



Biologie

**Homologe Mechanismen der Migration in *Drosophila*
Glia und menschlichen Gliomzellen**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat-
im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

Kathrin Halama

aus Wetzlar

-2012-

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Prüfer
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Werner Paulus
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Christian Klämbt
Tag der mündlichen Prüfung:	02.10.2012
Tag der Promotion:	12.10.2012

MEINEN LIEBSTEN

Abstract

Glioblastomas are highly malignant brain tumors. They are characterized by diffuse infiltration, a highly proliferative phenotype and widespread genomic alterations. In this thesis we examined the role of genes identified in a *Drosophila melanogaster* glioma model. This model is based on the expression of an active form of the PDGF-receptor homolog (Pvr) and is used to identify genes which are involved in glia migration. During this thesis I identified for two of these *Drosophila* genes the human proteins LOXL4 and CD9, which play a major role during migration. LOXL4 belongs to the family of lysyl oxidases, secreted proteins which play an important role in extracellular matrix formation and migration of several cell types. The second protein (CD9) belongs to the tetraspanin-family. The members of this family are transmembrane proteins, known to interact with several proteins in so called tetraspanin enriched microdomains. Both proteins are involved in tumor progression, migration and proliferation. By siRNA mediated down regulation of the expression of endogenous LOXL4 and CD9, migration of human glioblastoma cell lines was reduced while proliferation was unaltered. Moreover I could observe a reduction of migration after inhibition of lox proteins in vivo in a glioma xenograft transplantation model in NMRI nu/nu mice. In vitro, the knock down of LOXL4 and CD9 furthermore blocked the migration promoting effect of PDGF-BB stimulation in U343 MG cells. These results led to the assumption that both proteins are involved in PDGF receptor signaling. Using the proximity ligation assay I found a colocalization of CD9 with PDGFR α and PDGFR β .

In summary LOXL4 and CD9 are highly conserved proteins, involved in *Drosophila* glia cell migration and migration of glioblastoma cells. Thus inhibition of these proteins might represent a promising target for future glioma therapy.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
1. Einleitung	1
1.1 Tumoren des Zentralen Nervensystems.....	1
1.2 Das Glioblastom	4
1.3 <i>Platelet-derived growth factor receptor</i> (PDGFR).....	10
1.4 Migration.....	12
1.5 <i>Drosophila melanogaster</i> als Glioblastom-Modellsystem	15
1.6 Kandidaten.....	17
1.6.1 Lysyloxidase und Lysyloxidase-like 4.....	17
1.6.2 CD9	19
1.7 Zielsetzung	21
2. Methoden.....	22
2.1 Zellkultur.....	22
2.1.1 Kultivierung von etablierten Zelllinien.....	22
2.1.2 Bestimmung der Zellzahl	22
2.1.3 siRNA Transfektion (Transiente Transfektion)	23
2.1.4 Bestimmung der relativen Stoffwechselaktivität (MTT-Assay)	24
2.1.5 Wundheilungsassay (Scratch Assay).....	24
2.1.6 Monolayer Migrations-Assay.....	25
2.2 Isolierung und Amplifikation von Nukleinsäuren.....	26
2.2.1 RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe	26
2.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration.....	26
2.2.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	26
2.2.4 Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR).....	27
2.3 Nachweis von Proteinen.....	28
2.3.1 Proteinbestimmung mittels LOWRY.....	28
2.3.2 Western Blot	28

Auftrennung der Proteine	28
Transfer der Proteine auf die Membran	29
Immundetektion.....	30
2.3.3 Immunhistologie und Immuncytochemie an Paraffinmaterial.....	31
2.3.4 Immunfluoreszenz.....	32
2.4 Xenotransplantations-Modell in der Maus	33
2.4.1 Verwendete Zellen	33
2.4.2 Implantation der Tumorzellen.....	33
2.4.3 BAPN-Behandlung	34
2.4.4 MRT.....	34
2.4.5 Entnahme und Fixierung der Gehirne.....	34
2.5 Nachweis von Protein-Interaktionen	35
2.5.1 PLA (<i>proximity ligation assay</i>)	35
2.6 Statistik.....	36
3. Ergebnisse	37
3.1 Auswahl der Kandidaten.....	37
LOXL4.....	37
3.2 Expression von LOX, LOXL1 und LOXL4 in Glioblastomen und Glioblastomzelllinien.....	37
3.3 Transienter Knock-down von LOXL4	43
3.3.1 Migration nach LOXL4 Knock-down in Anwesenheit von PDGF-BB.....	45
3.3.2 MTT-Assay nach LOXL4 Knock-down in Anwesenheit von PDGF-BB.....	47
3.4 Inhibition von LOXL4.....	49
3.4.1 Monolayer Migrations-Assay nach BAPN-Behandlung	49
3.4.2 MTT-Assay mit BAPN-Behandlung	51
3.5 <i>In vivo</i> Versuche: Untersuchung des Tumorwachstums im Mausmodell in Anwesenheit eines LOXL4-Inhibitors.....	52
3.5.1 Volumenbestimmung.....	52
3.5.2 Histologie und Charakterisierung der Infiltrationszone	54
3.5.3 Proliferation der unterschiedlich behandelten Tumorzellen.....	56

