well anschließend 1,6 ml DMEM hinzugegeben. 713 µl DNA-Effectene-Gemisch wurden tropfenweise, unter gleichzeitigem Schwenken der Kulturschalen, ins Medium gegeben. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen 16 h bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Danach wurde die Transfektionslösung abgesaugt. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und mit 1,6 ml frischem Medium versetzt.

Am nächsten Tag erfolgte der Transfer der transfizierten Zellen auf 10 cm Schalen. Dafür wurden die Zellen zunächst 2x mit PBS gewaschen und dann mit 200 µl Trypsin abgelöst. Nach Inkubation von 3 min bei 37 °C wurden die Zellen in jeweils 1 ml Medium resuspendiert, die Zellsuspensionen in einem Sarstedt-Röhrchen vereinigt und für 5 min bei Raumtemperatur und 500 x g abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml Medium aufgenommen und jeweils 1ml auf eine neue Schale überführt, in die zuvor 9 ml Medium vorgelegt wurden.

Nach 14tägiger Selektion mit 500 mg/ml Zeozin war eine deutliche Koloniebildung zeozinresistenter Zellen zu erkennen. 33 dieser Klone wurden zu Zelllinien expandiert.

2.2.3.1 Selektion mit Zeozin

Das zur Kotransfektion verwendete Plasmid pZeotTA trägt das Resistenzgen gegen das Antibiotikum Zeozin, das zur Selektion der stabil transfizierten Zellen eingesetzt wurde. 48 Stunden nach der Transfektion wurde dem Medium Zeozin in einer Konzentration von 500 µg/ml (Stocklösung 100 mg/ml) hinzugefügt. Diese Selektion erfolgte über 14 Tage, mit Mediumwechsel jeweils alle zwei Tage und tötet die nicht transfizierten Zellen ab. Zeozin wird bei -20°C aufbewahrt und wird lichtgeschützt auf Eis aufgetaut.

2.2.3.2 Picken von Kolonien

Die zeozinresistenten Klone wurden zu einzelnen Zelllinien expandiert. Dazu wurden die selektionierten Kolonien von den 10 cm Schalen auf eine 96 well Platte überführt. Zunächst wurde in die 96 well (Greiner, Frickenhausen) nach Anzahl der zu pickenden Kolonien jeweils 200 µl Medium pro Vertiefung vorgelegt. Die zu pickenden Klone wurden markiert und ein steriler, zuvor in steriles Silikonfett gestellter Klonierungszylinder, wurde über die Kolonie gestülpt und leicht festgedrückt. Mit einer Glaspipette wurden 2 Tropfen Trypsin in jeden Zylinder pipettiert und 3 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 100 µl Medium in die Glaszylinder pipettiert. Unter Resuspension wurden die Zellen aufgenommen und in die zuvor vorbereitete 96 well überführt. Der Erfolg des Transfers wurde unter dem Mikroskop überprüft.

2.2.4 Indirekte Immunfluoreszenz

2.2.4.1 Beschichten der Deckgläser mit Poly-L-Lysin

Zuvor mit 70% Ethanol sterilisierte Deckgläschen wurden am Vortag der Immunfluoreszenzmarkierung mit jeweils 250µl einer Poly-L-Lysin-Lösung (Stammkonzentration 1mg/ml) beschichtet und 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung abgesaugt und es folgten zwei Waschschrirte mit jeweils 1ml PBS.

2.2.4.2 Herstellung der Deckglaskulturen

Adhärent wachsende Zellen wurden trypsinisiert und ca. 1×10^5 Zellen auf die zuvor mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen in Vertiefungen einer 6-well-Platte gebracht. Dann wurden 3 ml Medium zugegeben und die Zellen bei Standardbedingungen weiterkultiviert.

2.2.4.3 Fixierung

Die Zellen auf dem Deckgläschen wurden 1x mit PBS gewaschen und zunächst für 10 min bei Raumtemperatur mit 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und für 20 min mit 0,5% BSA/PBS geblockt, um kreuzreagierende Bindungsstellen abzusättigen.

2.2.4.4 Antikörperinkubation

Die Markierung des Antigens mit dem Antikörper ist im folgenden schematischen Ablauf beschrieben. Alle Schritte wurden in der 6-well-Platte, deren Deckelinnenseite mit einem feuchten Filterpapier versehen wurde, bei Raumtemperatur durchgeführt.

- 1. Antikörper (60 min): α -AMOG 426 (42) unverdünnt, je 100 µl pro Deckglas
- Waschen: 3x mit PBS
- 2. Antikörper (60 min, lichtgeschützt): FITC- konjugierter Antikörper gegen Ratten- IgG aus der Ziege 1:128 verdünnt (in 0,5% BSA in PBS)
- Waschen: 3x mit PBS

- Gegenfärbung der DNA mit interkalierendem Farbstoff für 2 min (1 µg Hoechst 33258 (bis-Benzimide H 33258, Sigma) pro ml PBS)
- Waschen: 3x mit PBS
- Einbetten der Zellen mit Flouromount (DAKO) auf einem Objektträger und Versiegeln mit handelsüblichem Nagellack

2.2.4.5 Mikroskopie

Die Auswertung der Präparate erfolgte in einem Fluoreszenzmikroskop (IX-50, Olympus). Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden die Präparate auf einem 400 ASA-Farb-Diafilm (Fuji, Düsseldorf, Germany) festgehalten.

2.2.5 Luciferaseassay

Die Luciferaseaktivität der stabil transfizierten Klone wurde durch einen Luciferaseassay (60) ermittelt. Die transfizierten Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen in 6-well-Platten ausgesät. Je Klon erfolgte die Kultivierung mit und ohne Tetracyclin (1 µg/ml). Nach 48 h wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Dann wurde pro Vertiefung 100 µl Lysereagenz zugegeben. Die lysierten Zellen wurden mit einem Gummispatel abgelöst und Zelldetritus in einer Tischzentrifuge (4 min; 4°C; 1300 U/min) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und für den Versuch verwandt. In einem Luminometer wurden 20 µl Lysat und 80 µl Luciferasereagenz gemischt und das emittierte Licht der Chemolumineszenz über eine Zeitdauer von 10 sec gemessen. Die Messdaten wurden in RLU (Relative Light Units) angegeben. Die RLU wurden auf den Gesamtproteingehalt des Zelllysates in RLU/µg Protein normiert.

Luciferasepuffer:

- 5 ml 0,5M Glycylglycin (25 mM)
 - 1,5 ml 1M MgSO₄ (15 mM)
 - 4 ml 0,1M EGTA (4mM)
- ad 100 ml ddH₂O; mit 5N NaOH auf einen pH von 7,8 einstellen und bei 4°C lagern.

Lyse-Puffer:

- 5 ml Luciferasepuffer
- 500 µl 10% Triton x-100 (1%)
- 5 µl 1M DTT (1mM)

Luciferasereagenz:

- 4,5 ml Luciferasepuffer
- 900 µl 0,1M Kaliumphosphat (pH 7,8)
- 60 µl 0,1M DTT
- 60 µl 0,2M ATP

1 x Luciferin:

- 4 ml Luciferasepuffer
 - 1 ml 5x Luciferin
- auf Eis und lichtgeschützt gelagert

2.2.6 Gesamtzelllysate für Western-Blots

Für den Western-Blot wurden die Zellen nach folgendem Schema gewonnen:

- Absaugen des Mediums
- 1x Waschen mit PBS
- PBS absaugen
- Lyse von 1×10^6 Zellen in 10 cm Schalen mit 500 µl Lysepuffer (s. unten)
- Zellen vorsichtig mit einem Kunststoffspatel ablösen und in ein Eppie überführen, bis zur Verwendung auf Eis lagern

Lysepuffer:

10 mM Tris/ HCL (pH 8,0)

150 nM NaCl

2% Igepal

1% Na-Desoxycholat

1 mM EDTA

1 mM PMSF

2.2.7 Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem DC-Proteinkit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) nach der von Lowry (37) beschriebenen Methode. Die Lowry-Proteinbestimmung beruht auf zwei Reaktionen:

1. Bildung eines blau-violetten Komplexes zwischen Peptidbindung und Kupfer (II)-Ionen in alkalischer Lösung.
2. Bildung eines blauen Komplexes unter Reduktion von Heteropolysäuren (enthalten im Folin-Phenol) durch aromatische Aminosäuren unter Bildung von Mischoxiden.

Die Volumina der zu bestimmenden Proteinlösungen sowie der BSA-Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration (zur Erstellung einer Eichgeraden) wurden mit Lysepuffer (s. unter 2.2.6) auf 300 µl eingestellt. Die Bestimmung der Extinktion bei 595 nm erfolgte nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur.

2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (30).

In einer Minigelapparatur der Firma Bio-Rad (Hercules, CA, USA) wurde ein 10%iges Trenngel in der Größe 160 x 10 x 1,5mm (B x H x T) gegossen, welches nach der Polymerisation mit einem 6%igen Sammelgel überschichtet wurde. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Nach Auftragen von 20-40µg Proteinmenge auf das Gel wurde die Elektrophorese für 1- 1½ h bei Raumtemperatur und einer konstanten Stromstärke von 35 mA durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Trenngel: (Doppelansatz) 10%ig

Acrylamid/ Bisacrylamid (30%)	4,7 ml
Lower Tris	3,5 ml
H ₂ O	5,8 ml
AP (10%)	100 µl
TEMED	20 µl

Sammelgel:

Acrylamid /Bisacrylamid (30%)	1,66 ml
Upper Tris	2,5 ml
H ₂ O	5,8 ml
AP (10 %)	80 µl
TEMED	20 µl

Lower Tris:

1,5 M Tris HCl (pH 8,8)
0,4% SDS

Upper Tris:

0,5 M Tris HCl (pH 6,8)
0,4% SDS

2.2.9 Western-Blot

Der Proteintransfer auf eine Membran mit anschließender Immunreaktion (Western-Blot) wurde in Anlehnung an Towbin (63) durchgeführt.

Die mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schüll, Dassel, Germany; BA83; 0,2 µm) überführt. Der Proteintransfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) bei konstant 250 mA und 4°C für 1 Stunde.