CD9	57
3.6 Expression von CD9 in Glioblastomen und humanen Glioblastomzelllinien.....	57
3.7 Transienter Knock-down von CD9	62
3.7.1 Migration nach CD9-Knock-down in Anwesenheit von PDGF-BB.....	64
3.7.2 MTT-Assay nach CD9-Knock-down in Anwesenheit von PDGF-BB.....	65
3.8 PLA (<i>proximity ligation assay</i>)	69
4. Diskussion	73
4.1 Identifikation von Kandidaten in einem Glioblastom-Modell	73
4.2 Lysyloxidasen	75
4.2.1 Expression von LOX, LOXL1 und LOXL4 in Glioblastomen und Glioblastomzelllinien.....	75
4.2.2 Rolle von LOXL4 bei der Migration von Glioblastomzelllinien.....	76
4.2.3 Einfluss von LOXL4 auf die PDGF-Rezeptoren	77
4.2.4 Einfluss von Lysyloxidasen auf die Extrazelluläre Matrix	78
4.3 CD9	80
4.3.1 Expression von CD9 in Glioblastomen und Glioblastomzelllinien	80
4.3.2 Rolle von CD9 bei der Migration von Glioblastomzelllinien.....	81
4.3.3 Einfluss von CD9 auf die PDGF-Rezeptoren	82
4.3.4 Untersuchung einer potentiellen Interaktion von CD9 mit PDGFR	84
4.4 Ausblick	85
5. Zusammenfassung	87
6. Anhang: Materialien	88
6.1 Zellkultur.....	88
6.1.1 Verwendete Zelllinien.....	88
6.1.2 Medien und Zusätze	88
6.2 Mäuse	89
6.3 Puffer.....	89
6.4 Geräte	93
6.5 Kits und gebrauchsfertige Lösungen	95
6.6 Verwendete siRNA	96

6.7	Chemikalien	96
6.8	Verbrauchsmittel.....	98
6.9	Antikörper	100
6.9.1	Primärantikörper.....	100
6.9.2	Sekundärantikörper	101
6.10	Primer.....	102
7.	Literaturverzeichnis.....	103
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	120
	Danksagung.....	124
	Lebenslauf	126

Abbildungsverzeichnis

1.1.1	Verteilung der zwischen 2004 und 2007 in den USA diagnostizierten ZNSTumoren.....	2
1.2.1	Zusammenfassung der häufigsten molekularen Veränderungen in Glioblastomen.....	6
1.2.2	Magnetresonanztomographie (MRT)-Bildgebung eines Glioblastoms.....	7
1.2.3	Übersicht über die Entwicklung der unterschiedlichen Zellen des ZNS.....	9
1.3.1	Interaktionen der PDGF-Liganden und ihrer Rezeptoren.....	7
1.4.1	Schematische Darstellung einer Auswahl an Protein-Protein Interaktionen im Bereich der <i>focal adhesions</i>	14
1.6.1.1	Schematische Darstellung von LOX und LOXL4.....	18
1.6.2.1	Schematische Darstellung eines Tetraspanins.....	19
2.5.1.1	Prinzip des <i>proximity ligation assays</i>	35
3.2.1	Relative Expression in % von LOX, LOXL1 und LOXL 4 in Glioblastomen.....	39
3.2.2	Immunhistochemische Färbungen für LOX, LOXL1 und LOXL4.....	40
3.2.3	Auswertung der gefärbten Glioblastomschnitte.....	40
3.2.4	Relative Expression von LOX, LOXL1 und LOXL4 in A172, U343 MG.....	41
3.2.5	Fluoreszenzfärbung für LOX, LOXL1 und LOXL4.....	42
3.3.1	Relative Expression von LOXL4 nach LOXL4 Knock-down.....	44
3.3.2	Relative Stoffwechselaktivität von LOXL4 nach LOXL4 Knock-down.....	44
3.3.1.1	relative Migration von U343 MG Zellen nach LOXL4-Knock-down.....	46
3.3.1.2	relative Migration von A172 Zellen nach LOXL4-Knock-down.....	46
3.3.2.1	Relative Stoffwechselaktivität von U343 MG Zellen mit und ohne LOXL4-Knock-down nach Stimulation mit PDGF-BB.....	48
3.3.2.2	Relative Stoffwechselaktivität von A172 Zellen mit und ohne LOXL4-Knock-down nach Stimulation mit PDGF-BB.....	48

3.4.1.1	Durch Zellen bedeckte Fläche in Prozent als Maß für die Migration von A172, U343 MG und C6-SP-GFP Zellen nach Behandlung mit BAPN.....	50
3.4.2.1	relative Stoffwechselaktivität in % von A172, U343 MG und C6-SP-GFP Zellen nach Behandlung mit BAPN.....	52
3.5.1.1	Bestimmung des Tumorumfangs.....	53
3.5.2.1	Paraffinschnitte der C6-SP-GFP-Tumoren.....	54
3.5.2.2	Charakterisierung der Infiltrationszone.....	55
3.5.3.1	Ki67-Färbung eines mit PBS behandelten und eines mit BAPN behandelten C6-SP-GFP Tumors.....	56
3.6.1	Relative Expression in % von CD9 in Glioblastomen.....	58
3.6.2	Immunhistochemische CD9-Färbung an Glioblastomschnitten.....	59
3.6.3	Relative Expression in % von CD9 in humanen Glioblastomzelllinien.....	60
3.6.4	Western Blot für CD9 an A172 und U343 MG Zellen.....	60
3.6.5	Fluoreszenzfärbung gegen PDGFR α , PDGFR β und CD9.....	61
3.7.1	Relative Expression von CD9 nach CD9 Knock-down.....	62
3.7.2	Relative Stoffwechselaktivität nach CD9 Knock-down.....	63
3.7.1.1	relative Migration von U343 MG Zellen nach CD9 Knock-down mit und ohne PDGF-BB.....	64
3.7.1.2	relative Migration von A172 Zellen nach CD9 Knock-down mit PDGF-BB.....	65
3.7.2.1	Relative Stoffwechselaktivität in U343 MG Zellen nach CD9 Knock-down in An- und Abwesenheit unterschiedlicher PDGF-BB Konzentrationen.....	66
3.7.2.2	Relative Stoffwechselaktivität in A172 Zellen nach CD9 Knock-down in An- und Abwesenheit unterschiedlicher PDGF-BB Konzentrationen.....	68
3.8.1	Negativ- und Positivkontrolle für das <i>Proximity Ligation Assay</i>	69
3.8.2	PLA mit CD9 und PDGFR alpha/beta an U343 MG und A172 Zellen.....	70
3.8.3	PLA mit CD9 und PDGFR alpha/beta an U343 MG und A172 Zellen.....	71

Tabellenverzeichnis

1.1.1	WHO Einteilung astrozytärer Tumore.....	3
2.1.3.1	Zusammensetzung der Transfektionsansätze für die unterschiedlichen Zelllinien und siRNAs in 24 well Platten.....	23
2.2.4.1	Reaktionsansatz für die qRT-PCR.....	27
2.2.4.2	Standardprogramm für die qRT-PCR.....	27
2.3.2.1	Zusammensetzung der Polyacrylamid SDS-Gele.....	29
2.3.2.2	Kombinationen der unterschiedlichen Antikörper und Puffer.....	31

1. Einleitung

1.1 Tumoren des Zentralen Nervensystems

Das zentrale Nervensystem (ZNS) setzt sich aus unterschiedlichen Zelltypen zusammen, deren Funktionen eng miteinander verbunden sind. Diese Zellen sind in die stützende extrazelluläre Matrix (ECM) eingebettet. Neben den Neuronen spielen die verschiedenen Gliazelltypen eine sehr wichtige Rolle. Man unterscheidet dabei drei Gruppen, die Neuroglia (z.B. Astrozyten und Oligodendrozyten), periphere Gliazellen (z.B. Schwannzellen) und Mesoglia (Mikroglia) (Wolburg 1995).

Astrozyten schaffen die für das Funktionieren der Neurone wichtige optimale Umgebung (Nedergaard, Ransom et al. 2003; Gee und Keller 2005). Sie spielen nicht nur eine Rolle bei der Reizweiterleitung an den Synapsen, sondern auch während der Entwicklung des Nervensystems (Powell und Geller 1999; Ullian, Christopherson et al. 2004). Dabei interagieren Astrozyten nicht nur mit Neuronen und anderen Astrozyten, sondern auch mit den Endothelzellen der Gefäße und scheinen so an der Bildung der Blut-Hirn Schranke beteiligt zu sein (Janzer und Raff 1987; Abbott, Rönnbäck et al. 2006; Sofroniew und Vinters 2010). Es gibt zwei verschiedenen Typen von Astrozyten, die nach ihrer anatomischen Lage und ihrer Morphologie, in die protoplastischen Astrozyten der grauen Substanz und die fibrillären Astrozyten der weißen Substanz unterteilt werden (Sofroniew und Vinters 2010).

Oligodendrozyten bilden eine isolierende Myelinschicht um die Axone des ZNS und ermöglichen dadurch eine verbesserte Reizweiterleitung und den Schutz der Axone, während Schwannzellen diese Funktion im peripheren Nervensystem (PNS) übernehmen (Schafer und Rasband 2006; Yin, Baek et al. 2006). Mikroglia gelten als Immunzellen des ZNS (Kim und de Vellis 2005). Sie stammen von Myeloid Vorläuferzellen ab und wandern im Laufe der Entwicklung in alle Bereiche des ZNS ein (Hanisch und Kettenmann 2007).

Die ECM, in der all diese Zellen eingebettet sind, besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Bestandteile, die unter anderem von Neuronen und Gliazellen synthetisiert werden. Die hauptsächlichen Bestandteile der ECM sind Hyaluron,

Proteoglykane und Tenascin-C, daneben findet man noch geringe Mengen an Kollagenen, Laminin und Fibronectin. Die Zusammensetzung der ECM verändert sich während der Tumorentstehung (Jones, Ruoslahti et al. 1982; Bellon, Caulet et al. 1985; McComb, Moul et al. 1987; Rutka, Apodaca et al. 1988; Gladson 1999).

Aufgrund der Wechselwirkungen der Zellen untereinander und mit der ECM kann es durch Fehlfunktion einzelner Zellen zur Entstehung der unterschiedlichsten Erkrankungen kommen (Sofroniew und Vinters 2010). Darunter findet man eine Vielzahl an Tumoren, die von der *World Health Organisation* (WHO) auf Basis ihrer histologischen Eigenschaften eingeteilt wurden. Die WHO unterscheidet zwischen Grad I, II, III und Grad IV Tumoren. Dabei nimmt die Malignität von Grad I nach IV zu (Louis, Ohgaki et al. 2007).

Die Tumoren des ZNS sind bekannt für ihre morphologische Vielfalt. So findet man neben Astrozytomen, Oligodendrogliomen und Meningeomen noch einige andere Tumoren des ZNS (Abbildung 1.1.1) (CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004–2007. 2011; www.cbtrus.org/reports/reportshhtml). Glioblastome sind mit 16,7% die am zweithäufigsten diagnostizierten Tumore des ZNS (Abbildung 1.1.1). Betrachtet man dabei nur die Gliome, die 80% der malignen Tumore des ZNS ausmachen, so sind Glioblastome mit 53,7% am häufigsten (CBTRUS, 2011).