Die Nitrocellulose-Membran wurde dann nach folgendem Schema behandelt (alle Schritte bei Raumtemperatur und auf einem Schwenktisch):

- Waschen: 10 min in TST
- Blocking: Inkubation in 5% Magermilchpulver (Fluka) in TST für 30 min
- 1. Antikörper (s. 2.1.8) 1:5000 in 5% Magermilchpulver in TST verdünnt, 60 min Inkubation
- Waschen: 3x 10 min in TST
- Blocking: Inkubation in 5% Magermilchpulver in TST für 30 min

- 2. Antikörper (s. 2.1.8) 1:10000 verdünnt in 5% Magermilchpulver in TST, 60 min Inkubation
- Waschen: 3x 10 min in TST
- Applikation von ECL+Plus (Amersham, Braunschweig, Germany) für 5 min
- Exponieren der Membran auf Kodak XOMAT-Film (Kodak, Rochester, MN, USA) zu unterschiedlichen Zeitpunkten

TST-Puffer:

- 10 mM Tris/HCL (pH 7,6)
- 150 mM NaCl
- 0,05% Twen 20

2.2.10 Extraktion von Myelin

Das Myelin für die Migrationsversuche wurde aus Mausgehirnen isoliert.

Die von Norton etablierte Methode (49) wurde an den Beckmann SW 40Ti-Rotor adaptiert.

Präparation von Myelin

Die Mausgehirne wurden mit einem Skalpell in grobe Stücke zerteilt. Von diesem Zeitpunkt an wurde auf Eis gearbeitet. Die Myelinisolierung ist im folgenden schematisch beschrieben.

Schritt 1:

- Homogenisieren der Mausgehirne in 40 ml 0,32 M Saccharose- Lösung mit einem Ultra-Thurax
- Auffüllen mit 0,32 M Saccharose- Lösung auf 42 ml
- Vorlegen von jeweils 5,25 ml 0,85 M Saccharose- Lösung in 6 Beckmann Polyallomer Zentrifugenröhrchen
- Je 7 ml Homogenisat über die 0,85 M Saccharose- Lösung schichten
- Zentrifugieren im Beckmann SW 40 Ti-Rotor : 75.000 x g, 30 min
- Das Rohmyelin mit einer Pasteurpipette aus der Grenzschicht entnehmen und vereinigen, die Saccharose- Lösung verwerfen

Schritt 2:

- Das vereinigte Rohmyelin in ddH₂O resuspendieren und mit ddH₂O auf 73,5 ml Volumen einstellen
- Jeweils 12,25 ml Suspension in 6 Beckmann Polyallomer Zentrifugenröhrchen füllen
- Zentrifugieren im Beckmann SW 40 Ti-Rotor: 75.000 x g, 15 min
- Überstand verwerfen

Schritt 3:

- Die Pellets in ddH₂O aufnehmen, vereinigen und auf 73,5 ml Gesamtvolumen einstellen
- Jeweils 12,25 ml Suspension in 6 Beckmann Polyallomer Zentrifugenröhrchen füllen
- Zentrifugieren in Beckmann Statos Zentrifuge: 12.00 x g, 10 min

Schritt 4:

- Wiederholung von Schritt 3

Schritt 5:

- Die Pellets in 0,32 M Saccharose- Lösung resuspendieren, vereinigen und mit 0,32 M Saccharose- Lösung auf 42 ml Gesamtvolumen einstellen
- In 6 Beckmann Polyallomer Zentrifugenröhrchen jeweils 5,25 ml 0,85 M Saccharose- Lösung vorlegen
- Je 7 ml Homogenisat über 0,85 M Saccharose- Lösung schichten
- Zentrifugieren im Beckmann SW 40 Rotor: 75.000 x g, 30 min
- Das aufgereinigte Myelin mit einer Pasteurpipette aus der Grenzschicht entnehmen und vereinigen, die Saccharose- Lösung verwerfen

Schritt 6:

- Das vereinigte Rohmyelin mit ddH₂O auf 73,5 ml Gesamtvolumen einstellen
- Jeweils 12,25 ml Suspension in 6 Beckmann Polyallomer Zentrifugenröhrchen füllen
- Zentrifugieren im Beckmann SW 40 Ti-Rotor: 75.000 x g, 15 min
- Überstand verwerfen

Schritt 7:

- Die Pellets in ddH₂O aufnehmen und auf 36,5 ml Volumen einstellen

- Zentrifugieren in Beckmann Stratos Zentrifuge: 12.000 x g, 15 min
- Überstand verwerfen
- Pellets in möglichst wenig ddH₂O aufnehmen und vereinigen
- Mit dem Ultra-Thurrax homogenisieren
- Die Probe wird lyophilisiert und deren Gewicht bestimmt

Das Myelin wurde in einem entsprechenden Volumen ddH₂O aufgenommen, um eine Stockkonzentration von 15,3 mg/ml zu erhalten.

2.2.11 In vitro Versuche

2.2.11.1 Monolayermigrationsassay

Der in vitro Migrationsassay wurde in Anlehnung an Giese 1995 (18) durchgeführt. Es wurde zunächst ein Ansatz für die Beschichtung der Chamber-Slides (Nunc, Napperville, IL, USA, s. Abb.) nach der „thin coating method“ mit serumfreiem, Penicillin- und Streptomycin- haltigem DMEM und Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA) bzw. Myelin hergestellt.

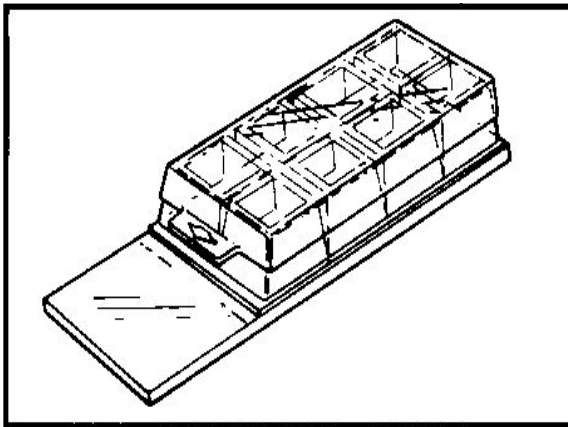


Abbildung 2.1 Skizze einer Chamber-Slide

Anschließend wurde die im folgenden schematisch dargestellte Beschichtung der Chamber-Slides durchgeführt:

- Einfüllen von 200 µl des Ansatzes pro Kammer
- 1 h Inkubation bei 37°C

- Absaugen der Matrigel-/ Myelinlösung (Stockkonzentration: 15,3 mg/ml) aus den Kammern
- Waschen: 3x mit PBS
- Pro Kammer 200 μ l 1% BSA/PBS aufgeben, 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
- Waschen: 3x mit PBS
- Aufbewahrung in PBS in feuchter Kammer bei 4°C bis zum Gebrauch

Sedimentation der Zellen mittels Glaszylinder:

In die zuvor mit Matrigel oder Myelin beschichteten Kammern wurden 200 μ l serumhaltiges DMEM vorgelegt. Sterile Glaszylinder wurden in ein geeignetes Gefäß getaucht, damit sich die Glaskapillare füllte und anschließend in die Mitte einer Kammer gestellt. Bis zum Einfüllen der Zellen wurde die Chamber-Slide bei 4°C aufbewahrt.

Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert und ausgezählt und eine Suspension von 2×10^6 Zellen pro ml hergestellt. Von dieser Zellsuspension wurde je ein μ l (entspricht ca. 2000 Zellen) in einen Glaszylinder gefüllt. Die Chamber-Slide wurde für 30 min bei 4°C inkubiert und danach für 16 h bis zum Entfernen der Zylinder im Brutschrank bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre aufbewahrt.

Fixierung und *lacZ*- Färbung der Zellen:

Nach der Entfernung der Sedimentationszylinder unter der Sterilbank wurden die Zellkolonien nach 0 h, 48 h und 96 h bei Raumtemperatur nach folgendem Schema fixiert und gefärbt:

- Absaugen des Medium
- Waschen: 3x mit PBS (jede Kammer separat)
- Entfernen der Aufsätze der Chamber-Slide
- Fixieren der Objektträger mit 0,5% Glutaraldehyd für 5 min
- Waschen: 2x mit PBS

- In Assay-Mix (1mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -d-Galaktopyranosid (X-Gal), 5 mM $K_3 Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4 Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$ in PBS pH 7,4) für 12 h bei 37°C färben
- Waschen: 2x mit PBS
- Eindeckeln mit Faramount

Auswertung der Migration

Die Dokumentation erfolgte mit einer Digital-DP-10 Kamera (Olympus, Tokyo, Japan). Um die Zellmigration zu quantifizieren, wurde die SigmaScan Pro automated image analysis Software (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA) verwendet. Hierfür wurde das Bild einer Kolonie in das Programm Jandel Scientific SigmaScan Pro 4.0 übernommen. Zunächst erfolgte je nach verwendetem Objektiv die entsprechende Kalibrierung (*Measure* → *Calibrate Distance and Area*). Der Umfang der Kolonie wurde manuell um die Kolonie positioniert und mit Hilfe der Software so die Fläche der Kolonie ermittelt (*Meausure* → *Trace Measurement Options*). Aus den Differenzen der Flächen der Kolonien bei 0h, 48h und 96h wurde die Migrationsstrecke ermittelt. Die Daten von jeweils drei 8fach-Messungen wurden in das Programm Microsoft Exel exportiert und mit Hilfe dieses Programmes statistisch nach dem t-Test-Verfahren ausgewertet.

2.2.11.2 Adhäsionsassay

Um das Adhäsionsverhalten der AMOG/ β 2-transfizierten Zellen mit den AMOG/ β 2-negativen C6TL-Zellen zu vergleichen, wurde folgender in vitro Adhäsionsassay durchgeführt.

Zunächst wurde eine 96 well (Greiner, Frickenhausen, Germany) mit Matrigel bzw. Myelin beschichtet. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit 500, 100, 10, 1, 0.1 μ g/ml Matrigel in serumfreiem Medium hergestellt. Jeweils 10 wells wurden mit je 100 μ l einer jeden Verdünnung gefüllt, 10 weitere wells erhielten nur serumfreies Medium ohne Matrigel und dienten als Kontrolle. Die Beschichtung erfolgte nach unten stehendem Schema:

Tag 1:

- 1 h Inkubation bei 37°C, anschließend Absaugen des Mediums
- Waschen: 3x mit PBS
- Je 100 µl 1% BSA/PBS (steril filtriert) pro well, Inkubation für ½ h bei Raumtemperatur, anschließend absaugen
- Waschen: 3x mit PBS
- Aussaat von 1×10^6 Zellen pro Vertiefung (in 100µl serumfreiem Medium)
- Inkubation für 1 h bei 37°C
- Absaugen der Zellen
- Waschen: 3x mit je 200 µl PBS
- Je 100 µl 3,7 % Formaldehyd/PBS aufgeben, Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur
- Zugabe von 100 µl 0,5 % Toluidinblau in 3,7 % Formaldehyd/PBS, Inkubation über Nacht bei 4°C

Tag 2:

- Färbelösung absaugen
- Waschen: 4x mit 200 µl ddH₂O; anschließend absaugen und an der Luft trocknen lassen
- Zugabe von 100 µl 2 % SDS in ddH₂O, ca. 15-20 min auf dem Schüttler zur Lyse der Zellen
- Messung der Extinktion im ELISA-Reader bei 630 nm

Die Extinktion verlief im gemessenen Bereich linear zur Zelladhäsion.