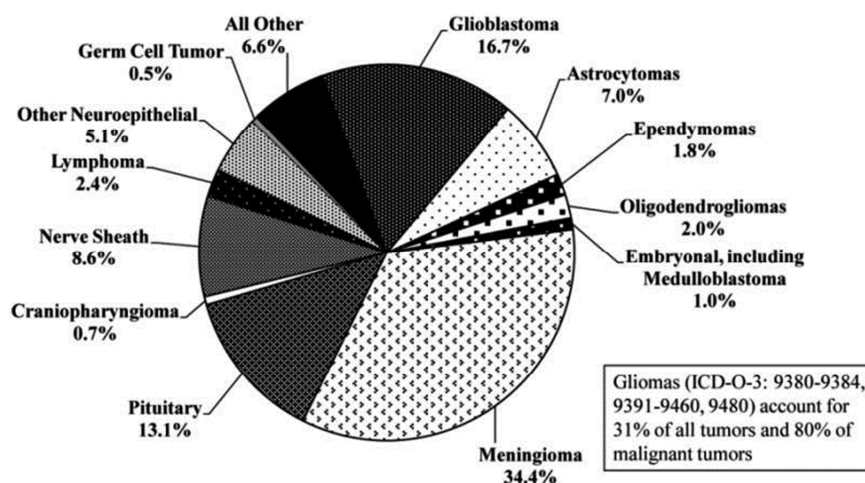


Abbildung 1.1.1: Häufigkeit der zwischen 2004 und 2007 in den Vereinigten Staaten diagnostizierten Tumoren des ZNS. Mit 34,4% sind gutartige Meningeome dabei am Häufigsten, gefolgt von Glioblastomen mit 16,7% (CBTRUS 2011).

Astrozytäre Tumoren

Eine wichtige Gruppe innerhalb der Tumoren des ZNS sind die astrozytären Tumoren. Sie werden eingeteilt in pädiatrische Astrozytome wie das pilozytische Astrozytom, das pilomyxoide Astrozytom und das pleomorphe Xanthoastrozytom, welches auch bei jungen Erwachsenen zu finden ist. Ein weiterer astrozytärer Tumor ist das subependymale Riesenzell-Astrozytom, welches überwiegend bei Patienten mit einem familiären Tumor-Syndrom (*tuberous sclerosis complex*, TSC) auftritt. Darüber hinaus gibt es diffus infiltrierende adulte astrozytäre Tumoren, wie das diffuse Astrozytom, das anaplastische Astrozytom und das Glioblastom. Neben den Glioblastomen gibt es noch zwei selteneren Varianten, das Riesenzell-Glioblastom und das Gliosarkom (Ichimura, Ohgaki et al. 2004; Louis, Ohgaki et al. 2007). Die WHO Einteilung dieser Tumoren ist in Tabelle 1.1.1 aufgelistet.

Tabelle 1.1.1: WHO Einteilung astrozytärer Tumore (Tabelle nach (Louis, Ohgaki et al. 2007))

	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV
Subependymales Riesenzell-Astrozytom	•			
Pilozytisches Astrozytom	•			
Pilomyxoides Astrozytom		•		
Diffuses Astrozytom		•		
Pleomorphisches Xanthoastrozytom		•		
Anaplastisches Astrozytom			•	
Glioblastom				•
Riesenzell-Glioblastom				•
Gliosarkom				•

1.2 Das Glioblastom

Glioblastome sind die häufigsten malignen Hirntumoren bei Erwachsenen, mit einer Inzidenz von 3-4 Fällen pro 100.000 Einwohner (CBTRUS 2011). Sie zeichnen sich durch starkes Migrationsverhalten der Tumorzellen, eine ausgeprägte Angiogenese und das häufige Auftreten von Nekrosen aus (Louis, Ohgaki et al. 2007). Aufgrund der hohen Aggressivität der Tumoren, liegt die mittlere Überlebensdauer von Glioblastompatienten bei 15 Monaten (Stupp, Mason et al. 2005; Wen und Kesari 2008).

Es werden zwei Typen von Glioblastomen unterschieden, das primäre und das sekundäre Glioblastom. Bei dem weitaus häufigeren primären Glioblastom (>90% der Fälle), handelt es sich um einen neu (*de novo*) entstandenen Tumor dem kein niedriggradiger astrozytärer Tumor voraus gegangen ist. Diese Tumoren entstehen meist bei älteren Patienten mit einem Durchschnittsalter von 62 Jahren und zeichnen sich durch eine sehr kurze durchschnittliche Überlebensdauer von nur wenigen Monaten aus. Sekundäre Glioblastome hingegen treten bei jüngeren Patienten auf (Durchschnittsalter 45 Jahre) und entstehen aus einem bereits vorhandenen Tumor, wie zum Beispiel einem diffusen Astrozytom (WHO Grad II) oder einem anaplastischen Astrozytom (WHO Grad III) (Ohgaki, Dessen et al. 2004; Ohgaki und Kleihues 2005; Ohgaki und Kleihues 2009). Neben den beiden Glioblastom-Typen beim Erwachsenen gibt es auch Glioblastome im Kindesalter. Diese sind mit 2,8% der bei Kindern diagnostizierten Tumoren des ZNS wesentlich seltener (Pfister, Hartmann et al. 2009).