Auch hier wurde die Signifikanz der Messwerte nach dem t-Test-Verfahren bestimmt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Reexpression von AMOG/ β 2 in stabil transfizierten Gliomzelllinien

Die Fragestellung der Arbeit machte die Etablierung einer stabil transfizierten Gliomzelllinie erforderlich. Durch die Kotransfektion des Expressionsplasmids pBI2-AMOG und des Zeozinresistenzgens im Vektor pZeotTA sollte eine C6-Gliomzelllinie mit Tetracyclin regulierbarer AMOG/ β 2-Expression erzeugt werden, um die Adhäsions- und Migrationseigenschaften AMOG/ β 2-positiver und -negativer Zellen miteinander vergleichen zu können.

3.1.1 Transfektion mit pBI-AMOG

Um die AMOG/ β 2-Expression in einer Gliomzelllinie zu reetablieren, sollte zunächst eine induzierbare Zelllinie mit dem Tetracyclinregulationssystem erzeugt werden (1; 24). Dafür wurde die AMOG/ β 2 Maus cDNA hinter den tetracyclinabhängigen bidirektionalen Promotor des pBI-2-Plasmids kloniert, resultierend in dem Vektor pBI-AMOG. Zur Vorbereitung der Transfektion wurde das Plasmid pBI-AMOG mit dem Restriktionsenzym AatII linearisiert, das Plasmid pBZeotTA mit dem Restriktionsenzym BglII. Denn zur Herstellung stabil transfizierter Zellen ist es günstiger, die DNA vor der Transfektion zu linearisieren, da dadurch die Effizienz der Integration erhöht wird. Der Erfolg der Linearisierung wurde anhand einer Agarosegelelektrophorese überprüft. Der Restriktionsansatz wurde nach dem Qia Quick PCR Purification Kit Protokoll aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration mittels UV-Absorptionsmessung bei 260/280 nm. Zur Transfektion wurden 4,14 μ g linearisierte pBI-AMOG-DNA und 0,66 μ g linearisierte pBZeotTA-DNA eingesetzt. Es wurden die Lösungen des „Effectene Transfection Kit“ verwendet (s. 2.2.3.1)

3.1.2 Regulation der AMOG/ β 2-Expression

Das Plasmid pBI-AMOG enthält einen tetracyclinabhängigen bidirektionalen Promotor, der das Reporter-gen Luciferase und das „gene of interest“, in diesem Falle das AMOG/ β 2-Gen, parallel reguliert. So kann die Expression und Regulation von AMOG/ β 2 indirekt über die Luciferaseaktivität bestimmt werden. Um den Erfolg der Expression zu testen, wurde die Bestimmung der Luciferaseaktivität durchgeführt (2.2.5). Um die Induktion der Expression in verschiedenen Klonen zu vergleichen, wurden in Parallelansätzen die Zellen für 48 h in Abwesenheit von Tetracyclin (induzierter Zustand der Expression von Luciferase bzw. AMOG/ β 2) und in Anwesenheit von Tetracyclin (reprimierter Zustand, keine Expression der rekombinanten Gene) kultiviert. Es zeigte sich eine hohe Luciferaseaktivität in diversen Klonen, jedoch zeigte keiner der 33 getesteten Klone die Möglichkeit der tetracyclinabhängigen Regulierbarkeit der Luciferase-Expression oder des koexprimierten AMOG/ β 2. Darum testeten wir die Klone mit der höchsten Luciferaseaktivität im Western-Blot und in der indirekten Immunfluoreszenz auf ihre AMOG/ β 2-Expression und verwendeten für die *in vitro* Versuche den Klon B1 mit der stärksten AMOG/ β 2-Expression, der im weiteren als C6-AMOG bezeichnet wird.

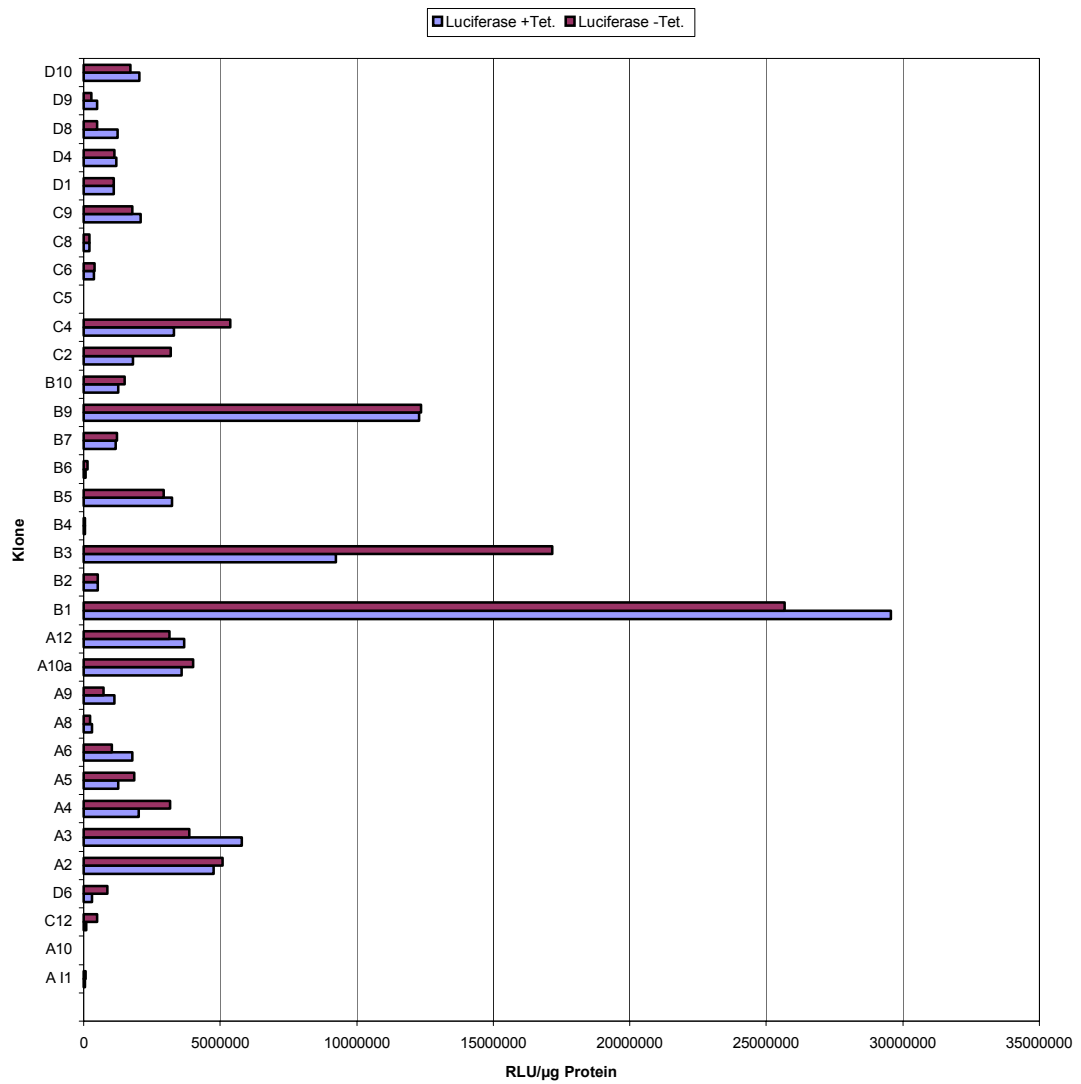


Abb. 3.1 Bestimmung der Luciferaseaktivität in RLU/µg Protein nach 48h Kultivierung der Zellen +/- Tetracyclin

3.1.3 Nachweis des rekombinanten AMOG/ β 2 im Western-Blot

Da keiner der 33 getesteten Klone die Möglichkeit der tetracyclinabhängigen Regulierbarkeit der AMOG/ β 2-Expression zeigte, verwendeten wir für die in vitro Versuche den Klon B1 mit der stärksten AMOG/ β 2-Expression im Western-Blot (2.2.7). Als Primärantikörper verwendeten wir Maus-Anti-Ratte- Na^+, K^+ -ATPase β 2 (Transduction Laboratories, Lexington, USA), als Sekundärantikörper Peroxidase-konjugierten Antikörper gegen Maus-IgG (A-3682; Sigma) aus der Ziege. In einem Western-Blot mit C6-AMOG-Zelllysate zeigte sich eine starke Proteinbande, wohingegen das Lysat der Elternzelllinie C6TL negativ war. Das rekombinante AMOG/ β 2 des Klons B1 zeigte ein Molekulargewicht von annähernd 50 kDa. Es korrelierte mit dem Molekulargewicht des vollständig glykosylierten Proteins (Abb. 3.2).



Abb. 3.2 Western-Blot C6TL/ C6-AMOG: Rekombinantes AMOG/ β 2 ist in Lysaten des Klons B1 detektierbar, während die Elternzelllinie C6TL AMOG/ β 2 negativ ist.

3.1.4 Nachweis des rekombinanten AMOG/ β 2 in der indirekten Immunfluoreszenz

Die Lokalisation des rekombinanten AMOG/ β 2 in der Zelllinie C6-AMOG wurde durch indirekte Immunfluoreszenz (2.2.4) bestimmt. Dabei wurde der α -426-Ratte-Anti-Maus-AMOG-Antikörper und als Sekundärantikörper der FITC-konjugierte Antikörper gegen Ratten IgG (F-2658) aus der Ziege verwendet. Das zur Immunglobulinfamilie gehörige Adhäsionsmolekül AMOG/ β 2 wurde sowohl in der Zellmembran in Arealen für Zell-Zell-Kontakte, als auch in intrazellulären perinukleären Arealen nachgewiesen (Abb. 3.3). Die Elternzelllinie C6TL blieb ,wie auch im Western-Blot, negativ (ohne Abbildung).