Glioblastome bestehen aus wenig differenzierten, oft pleomorphen astrozytären Tumorzellen. Diese Zellen sind häufig durch atypisch veränderte Zellkerne und sehr hohe proliferative Aktivität gekennzeichnet. Weitere wichtige Kennzeichen eines Glioblastoms sind die starke mikrovaskuläre Proliferation und/oder Nekrosen innerhalb des Tumors. Trotz dieser typischen Merkmale ist das histologische Erscheinungsbild dieser Tumoren sehr variabel. So findet man in manchen Tumoren Riesenzellen mit mehreren Zellkernen während andere Tumoren sehr zellreich, dafür aber einheitlicher in ihrem Zellbild erscheinen (Kleihues 2007).

Während sich primäre und das sekundäre Glioblastom histologisch nicht unterscheiden, weisen sie auf genetischer Ebene deutliche Unterschiede auf. So findet man bei primären Glioblastomen häufig eine Mutation, Amplifikation oder Überexpression des *epidermal growth factor receptor (egfr)*-Gens, während sekundäre Glioblastome hingegen eine Überexpression des *platelet-derived growth factor receptor (pdgfr)*-Gens aufweisen (Furnari, Fenton et al. 2007; Wen und Kesari 2008). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal sind Mutationen im *isocitrate dehydrogenase I oder II Gens (IDH I und II)*, die nur in sekundären Glioblastomen und den niedriggradigen Tumoren aus denen sie hervorgehen zu finden sind. Eine IDH-Mutation wird mit einer besseren Prognose assoziiert (Yan, Parsons et al. 2009; Riemenschneider, Jeuken et al. 2010).

Im Falle der pädiatrischen Tumoren findet man eine Protein 53 (p53) Mutation vermehrt in primären Glioblastomen, während diese Mutation bei Erwachsenen verstärkt in sekundären Glioblastomen zu finden ist. Eine Amplifikation des *egfr*-Gens, welches bei adulten primären Glioblastomen eine der häufigsten genetischen Veränderungen darstellt, ist bei Glioblastomen im Kindesalter mit unter 10% eher selten (Bredel, Pollack et al. 1999; Sung, Miller et al. 2000). Eine Auflistung dieser und anderer genetischer Veränderungen ist in Abbildung 1.2.1 zusammengefasst.

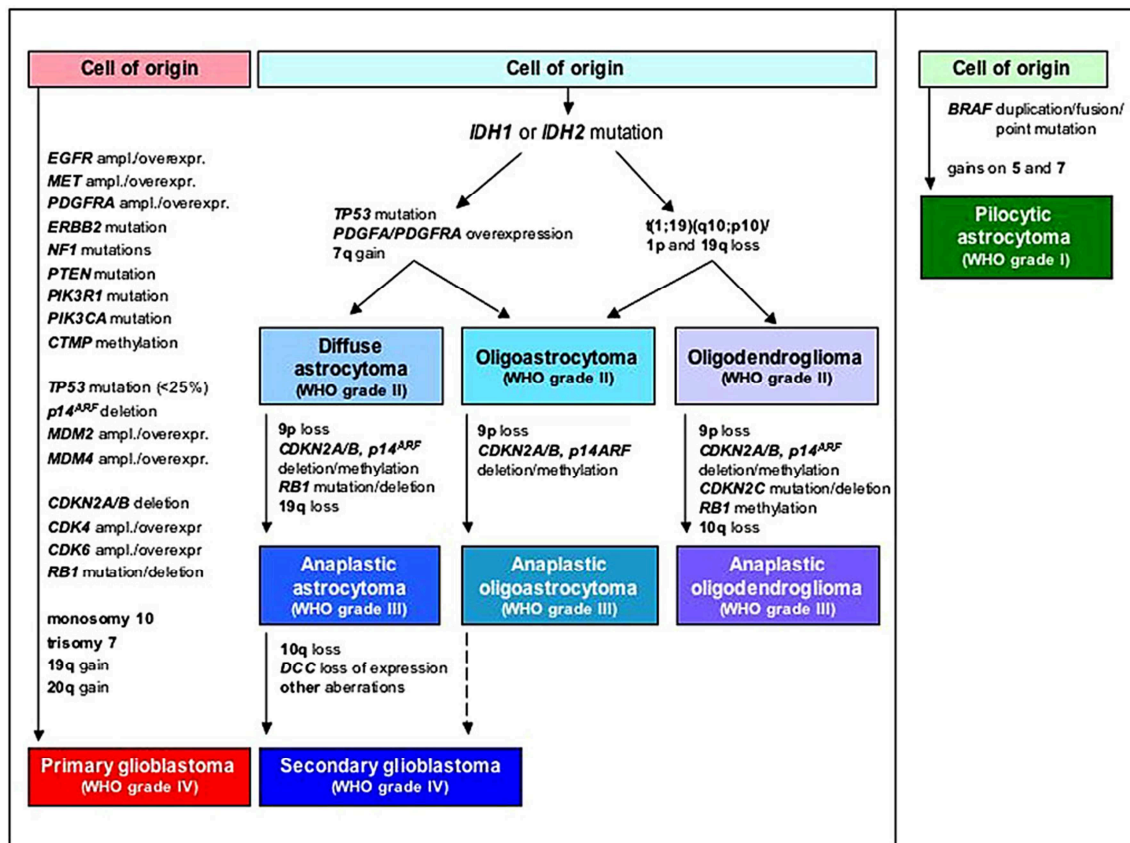


Abbildung 1.2.1: Zusammenfassung der häufigsten molekularen Veränderungen, die zu der Entstehung eines primären oder sekundären Glioblastoms führen. Darunter sind Mitglieder des *Rezeptor Tyrosinkinase (RTK)/ mitogen-activated Proteinkinase/ Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3K) Signalwegs* (z.B. EGFR, MET, PDGFRA, ERBB2, NF1, PTEN, PIK3R1, PI3KCA, CTMP), des *P53 Signalwegs* (z.B. p14^{ARF}, MDM2, MDM4) und des *Retinoblastom-Protein (Rb)-Signalwegs* (z.B. CDKN2A und B (Tumorsupressor), CDK4, CDK6, RB1). Zusätzlich zu diesen Mutationen sind häufig auch Veränderungen der Chromosomenzahl zu beobachten (Riemenschneider, Jeuken et al. 2010).

Ein großes Problem bei der operativen Entfernung der Tumoren ist die starke Neigung der Glioblastomzellen zur Infiltration in das umliegende Gewebe (Giese, Bjerkvig et al. 2003).

Nach operativer Entfernung kommt es bei 90% der Patienten zur Bildung eines Rezidivs in 2-3 cm Abstand zum Resektionsrand (Burger, Dubois et al. 1983; Gaspar, Fisher et al. 1992; Giese, Bjerkvig et al. 2003; Lefranc, Brotchi et al. 2005). Rezidive können aber auch in weiter entfernten Gehirnregionen bis hin zur vorher nicht betroffenen Hemisphäre auftreten (Abbildung 1.2.2) (Lefranc, Brotchi et al. 2005).

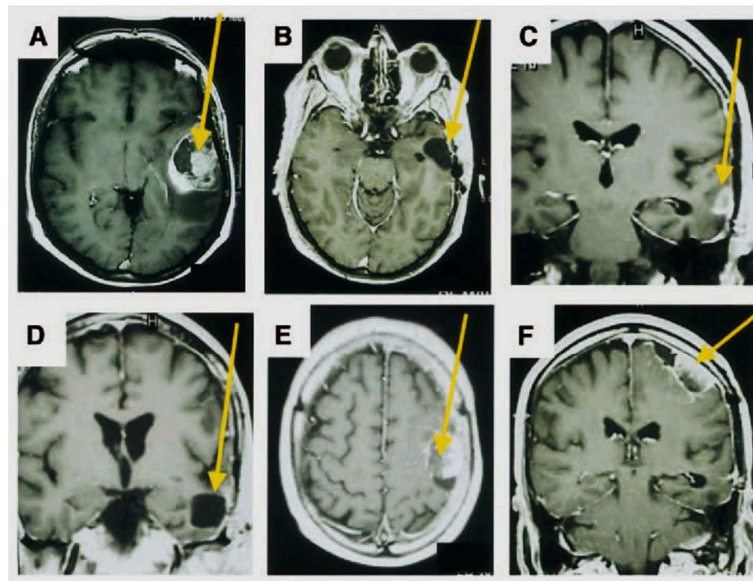


Abbildung 1.2.2: Magnetresonanztomographie (MRT)-Bildgebung eines Glioblastoms. **A** Präoperative Untersuchung, **B** Zustand nach Entfernung des Tumors, **C** lokales Rezidiv 4 Monate nach der ersten Operation, **D** Zustand nach dem zweiten operativen Eingriff, **E** und **F** MRT-Aufnahme drei Monate nach der zweiten Operation zeigt einen neuen Tumor an einer anderen Stelle des Gehirns (Lefranc, Brotchi et al. 2005).

Die Tumoren des ZNS nutzen, bzw. beeinflussen die eng miteinander verbundenen Interaktionen der unterschiedlichen Zelltypen. So migrieren Tumorzellen meist entlang von Gefäßen und speziellen Strukturen der ECM (Bellail, Hunter et al. 2004; Claes, Idema et al. 2007).

Glioblastomzellen sind in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu stören, dennoch findet man selten Zellen eines astrozytären Tumors im Blut eines Patienten und somit kommt es bei dieser Erkrankung selten zur Bildung von hämatogenen Metastasen (Bohm, Wassmann et al. 2003; Schneider, Ludwig et al. 2004).

Einteilung und Therapie

Eine zusätzliche Erschwernis der Therapie resultiert aus der starken genetischen Heterogenität der Tumoren. Durch die hohe Komplexität der molekularen Veränderungen reagieren die Tumorzellen sehr unterschiedlich auf vorhandene Therapiemöglichkeiten (Gilbert 2011).

Die drei häufigsten genetischen Veränderungen findet man (1) im Rezeptor Tyrosinkinase (RTK)/ RAt Sarcoma (Ras)/ Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3K) Signalweg, der eine Rolle bei der Regulation von Wachstumsfaktorrezeptoren spielt, (2) beim p53 Signalweg, der eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Schädigungen spielt, (3) und im Retinoblastom-Protein (Rb)-Signalweg, der die Zellteilung reguliert (TCGA 2008; Wen und Kesari 2008; Bleau, Huse et al. 2009).

Ein weiterer Faktor, der zu einer Deregulation der Proliferation führt, ist eine veränderte Expression von Wachstumsfaktor-rezeptoren wie EGFR und PDGFR. Im Falle der Amplifikation des EGFR kommt es bei der Hälfte der betroffenen Tumoren zur Expression eines konstitutiv aktiven EGFR (EGFRvIII) (Pelloski, Ballman et al. 2007; Wen und Kesari 2008). Im Falle des PDGFR liegt nicht nur eine Amplifikation des Rezeptors vor, sondern zusätzlich eine Produktion des Liganden durch die Tumorzellen. Aufgrund dessen kommt es zu einer autokrinen Aktivierung des Rezeptors und zur Stimulierung der Proliferation (Furnari, Fenton et al. 2007; Wen und Kesari 2008). Die verstärkte Aktivität des PDGFR-Signalwegs wird häufig mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht (Brennan, Momota et al. 2009; Ozawa, Brennan et al. 2010).