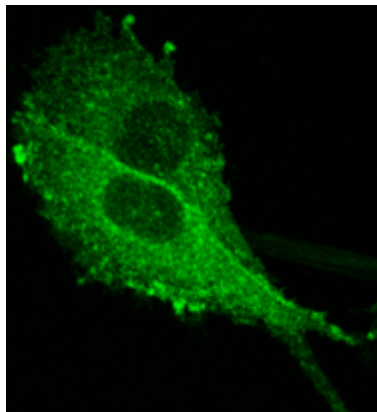
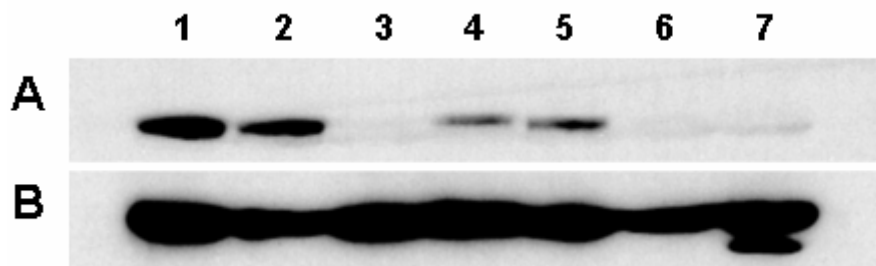


Abb. 3.3 Indirekte Immunfluoreszenz von AMOG/ β 2 positiven C6-AMOG Zellen (Klon B1). AMOG/ β 2 wird sowohl in der Zellmembran (A), als auch intrazellulär nachgewiesen (B,C)

3.1.5 Nachweis von AMOG/ β 2 in Biopsien von humanen Gliomen

In humanen Gliombiopsien ist die AMOG/ β 2 Expression im Vergleich zu nicht neoplastischen Astrozyten vermindert. Zudem zeigt sich eine umgekehrte Relation der AMOG/ β 2 Expression zum Malignitätsgrad. In drei von sechs Glioblastomen (Linie 3,6,7) zeigt sich lediglich eine schwache oder sogar gar keine Bande, und in den anderen drei Biopsien (Linie 2,4,5) zeigt sich eine verminderte AMOG/ β 2 Expression, verglichen mit dem normalen Cortex (Linie 1).



Immunblot von Glioblastom-Biopsien (2-7)

A: Die AMOG/ β 2 Expression in sechs Glioblastombiopsaten (2-7) ist im Vergleich zum normalen Cortex (1) vermindert (2,4,5), oder nicht nachweisbar (3,6,7)

B: Kontrolle: Membran aus A wurde gestripped und mit Anti-Aktin-Antikörper inkubiert, um den Auftrag der gleichen Proteinmenge zu verifizieren

3.2 In vitro Migration und Adhäsion

3.2.1 In vitro Migration

In vitro Migrationsversuche mit dem Monolayermigrationssystem (in 2.2.8.1 beschrieben) wurden durchgeführt, um das Migrationsverhalten der AMOG/ β 2-positiven C6-AMOG-Zelllinie mit der AMOG/ β 2-negativen Elternzelllinie C6TL auf verschiedenen Substraten zu vergleichen. Als Substrate dienten Matrigel und Myelin. Bei den Versuchen zeigte sich, dass Zellen, die AMOG/ β 2 exprimierten, in ihrem Migrationsverhalten auf Matrigel gehemmt wurden.

Während eines Beobachtungszeitraumes von 96 h bedeckten die AMOG/ β 2-positiven C6-AMOG-Zellen ein signifikant kleineres Areal als die AMOG/ β 2-negative Elternzelllinie C6TL. Begonnen wurde der Versuch für beide Zelllinien unter gleichen Voraussetzungen. Das Kolonieareal wurde durch den Innendurchmesser der Sedimentationszylinder von 1,2 mm begrenzt. Es zeigte sich, dass die C6TL-Zellen entlang der mit Matrigel beschichteten Oberfläche signifikant schneller migrierten als die C6-AMOG-Zellen. Nach 48 h bedeckten die C6TL-Zellen ein Areal von etwa 12,6 mm², die C6-AMOG-Zellen ein Areal von 4,9 mm². Nach 96 h war die bedeckte Fläche durch die C6-AMOG-Zellen signifikant kleiner als die der C6TL-Zellen (9 mm² versus 23 mm²).

Ähnliche Ergebnisse wurden bei den Versuchen mit myelinbeschichteter Oberfläche beobachtet. Hierbei zeigte sich jedoch lediglich eine tendenziell schnellere Migration der C6TL-Zellen im Vergleich zu den C6-AMOG-Zellen, aber kein signifikanter Unterschied. Vermutlich ist dies auf interagierende Faktoren, die die Migration auf Matrigel, nicht aber auf Myelin hemmen, zurückzuführen.

Die Ergebnisse setzten sich aus drei unabhängigen Versuchen mit 8-fach Bestimmungen zusammen.

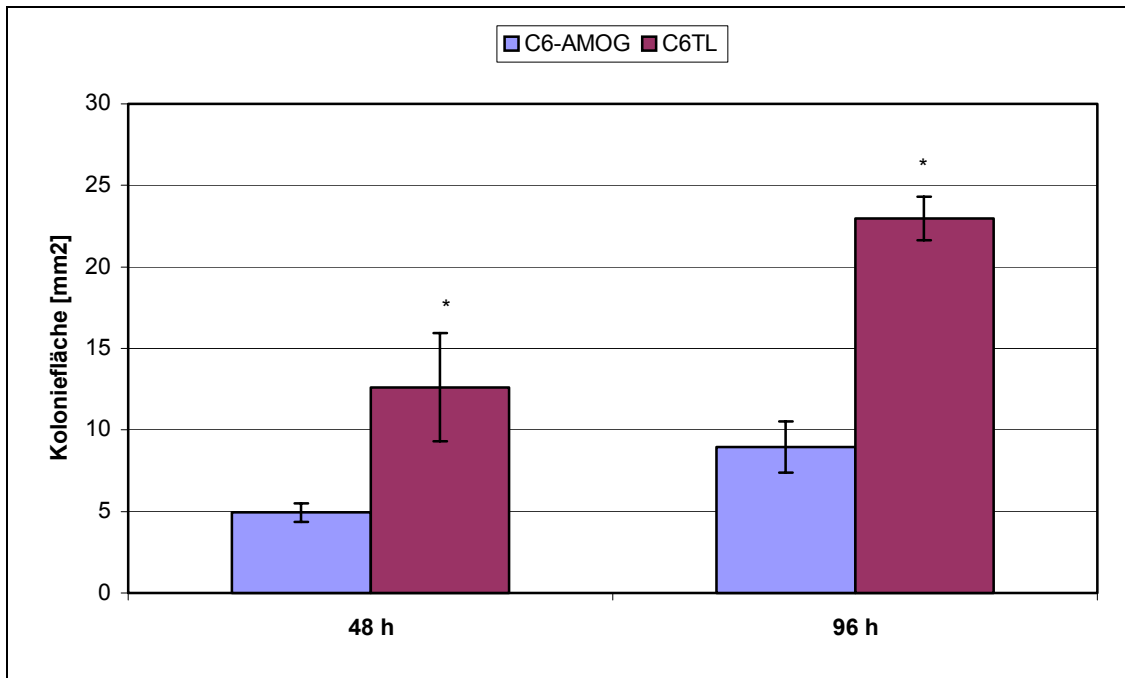


Abb. 3.4.1 Migration von C6TL-Zellen und C6-AMOG-Zellen auf Matrigel

* bedeutet $p < 0,05$

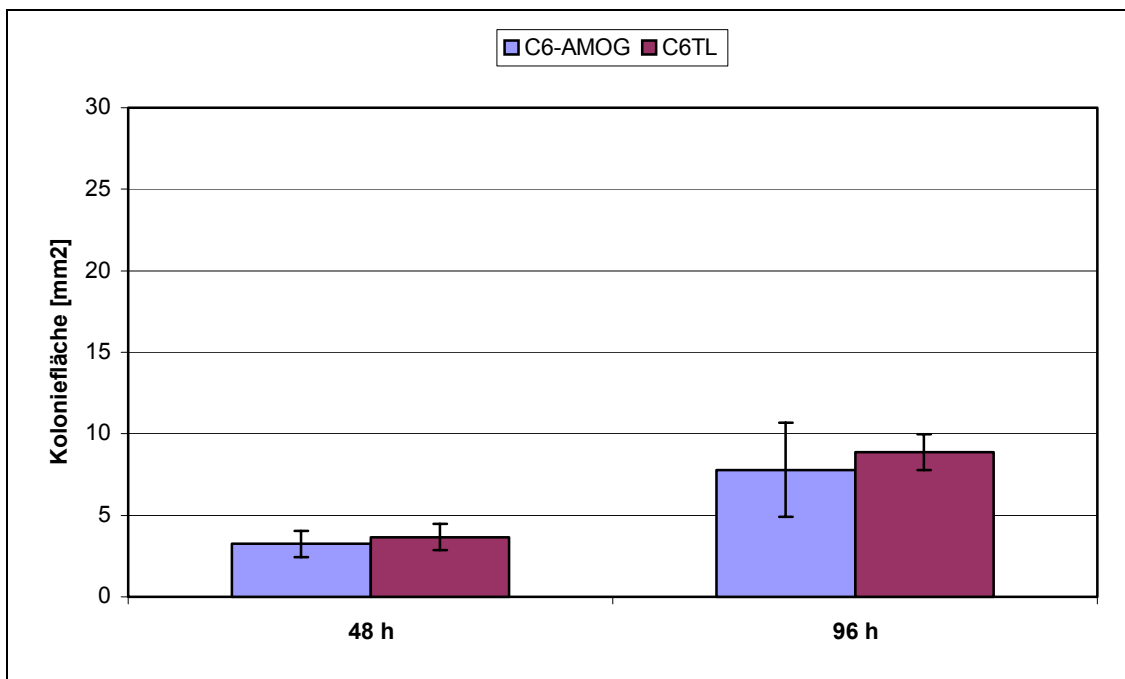


Abb. 3.4.2 Migration von C6TL-Zellen und C6-AMOG-Zellen auf Myelin

3.2.2 Adhäsionsassay

Die C6-AMOG-Zellen zeigten im Adhäsionsassay, beschrieben in 2.2.8.3, im Vergleich zu den C6TL-Zellen eine erhöhte Adhäsion auf Matrigel. Zudem begünstigten zunehmende Matrigelkonzentrationen [0,1 µg/ml bis 500 µg/ml] die Adhäsion der C6-AMOG-Zellen. Bei der höchsten Matrigelkonzentration war die Adhäsion der AMOG/β2-positiven Zellen mehr als drei mal so hoch wie bei AMOG/β2-negativen Zellen.

Die Adhäsion auf Myelin zeigte zwar mit zunehmender Myelinkonzentration eine verstärkte Adhäsion, aber es waren keine eindeutigen Unterschiede im Adhäsionsverhalten der AMOG/β2-positiven und -negativen Zellen zu erkennen.

Die Ergebnisse setzten sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit 8-fach Bestimmungen zusammen.

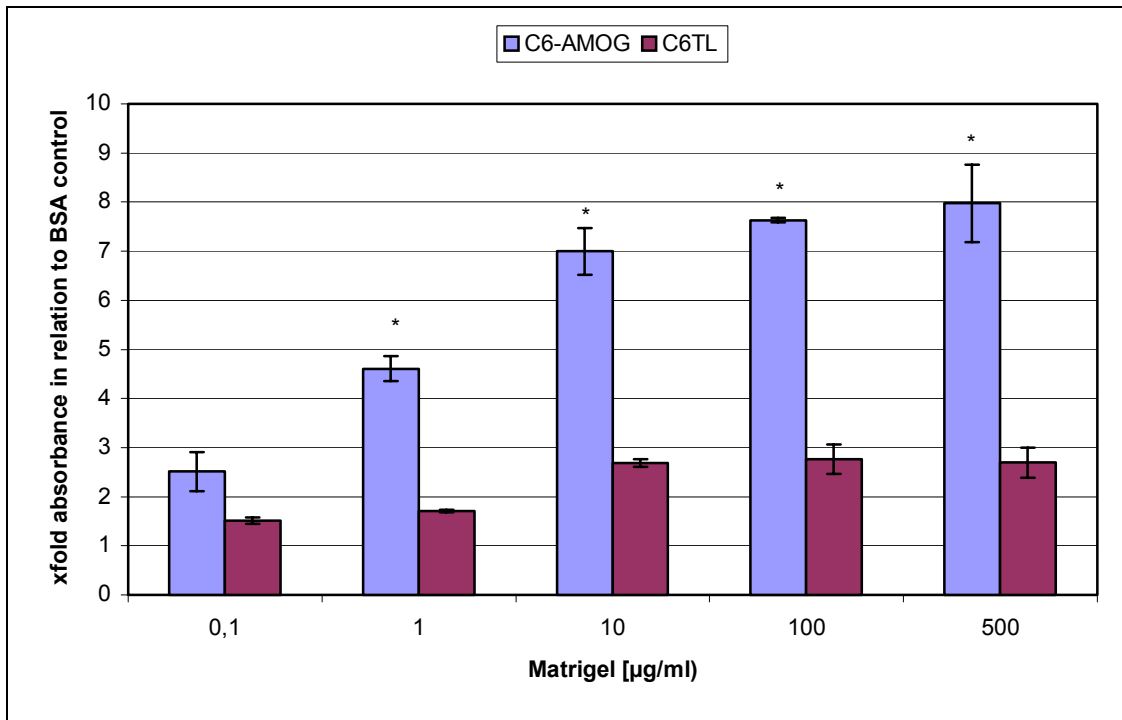


Abb. 3.5.1 Adhäsion der C6TL-Zellen und C6-AMOG-Zellen auf Matrigel

* bedeutet $p < 0.05$

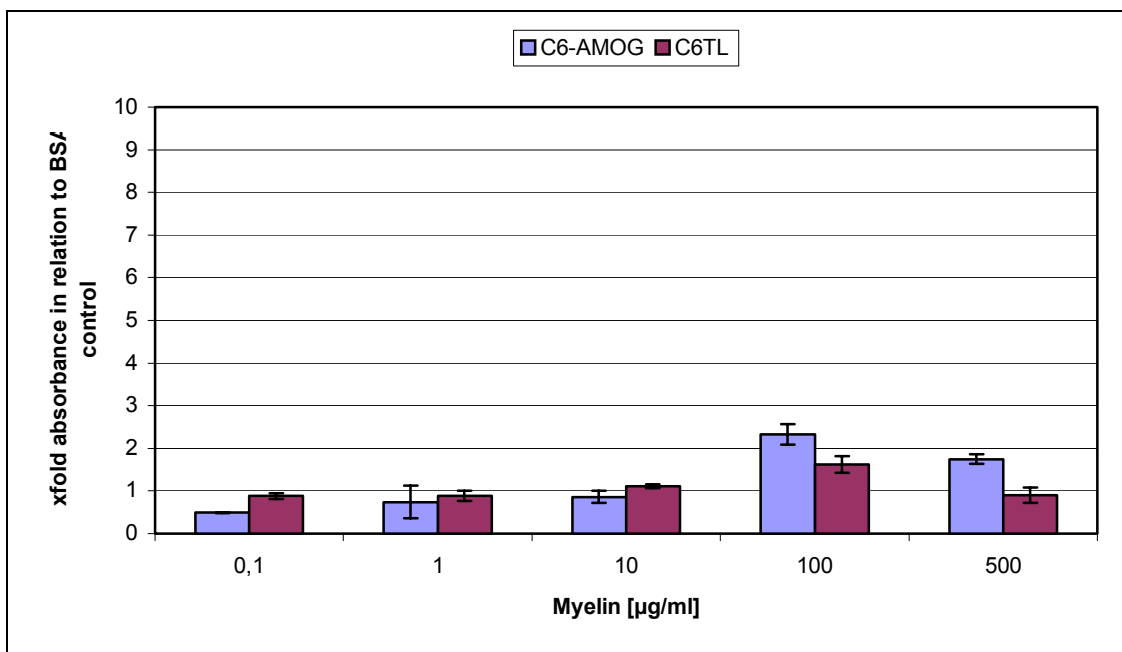


Abb. 3.5.2 Adhäsion der C6TL-Zellen und C6-AMOG-Zellen auf Myelin

4 DISKUSSION

4.1 Die Rolle von AMOG/ β 2 in der Gliominvasion

Obwohl die lokale Invasion eines der Hauptcharakteristika maligner Gliome ist, sind die molekularen Mechanismen dieses Prozesses noch wenig erforscht.

Für WHO-Grad-IV-Tumoren (Glioblastome) liegt die mittlere Überlebenszeit bei 9-12 Monaten, für Grad-III-Tumoren (anaplastische Astrozytome) bei 2 Jahren. Der Grund für diese schlechte Prognose liegt in der diffusen Invasion einzelner Tumorzellen in das gesunde Gehirngewebe. Invasive Tumorzellen infiltrieren das umgebende Hirngewebe, machen die komplette Resektion unmöglich und legen den Grundstein für Rezidive nach der neurochirurgischen Resektion des Primärtumors. (31). Klinisch verläuft die Invasion der malignen Tumoren entlang unterschiedlicher anatomischer Strukturen, z.B. entlang der Kommissurenbahnen (z. B. Corpus callosum und Capsula interna). Weitere Strukturen der Gliominvasion sind Basalmembranen der Blutgefäße, der subependymale Raum und die Glia limitans externa.

Die Tumorzellinvasion ist ein komplexer Prozess. Sowohl ECM-Komponenten, Cytokine, Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren als auch Proteasen und ihre Inhibitoren sind in die Interaktionen zwischen Tumor und normalem Gehirngewebe involviert.

Die Expression und Funktion des glialen Adhäsionsmoleküls AMOG/ β 2 in Gliomen wurde untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit beinhalten die verminderte Expression von AMOG/ β 2 in Tumorzellen in situ, sowie eine vermehrte Adhäsion und verminderte Migration von AMOG/ β 2 reexprimierenden Zellen in vitro.

Für die weitere Interpretation unserer Ergebnisse ist es wichtig zu realisieren, dass AMOG/ β 2 zwei unterschiedliche Funktionen hat: einerseits als *Adhäsionsmolekül*, andererseits als *Teil der Na^+, K^+ -ATPase* (57)

Die Funktion von AMOG/ β 2 als Transmembranmolekül sind vielgestaltig:

- AMOG/β2 ist spezifisch in die Ca^{2+} - unabhängige Neuronen-Astrozyten-Interaktion involviert. Als ein integrales Membranprotein könnte es durch Signaltransduktionsprozesse mit intrazellulären Partnern interagieren (3). Durch den Verlust der AMOG/β2-Expression in Gliomen kommt es auch zu einer Verminderung der Neuronen-Astrozyten-Interaktion und somit zur Begünstigung der Gliominvasion. Zudem könnte es zu Störungen in der Signaltransduktion, und somit zu einem Differenzierungsverlust der betroffenen Zellen kommen.
- Die Adhäsion von in Liposomen rekonstruiertem AMOG/β2 an Neurone kann in vitro spezifisch durch einen Antikörper gehemmt werden (3). Dies verdeutlicht die Funktion von AMOG/β2 als Adhäsionsmolekül und stimmt mit den Ergebnissen unseres Adhäsionsassays überein. Denn AMOG/β2 negative Zellen zeigen eine verminderte Adhäsion im Vergleich zu AMOG/β2-positiven Zellen.
- Die Hemmung der Na^+, K^+ -ATPase durch Ouabain hat keinen Effekt auf die Neuronen-Glia-Interaktion (22).
- AMOG/β2, nicht aber die β1-Untereinheit der Na^+, K^+ -ATPase fördert das neuronale Wachstum (46).
- AMOG/β2 teilt einige Strukturhomologien mit anderen Zellerkennungsmolekülen. Es trägt z. B. die L3-Carbohydratdomäne, die sich in anderen neuronalen Zellerkennungsmolekülen wie L1 und MAG (Myelin assoziiertes Glykoprotein) findet. Die Ergebnisse von Senner und Mitarbeitern haben gezeigt, dass die L1-Expression auf der Oberfläche von Gliomzellen die Zell-Matrix- und die interzelluläre Zell-Zell-Adhäsion erhöht (56). Dies stimmt ebenfalls mit unseren Ergebnissen überein. Denn die Reexpression von AMOG/β2 in Gliomzellen führt zu einer vermehrten zellulären Adhäsion auf der Basalmembranpräparation Matrigel.
- Vermutlich fungiert AMOG/β2 als Adhäsionsmolekül in der Regeneration peripherer Nerven, denn die AMOG/β2 Expression ist im Segment distal einer Verletzung des Nervus ischiadicus erhöht (27). Auch L1, mit dem AMOG/β2 Strukturhomologien teilt, ist im Nervensystem assoziiert mit dem Neuritenwachstum (56).