Die Häufigkeit der beschriebenen Veränderungen wurde von dem *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) Netzwerk anhand von 206 Glioblastom-Fällen ermittelt und liegt für den RTK/Ras/PI-3K Signalweg bei 88%, für den p53-Signalweg bei 87% und für den Rb-Signalweg bei 78% (TCGA 2008). Eine weiterführende Einteilung der Glioblastom-Subtypen stammt von Phillips et al. Bei dieser Einteilung werden nicht nur die genetischen Unterschiede und deregulierten Signalwege berücksichtigt, sondern auch die Prognose für das Überleben der Patienten. Diese Einteilung führt zu drei Subtypen, dem proneuralen Glioblastom mit einer längeren Überlebenszeit und den proliferativen und mesenchymalen Glioblastomen mit einer kürzeren Überlebenszeit (Phillips, Kharbanda et al. 2006). Basierend auf der Einteilung von Phillips et al. und der des TCGA wurde von Verhaak et al. noch ein vierter Subtyp eingeführt, das klassische Glioblastom. Zusätzlich ordnet er den vier Subtypen verschiedene Marker zu, die eine Unterscheidung erleichtern sollen, um die richtige Therapie für einen bestimmten Subtyp auswählen zu können (Verhaak, Hoadley et al. 2010).

Entstehung

Welche Zelltypen an der Entstehung von Glioblastomen beteiligt sind, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Zur Debatte stehen Astrozyten, gliale Vorläuferzellen und gliale Stammzellen (Furnari, Fenton et al. 2007). Es gibt Hinweise darauf, dass nur eine kleine Population der Zellen eines Tumors im Stande ist einen Tumor zu bilden (Singh, Hawkins et al. 2004; Furnari, Fenton et al. 2007). So findet man innerhalb eines Tumors nur eine kleine Population an *cluster of differentiation* 133 (CD133)-positiven, sogenannten Tumorstammzellen (Singh, Clarke et al. 2003; Furnari, Fenton et al. 2007; Yan, Ma et al. 2010). Diese Zellen ähneln sehr stark neuronalen Stammzellen und scheinen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des Tumors zu spielen (Singh, Clarke et al. 2003). Auch die bei Glioblastomen häufig beobachtete Resistenz gegenüber Strahlentherapie und Chemotherapie scheint durch CD133 positive Tumorzellen vermittelt zu sein (Bao, Wu et al. 2006; Liu, Yuan et al. 2006).

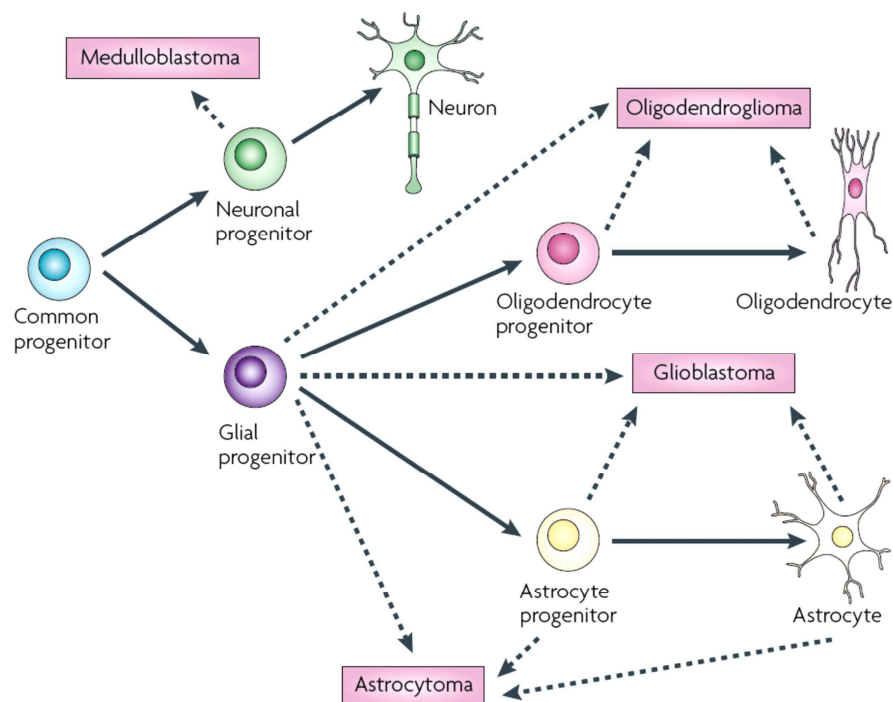


Abbildung 1.2.3: Übersicht über die Entwicklung der unterschiedlichen Zellen des ZNS aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle (durchgezogene Pfeile). Die gestrichelten Pfeile ordnen die in Verdacht stehenden Ursprungszellen dem jeweiligen Tumor zu (Huse und Holland 2010).