Die unterschiedliche Expression von Zelladhäsionsmolekülen durch Tumorzellen begünstigt die Dissemination von soliden Tumoren. Im Gehirn besteht ein kritisches Gleichgewicht zwischen der Expression von Adhäsionsmolekülen und Proteasen. Kleinste Veränderungen in diesem Gleichgewicht bestimmen das Verhalten der Gliomzellen und können den komplexen Prozess der Invasion beeinflussen (17; 23). Bei der Invasion vermindert sich die homotype Zelladhäsion zwischen den Tumorzellen, während heterotype Adhäsionen zwischen Tumorzellen und anderen Zellen oder der ECM zunehmen (45). Diese Erkenntnisse lassen sich gut mit den Ergebnissen unserer *in vitro* Versuche vereinbaren. Denn der Verlust der AMOG/ β 2-Expression in Gliomzellen, führt zu einer verminderten Adhäsion und verstärkten Migration.

Die Veränderung der normalen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und der Kontrollverlust über Proliferation und Differenzierung in Tumorzellen könnte mit der Veränderung der Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen gegenüber dem Normalgewebe assoziiert sein. Einige Adhäsionsmoleküle wurden bislang identifiziert, die möglicherweise den Invasionsprozess unterstützen. Hierzu zählen zum Beispiel Integrine (21), L1 (56) und CD44 (5; 41). AMOG/ β 2 könnte, nach unseren Ergebnissen zu urteilen, auch dazu zählen.

In einer Studie von Gingras und Mitarbeitern (21) wurde gezeigt, dass die Expression von CAMs in WHO-Grad-IV-Tumoren Unterschiede zum normalen Hirngewebe aufwies. Diese Tumoren zeigten eine verstärkte Expression der Integrine α 2 β 1, α 5 β 1, α 6 β 1 und α v β 3 und veränderte Expression von ICAM-1, einem Adhäsionsmolekül der Immunglobulinfamilie. Auch unsere Ergebnisse zeigen in humanen Gliomen eine veränderte AMOG/ β 2-Expression im Vergleich zum normalen Kortex. Friedlander und Mitarbeiter vermuten, dass die unterschiedliche *in vitro* Migration von niedrigmalignen Tumoren versus hochmalignen Tumoren auf Kollagen auf der erhöhten Expression von aktiven Integrinen beruht. Vermutlich spielen α V- und β 1-Integrine eine wesentliche Rolle bei der Infiltration des normalen Hirngewebes durch Tumorzellen, denn spezifische Antikörper gegen α V- und β 1-Integrine können die Migration von astrozytären Zellen auf unterschiedlichen Substraten vollständig hemmen (16). Verglichen mit

den Ergebnissen unserer in vitro Versuche ist die verminderte AMOG/ β 2-Expression in Gliomen mit einer verstärkten Migration assoziiert.

In humanen Gliombiopsien ist die AMOG/ β 2-Expression im Vergleich zu nicht neoplastischen Astrozyten vermindert. Zusätzlich konnte in der Immunhistologie eine umgekehrte Relation der AMOG/ β 2-Expression zum Malignitätsgrad nachgewiesen werden (57). Ähnliches zeigt sich bei E-Cadherin, einem integralen Membranglykoprotein, das zur Familie der Cadherine zählt. Beispielsweise ist die E-Cadherin-Expression in gut differenzierten Tumoren hoch. In undifferenzierten Zellen, die eine verminderte Zell-Zell-Adhäsion, sowie stärkere Tendenz zur Invasion zeigen, ist die E-Cadherin-Expression vermindert (25). Die vermehrte Aggressivität von Tumoren korreliert mit einer verminderten E-Cadherin-Expression (39). E-Cadherin fungiert als Tumorsuppressor- und Invasionssuppressormolekül (48), ggf. hat AMOG/ β 2 eine ähnliche Funktion.

Auch für CD44, ein Zell-Oberflächen-Glykoprotein, gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen seiner veränderten Expression und dem Verhalten von Tumorzellen. Das metastatische Potential von Karzinomen steht in Relation zur Expression von CD44 (15). Gingras und Mitarbeiter (21) haben gezeigt, dass die Expression von CD44 in WHO-Grad-IV-Tumoren höher ist, als im normalen Hirngewebe. Die Interaktion von CD44 mit der ECM könnte die Gliomzelladhäsion und -invasion im Gehirn vermitteln (33).

Durch die Regulation oder Beeinflussung von Adhäsionsmolekülen könnten sich neue therapeutische Methoden in der Behandlung maligner Gliome ergeben.

Bisher wurde bei der Interpretation unserer Ergebnisse nur auf die Funktion von AMOG/ β 2 als Adhäsionsmolekül eingegangen. Zudem bildet es aber noch die β 2-Untereinheit der Na^+, K^+ -ATPase.

Die Na^+, K^+ -ATPase ist eine allgegenwärtig exprimierte, in der Zellmembran lokalisierte, Ionenpumpe. Die Pumpe reguliert durch direkte Beeinflussung des Ionengradienten zelluläre Aktivitäten wie Zellvolumen und -größe, das Aktionspotential und hat sekundäre Einflüsse auf andere aktive Transportsysteme (66).

Bei der Na^+, K^+ -ATPase handelt es sich um ein Heterodimer, das aus einer α - und einer β -Untereinheit besteht. Bis dato wurden vier Isoformen der α -Untereinheit und vier Isoformen der β -Untereinheit beschrieben. Von diesen werden $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$ im Gehirn exprimiert. Neuronen exprimieren typischerweise $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 2$, während Astrozyten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ und $\beta 2$ und Oligodendrozyten $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\beta 3$ exprimieren können. Die C6-Gliomzelllinie zeigt bevorzugte Expression der $\beta 3$ Isoform (40).

Die Kombination der α - und β -Untereinheiten ist variabel, alle theoretisch möglichen $\alpha\beta$ -Untereinheitenkombinationen können vorkommen. C6-Zellen exprimieren die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\beta 3$. Hingegen werden $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 2$ nicht exprimiert (40). Die $\beta 2$ -Untereinheit der Na^+, K^+ -ATPase wird hauptsächlich exprimiert von glialen Zellen im ZNS und zusätzlich von neuronalen Zelltypen, wie z. B. Granularzellen im cerebellären Kortex und Photorezeptorzellen in der Retina (38). Die Expression von $\beta 2$ ist zunächst nachweisbar in späten embryonalen Entwicklungsstadien, nimmt während der ersten zwei postnatalen Wochen zu und erreicht höchste Expressionslevel im adulten Gehirn (50).

AMOG/ $\beta 2$ -Knock-Out-Mäuse zeigten ein charakteristisches Verhaltensmuster, das am 15. postnatalen Tag mit Abnormitäten in der motorischen Koordination, Tremor und Paralyse begann, und mit extrem schneller Progression der Symptome am 17.-18. postnatalen Tag zum Tod der Mäuse führte. Die histologischen Veränderungen zeigten sich im Sinne von vergrößerten Ventrikeln, Nervenzelldegenerationen und Schwellungen der Astrozytenfortsätze im Hirnstamm, Thalamus und Rückenmark, sowie einer Degeneration von Photorezeptorzellen in der Retina. Diese Veränderungen beruhen vermutlich auf der veränderten Pumpfunktion der Na^+, K^+ -ATPase, denn die Zytoarchitektur des Nervensystems, insbesondere des cerebellären Kortex, entwickelte sich normal (38; 44).

Die β -Untereinheiten können sowohl die enzymatischen als auch die Transporteigenschaften der Isoenzyme der Na^+, K^+ -ATPase unterschiedlich beeinflussen. Diese Unterschiede scheinen aber geringer ausgeprägt zu sein als bei den α -Untereinheiten. Somit zeigen die Expressionen von unterschiedlichen Kombinationen der Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten relativ geringe Unterschiede zwischen $\alpha 1\beta 2$ und $\alpha 1\beta 3$ -Isoenzymen bezüglich der Na^+, K^+ -

Pumpaktivität, K^+ -Affinität und pharmakologischen Eigenschaften (12). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Veränderungen in der Ionenpumpfunktion der Na^+,K^+ -ATPase kaum für die modifizierte Adhäsion und Migration verantwortlich sind. Es ist jedoch möglich, dass indirekte Effekte eine Rolle spielen. Beispielsweise ist die Na^+,K^+ -ATPase einerseits an der Freisetzung von FGF2, andererseits an der Adhäsion von Nongliazellen auf Fibronectin, vermutlich über Integrine, beteiligt (14).

Des Weiteren interagiert die Na^+,K^+ -ATPase mit dem aktin- und spektrinhaltigem Zytoskelett (29). Diese Effekte könnten die Gliominvasion sekundär beeinflussen, wie auch Integrine das aktinhaltige Zytoskelett und FGF2 die Migration von normalen und neoplastischen Astrozyten verändern können (53).

In einer Studie von Antonicek und Mitarbeitern (3) wurde gezeigt, dass AMOG/ β 2 die Granularzellmigration entlang der Astrozytenfortsätze vermittelt. Vermutlich tragen Adhäsionsvorgänge zur verminderten Gliomzellmigration der C6-AMOG-Zellen bei. Es ist denkbar, dass AMOG/ β 2 Astrozyten auf geeigneten Substraten immobilisiert, was die neuronale Migration auf Astrozyten erleichtert, oder die Invasion von Gliomzellen hemmt.

Zudem könnte die verminderte Expression von AMOG/ β 2 in Gliomen zu einer Störung der Pumpfunktion der Na^+, K^+ -ATPase führen und somit den Signaltransduktionsweg in den Zellen verändern und dadurch einen Einfluss auf den Differenzierungsverlust von Gliomzellen haben.