1.3 Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)

Der *Platelet-derived growth factor* (PDGF) wurde vor über 30 Jahren als Wachstumsfaktor für Fibroblasten, *smooth muscle cells* (SMCs) und Gliazellen entdeckt (Kohler und Lipton 1974; Ross, Glomset et al. 1974; Westermark und Wasteson 1976). Die PDGF-Familie setzt sich aus vier verschiedenen Polypeptidketten zusammen, die grundsätzlich als Dimere vorkommen. Während PDGF-A und PDGF-B schon seit Langem bekannt sind, wurden die PDGF-C und PDGF-D Ketten erst innerhalb der letzten Jahre entdeckt ((Li, Pontén et al. 2000; Bergsten, Uutela et al. 2001; LaRochelle, Jeffers et al. 2001). Durch die Bildung von Disulfidbrückenbindungen entstehen unterschiedliche Homo- bzw. Heterodimere aus den vier PDGF-Ketten. Bis dato (2012) sind fünf verschiedene Isoformen bekannt: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC und PDGF-DD (Fredriksson, Li et al. 2004). Alle vier PDGF-Ketten enthalten eine etwa 100 Aminosäuren lange, hoch konservierte Wachstumsfaktordomäne. Diese sogenannte PDGF/VEGF *homology domain* ist neben der PDGF-Familie auch in der *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Familie zu finden (Joukov, Kaipainen et al. 1997). Die PDGF/VEGF *homology domain* ist evolutionär so stark konserviert, dass man sie auch in *Drosophila melanogaster* findet (Duchek, Somogyi et al. 2001; Heino, Kärpänen et al. 2001; Munier, Doucet et al. 2002).

Die *platelet-derived growth factor* Rezeptoren (PDGFR α und PDGFR β) gehören zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Nach Bindung der Liganden kommt es aufgrund der doppelten Rezeptorbindungsstellen des PDGF-Dimers zur Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten (Fretto, Snape et al. 1993). Dadurch kommt es zur Bildung von drei Rezeptor-Varianten, PDGFR $\alpha\alpha$, PDGFR $\alpha\beta$ und PDGFR- $\beta\beta$ (Beckmann, Betsholtz et al. 1988). Die Affinität der Ligand-Rezeptor-Bindung unterscheidet sich von Ligand zu Ligand. Während PDGF-AA nur mit PDGFR $\alpha\alpha$ interagiert, kann PDGF-AB mit PDGFR $\alpha\alpha$ und $\alpha\beta$ wechselwirken. PDGF-CC und DD müssen nach der Sekretion noch proteolytisch aktiviert werden. Nach Aktivierung interagiert PDGF-CC mit PDGFR $\alpha\alpha$ und $\alpha\beta$. PDGF-DD hingegen geht mit großer Affinität Wechselwirkungen mit PDGFR $\beta\beta$, aber nur mit geringer Affinität mit PDGFR $\alpha\beta$. Als einziger der vier Liganden interagiert PDGF-BB mit allen drei Rezeptorvarianten (Abbildung 1.3.1) (Hart, Forstrom et al.

1988; Li, Ponten et al. 2000; Bergsten, Uutela et al. 2001; Gilbertson, Duff et al. 2001; LaRochelle, Jeffers et al. 2001).

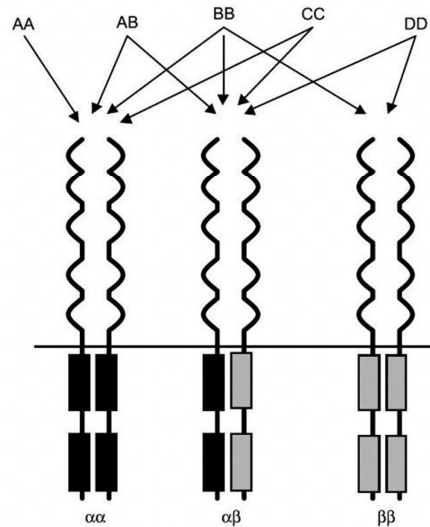


Abbildung 1.3.1: Wechselwirkungen der PDGF-Liganden und ihrer Rezeptoren. Die vier verschiedenen sezernierten Liganden (AA, AB, BB, CC und DD) binden mit unterschiedlicher Affinität an die drei Rezeptoren ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ und $\beta\beta$) (schwarze Pfeile) (Shih und Holland 2006).

Aufgrund der Dimerisierung der Rezeptoren nach Bindung eines Liganden kommt es zur Transphosphorylierung und damit zur Aktivierung und zum Freiwerden von Bindestellen für weitere Signalmoleküle (Kazlauskas und Cooper 1989; Kelly, Haldeman et al. 1991). Die dadurch aktivierten Signalwege sind vielfältig. So spielen PDGF und ihre Rezeptoren nicht nur eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung, sondern auch im adulten Organismus. Sie haben unter anderem Einfluss auf die Angiogenese, Differenzierung, Proliferation, chemotaktische Antwort und Migration verschiedener Zellen (Raff 1989; Barnes und Hevey 1990; Siegbahn, Hammacher et al. 1990; Leveen, Pekny et al. 1994; Betsholtz, Karlsson et al. 2001).

Mehrere Studien der letzten 20 Jahre bestätigen eine Rolle von PDGF und PDGFR in Tumoren, darunter auch in Gliomen (Hermanson, Funa et al. 1992; Plate, Breier et al. 1992; Westermarck, Heldin et al. 1995). Dabei findet man PDGFR α und seine Liganden (PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB) hauptsächlich

in Tumorzellen höhergradiger Tumoren während man PDGFR β in stark proliferierenden Endothelzellen innerhalb eines Glioms findet (Hermanson, Funa et al. 1992; Plate, Breier et al. 1992; Westermarck, Heldin et al. 1995; Di