Bezüglich des Adhäsions- und Migrationsverhaltens AMOG/ β 2 positiver und negativer Zellen auf Myelin zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Vermutlich verfügt Myelin nicht über einen AMOG/ β 2-bindenden Rezeptor. Zudem ist die weiße Substanz fast frei von Strukturproteinen und besteht hauptsächlich aus Hyaluronsäure und Glykosaminoglykanen. Diese Liganden sind antiadhäsiv und nicht permissive Substrate für die Migration unterschiedlicher Zelltypen (11). Außerdem wurde in einer Studie gezeigt, dass das Wachstum von Gliomzellen auf rohem Myelinextrakt aus Ratten von einer membrangebundenen Metalloendoprotease abhängig ist (20).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass AMOG/ β 2 in diffusen Gliomen vermindert exprimiert wird, die Adhäsion fördert und die Migration von Gliomzellen vermindert. Vermutlich unterstützt der progressive Verlust von AMOG/ β 2 in Gliomen die Invasion.

4.2 Regulation der Genexpression

Die verwendeten eukaryotischen C6-Gliomzellen wurden durch ein modifiziertes prokaryotisches Transkriptionskontrollsystem genetisch verändert. Die Genprodukte Luciferase und AMOG/ β 2 sollten so in ihrer Expression reguliert werden können. Es wurde das Tet-Off-System verwendet. Die Zugabe von Tetracyclin führt zu einer Unterdrückung der Expression. Denn in Abwesenheit von Tetracyclin bindet der Transaktivator tTA (ein Fusionsprotein aus dem physiologischen Tet-Repressor von *E. coli* und dem VP16-Transaktivator des Herpes simplex Virus) an die tet-Operatoren (tetO) stromaufwärts der TATA-Box und aktiviert die Transkription des Zielgens. Ist Tetracyclin vorhanden, so bindet dieses an tTA. Es kommt zu einer Konformationsänderung im TetR-Anteil des tTA, der folglich von tetO dissoziiert. Die Aktivierung der Transkription des Zielgens wird aufgehoben (24).

Die Regulation der Genexpression wurde im Luciferase-Assay geprüft. Hier zeigte sich jedoch keine Regulierbarkeit der Genexpression. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass wie alle Expressionssysteme auch das Tet-System eine unspezifische Aktivität zeigt. Man unterscheidet hierbei Basalaktivität und Hintergrundaktivität. Die Basalaktivität bezieht sich auf die Restaktivität des Minimalpromotors des Responderkonstruktes (Promotor, der vor der AMOG/ β 2 cDNA liegt). Die Hintergrundaktivität beschreibt die Expression des Responders bei Vorhandensein von Aktivator und Responder im reprimierten Zustand.

Beispielsweise kommt es besonders bei transienter Transfektion durch die große Menge an DNA in der Zelle zu einer hohen Basalaktivität. Dies führt zu einer rechnerisch geringen Aktivierungsrate (1; 5).

Die Integration des Responderkonstruktes ins Chromatin in einer stabilen Zelllinie führt meistens zu einer drastischen Reduzierung der Basalaktivität. Liegt der Integrationsort jedoch in der Nähe eines endogenen Enhancers, wird die

Basalaktivität erhöht (5). Um stark regulierbare Zelllinien zu erhalten ist es sehr wichtig Klone zu selektieren, bei denen der minimale Promotor in einen Ort des Genoms integriert wird, der einerseits nicht in einem transkriptionell inaktiven Bereich liegt, andererseits nicht von nahen cis-aktiven Enhancern beeinflusst wird. Diese Integrationsorte werden als *s/a Loci* („silent but active“) bezeichnet (1;5)

Ein anderer Grund für die fehlende Regulierbarkeit der Genexpression in den AMOG/ β 2 C6-Klonen könnte zum einen darin liegen, dass der Transaktivator aufgrund ungünstiger Lage in nicht transkribierbaren Bereichen nicht exprimiert wird und daher auch das rekombinante Gen nicht aktivieren kann.

Zudem ist auch die Instabilität des Transaktivators ein entscheidender Faktor. Western-Blot-Analysen von transient mit Transaktivatorkonstrukten transfizierten HeLa-Zellen zeigten die schnelle Degradierung der TetR-VP16-Fusionsproteine anhand von Degradationsprodukten (64).

4.3 Ausblick

Die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede im Adhäsions- und Migrationsverhalten AMOG/ β 2-positiver und -negativer Zellen könnten durch Einsatz von blockierenden Antikörpern gegen AMOG/ β 2 untersucht werden. Unter Einsatz von Antikörpern gegen AMOG/ β 2 müßten sich Adhäsion und Migration ähnlich wie bei den AMOG/ β 2-negativen Zellen verhalten.

Ein weiteres Ziel könnte die Suche nach einem potentiellen Bindungspartner für AMOG/ β 2 im menschlichen Gehirn sein. Man könnte unterschiedliche Substrate verwenden und dann mit Hilfe von Antikörpern gegen AMOG/ β 2 das Substrat eruieren, dass als Bindungspartner für AMOG/ β 2 fungiert.

Um die Einflüsse von AMOG/ β 2 im humanen System zu untersuchen, könnte man die hier angewandten *in vitro* Adhäsions- und Migrationsversuche mit humanem AMOG/ β 2 sowie mit humanen Gliomzelllinien durchführen.

Zudem könnten in *in vivo* Versuchen mit Mäusen beispielsweise die Unterschiede im Migrations- und Adhäsionsverhalten AMOG/ β 2 positiver und negativer Zellen untersucht werden. Man könnte stereotaktisch AMOG/ β 2 positive Gliomzellen in das Gehirn von Nacktmäusen injizieren, in das Gehirn der Kontrollgruppe AMOG/ β 2 negative Gliomzellen und anschließend die Unterschiede bezüglich der Adhäsion anhand der Größe der Tumoren untersuchen. Die kompakte Tumormasse könnte man in Gefrierschnitten der Gehirne mit Hilfe der Immunhistologie auswerten. Die Migration der Zellen könnte der Infiltration des umgebenden Hirngewebes durch die einzelnen Tumorzellen entsprechen.

In weiteren *in vivo* Versuchen könnte man bei Ratten z. B. den Einfluss AMOG/ β 2 spezifischer Antikörper, die man intrathekal appliziert, auf das Wachstumsverhalten von Gliomen untersuchen.

Man könnte untersuchen, ob AMOG/ β 2 inaktivierende Mutationen nicht nur in Gliomen, sondern auch in anderen Neoplasien nachweisbar sind. Denn die bisherigen Studien bezüglich AMOG/ β 2 beziehen sich hauptsächlich auf Gliome. Es wäre interessant, inwiefern eine verminderte AMOG/ β 2-Expression auch eine Bedeutung bei anderen Tumoren hat. Eventuell verfügt AMOG/ β 2 ebenso wie E-Cadherin über die Funktion als Invasionssuppressor.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Gliomzellen infiltrieren aggressiv, z. T. als einzelne Zellen das umgebende Hirngewebe. In diesen als diffuse Invasion bezeichneten Prozess sind Komponenten der extrazellulären Matrix einerseits und zelluläre Adhäsionsmoleküle andererseits involviert.

Die $\beta 2$ -Untereinheit der Na^+, K^+ -ATPase wurde ursprünglich als gliales Adhäsionsmolekül identifiziert (adhesion molecule on glia), welches während der Entwicklung des Nervensystems in Adhäsions- und Migrationsvorgänge von Neuronen und Astrozyten involviert ist.

Hier wurde die Expression des AMOG/ $\beta 2$ in Gliomen untersucht, sowie sein Einfluss auf die Adhäsion und Migration von Gliomzellen. Es wurde gezeigt, dass die Expression von AMOG/ $\beta 2$ in Gliomen verringert ist und in Glioblastomzelllinien nicht mehr nachgewiesen werden kann.

Um die Funktion von AMOG/ $\beta 2$ in der Gliomzellinvasion zu untersuchen, wurden AMOG/ $\beta 2$ negative C6TL-Rattengliomzellen mit dem AMOG/ $\beta 2$ -Expressionsplasmid transfiziert, um die Funktion des Adhäsionsmoleküls in diesen Zellen wieder herzustellen.

Für die in-vitro-Versuche wurde der Klon B1 mit der stärksten AMOG/ $\beta 2$ -Expression im Western-Blot und in der indirekten Immunfluoreszenz verwendet.

Die Migration dieser Zelllinien wurde auf den Substraten Matrigel und Myelin in Abhängigkeit von der AMOG/ $\beta 2$ -Expression untersucht. Zudem wurde das Adhäsionsverhalten der Ursprungszelllinie C6TL und den C6-AMOG-Zellen auf Matrigel und Myelin verglichen.

Auf Myelin zeigten sich keine Unterschiede bezüglich des Adhäsions- und Migrationsverhaltens.

Die Reexpression von AMOG/ β 2 in C6TL-Zellen führte zu erhöhter Adhäsion und signifikant verminderter Migration auf Matrigel, verglichen mit der Ursprungszelllinie C6TL. Zudem stieg die Adhäsion der C6-AMOG-Zellen mit steigender Matrigelkonzentration (Konzentration von 1 μ g/ml- 500 μ g/ml). Bei der höchsten Matrigelkonzentration war die Adhäsion der AMOG/ β 2-positiven Zellen mehr als drei mal so hoch wie bei AMOG/ β 2-negativen Zellen.

Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass der Verlust von AMOG/ β 2 in Gliomzellen die Gliominvasion beeinflusst und somit bei der diffusen Invasion des Gehirns involviert ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ackland-Berglund E, Leib A (1995) Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type. *Biotechniques* 18: 196-200.
2. Andratschke N, Grosu AL, Molls M, Nieder C (2001) Perspectives in the treatment of malignant gliomas in adults. *Anticancer Res.* 21: 3541-3550
3. Antonicek H, Persohn E, Schachner M (1987) Biochemical and functional characterisation of a novel neuron-glia adhesion molecule that is involved in neuronal migration. *J. Cell Biol* 104: 1587-1595.
4. Antonicek H, Schachner M (1988) The adhesion molecule on glia (AMOG) incorporated into lipid vesicles binds to subpopulations of neurons. *J. Neurosci* 8: 2961-2966
5. Baron U, Bujard H (2000) Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principals and advances. *Methods Enzym* 327: 401-421
6. Baltuch GH, de Tribolet N, van Meir EG (1995) Expression of CD44 adhesion molecules in tumors of the central and peripheral nervous system. *J Neuro Oncol* 26: 191-198
7. Bello L, Giussani C, Carrabba G, Pluderi M, Costa F, Bikfalvi A (2004) Angiogenesis and invasion in gliomas. *Cancer Treat Res* 117: 263-284
8. Benninghof (1994) Anatomie Band 1. Urban und Schwarzenberg, München S. 133-140.
9. Berens M, Rief M, Loo M, Giese A (1994) The role of extracellular matrix in human astrocytoma migration and proliferation studied in a microliter scale assay. *Cli. Exp. Metastasis* 12: 405-415.
10. Bernstein JJ, Woodard CA (1995) Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels. *J Neuorsurgery* 36: 124-132
11. Bjerkvig R, Lund-Johansen M, Edvardsen K (1997) Tumor cell invasion and angiogenesis in the central nervous system. *Curr Op Oncol* 9: 223-229

12. Crambert G, Hasler U, Beggah AT, Yu C, Modyanov NN, Horisberger JD, Lelièvre L, Geering K (2000) Transport and pharmacological properties of nine different human Na,K-ATPase isoenzymes. *J Biol Chem* 275: 1976-1986
13. Demuth, T, Berens ME (2004) Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol.* 70(2): 217-228
14. Florkiewicz RZ, Anchin J, Baird A (1998) The inhibition of fibroblast growth factor-2 export by cardenolides implies a novel function for the catalytic subunit of Na, K-ATPase. *J Biol Chem* 273: 544-551
15. Fox SB, Fawcett J, Jackson DG (1994) Normal human tissues in addition to some tumors express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 54: 4539-4546
16. Friedlander D, Zagzag D, Shiff B, Cohen H, Allen J, Kelly P, Grumet M (1996) Migration of brain tumor cells on extracellular matrix proteins in vitro correlates with tumor type and grade and involves α V and β 1 integrins *Cancer Res.* 56: 1939-1947
17. Giese A, Kluwe L, Laube B, Meissner H, Berens M, Westphal M (1996) Migration of human glioma cells on myelin. *J Neuorsurg* 38: 755-764
18. Giese A, Loo M, Rief M, Tran N, Berens M (1995) Substrates for astrocytoma migration. *J Neurosurg* 37: 294-302
19. Giese A, Rief M, Loo M, Berens M (1994) Determinants of human astrozytoma migration. *Cancer Res* 54: 3897-3904.
20. Giese A, Westphal M (1996) Glioma invasion in the central nervous system. *J Neurosurg* 39: 235-252
21. Gingras MC, Roussel E, Bruner J, Branch C, Moser R (1995) Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous brain tissue. *J Neuroimmunol* 57: 143-53
22. Gloor S, Antonicek H, Sweadner KJ, Pagliusi S, Frank R, Moos M, Schachner M (1990) The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the β subunit of the Na,K-ATPase. *J Cell Biology* 110: 165-174

23. Goldbrunner R, Bernstein J, Tonn JC (1999) Cell-extracellular matrix interaction on glioma invasion. *Acta Neurochir* 141: 295-305
24. Gossen, M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 5547-5551.
25. Hirohashi S, Kanai Y (2003) Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 94: 575-581
26. Isenmann S, Molthagen M, Brandner S, Bartsch U, Kühne G, Magyar J, Sure U, Schachner M, Aguzzi, A (1995) The AMOG/ β 2 subunit of Na,K-ATPase is not necessary for long-term survival of telencephalic grafts. *Glia* 15: 377-388.
27. Kawai H, Yasuda H, Terada M, Omatsu-Kanbe M, Kikkawa R (1997) Axonal contact regulates expression of α 2 and β 2 isoforms of Na⁺,K⁺-ATPase in Schwann cells: adhesion molecules and nerve regeneration. *J Neurochem* 69: 330-339
28. Kleihues P, Cavenee WK, eds. World health organization classification of tumors. Pathology and genetics. Tumors of the Nervous System. *Lyon, France: IARC Press, 2000*
29. Koob R, Kraemer D, Trippe G, Aebi U, Drenckhan D (1990) Association of kidney and parotid Na⁺,K⁺-ATPase microsomes with actin and analogs of spectrin and ankyrin. *Eur J Cell Biol* 53: 93-100
30. Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
31. Laws E, Shaffrey M (1999) The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management. *Int. J Devl Neuroscience* 17: 413-420
32. Lecuona E, Luquin S, Avila J, Garcia-Segura LM, Martin-Vasallo P (1996) Expression of the beta 1 and beta 2 (AMOG) subunits of the Na,K-ATPase in neural tissues: cellular and developmental distribution patterns. *Brain Res Bull.* 40: 167-174
33. Lesley J, Hyman R, Kincade PW (1993) CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 54: 271-335

34. Lisa M, De Angelis, M. D (2001) Brain Tumors. *N Engl J Med* 344: 114-123
35. Liotta L.A, (1983): Tumor invasion and extracellular matrix *Laboratory Investigation* 49: 636 ff.
36. Lübke, J, von Ammon K, Watanabe K, Hegi E, Kleihues P (1995) Familial brain tumor syndrome associated with a p53 germline deletion of codon 236. *Brain Pathol.* 5: 15-23
37. Lowry O. H, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193: 265
38. Magyar J, Bartsch U, Wang Z, Howells N, Aguzzi A, Wagner E, Schachner M (1994) Degeneration of neural cells in the central nervous system of mice deficient in the gene for the adhesion molecule on glia , the $\beta 2$ subunit of murine Na,K-ATPase. *J Cell Biol* 127: 835-845
39. Mareel M, Leroy A (2003) Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev.* 83: 337-374
40. Martin-Vasallo P, Wetzel RK, Garcia-Segura LM, Molina-Hogado E, Arystarkhova E, Sweadner KJ (2000) Oligodendrocytes in brain and optic nerve express the beta3 subunit isoform of Na,K-ATPase. *Glia* 31: 206-218
41. Merzak A, Koojckpour S, Pilkington GJ (1994) CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro. *Cancer Res.* 54(15): 3988-3992
42. Mikkelsen T, Rosenblum M (1999) Tumor Invasiveness. *The Gliomas* Chapter 8, Berger & Wilson, W. B. Saunders Company
43. Mobasher A, Avilla J, Cozar-Castello I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJ, Lamb JF, Martin-Vasallo P (2000) Na⁺-K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Rep* 20: 51-91
44. Molthagen M, Schachner M, Bartsch U (1996) Apoptotic cell death of photoreceptor cells in mice deficient for the adhesion molecule on glia (AMOG, the $\beta 2$ subunit of the Na,K-ATPase). *J Neurocytol* 25: 243-255
45. Mueller MM, Werbowetski T, Del Maestro RF (2003) Soluble factors involved in glioma invasion. *Acta Neurochir (Wien)* 145(11): 999-1008

46. Müller-Husmann G, Gloor S, Schachner M (1993) Functional characterisation of β isoforms of murine Na,K-ATPase. The adhesion molecule on glia (AMOG/ β 2), but not β 1, promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem* 268: 26260-26267
47. Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Sato K, Kawano H, Hayakawa T, Okada Y (1994) Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors. *J Neurosurg* 81: 69-77
48. Nollet F, Berx G, von Roy F (1999) The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2: 77-85
49. Norton T (1974) Isolation of myelin from nerve tissue. *Methods Enzymol* 3: 435-444
50. Pagliusi S, Schachner M, Seeburg P, Shivers B (1989) The adhesion molecule on glia (AMOG) is widely expressed by astrocytes in developing and adult mouse brain. *European J Neurosc* 2: 471-480
51. Paulus W (2002) Tumoren des Nervensystems. In: Pfeiffer J., J.M. Schröder (Hrsg): Neuropathologie. Springer, Berlin Heidelberg New York, 3.Aufl.
52. Paulus W (1998) Brain extracellular matrix, adhesion molecules and glioma invasion. In: Mikkelsen T, Bjerkvig R, Laerum OD, Rosenblum ML, eds. *Brain tumor invasion: Biological, clinical and therapeutic considerations.* Wiley-Liss, New York. S 301-322.
53. Paulus W, Tonn JC (1994) Basement membrane invasion of glioma cells mediated by integrin receptors. *J Neurosurg* 80: 515-519
54. Sanger F, Micklen S, Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
55. Schwab M, Caroni P (1988) Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosc* 8: 2381-2393
56. Senner V, Kismann E, Püttmann S, Hoess N, Baur I, Paulus W (2002) L1 expressed by glioma cells promotes adhesion but not migration. *Glia* 38: 146-154

57. Senner V, Schmidpeter S, Braune S, Püttmann S, Thanost S, Bartsch U, Schachner M, Paulus W (2003) AMOG/ β 2 and glioma invasion: does loss of AMOG make tumor cells run amok? *J Neurophth and Appl Neurobiol* 29: 1-8
58. Sipos L, Vitanovics D, Afra D (2004) Temozolomide chemotherapy of patients with recurrent anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Ideggyogy Sz* 57(11-12): 394-399
59. Soffietti R (2004) Chemotherapy of anaplastic oligodendroglial tumors *Expert Opin Pharmacother* 5(2): 295-306
60. Steiner C (1992) Advantages of firefly Luciferase as a reporter gene. Reprint from *Biotech forum Europe*: 123-127
61. Thorsen F, Tysnes B (1997) Brain tumor cell invasion, anatomical and biological considerations. *Anticancer Res*. 17: 4121-4126
62. Tonn JC, Goldbrunner R (2003) Mechanisms of glioma cell invasion. *Acta Neurochir Suppl* 88: 163-167
63. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354
64. Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W (2000) Exploring the sequence space for tetracycline dependant transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (14): 7963-7968
65. Vince GH, Wagner S, Pietsch T, Goldbrunner RH, Bouterfa HL, Roosen K, Tonn JC (1997) Intratumoral heterogenous expression of matrix metalloproteinases in astrocytic tumors (abstract). *Anticancer Res* 17: 4061
66. Weber P, Bartsch U, Schachner M, Montag D (1998) Na, K-ATPase subunit β 1 knock-in prevents lethality of β 2 deficiency in mice. *J Neuroscience* 18: 9192-9203.

7 Lebenslauf

8 ABKÜRZUNGEN

AMOG	Adhesion Molecule On Glia
BSA	Rinderserum-Albumin
CAM	Zelluläres Adhäsions Molekül
cDNA	coding DNA
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger-RNA
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases
Tris	Tris(hydroxy)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rodamin-Isothiocyanat
Tween	Polyethylen Sorbitan Monolaurat
WHO	World Health Organisation
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-β-D-Galactopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem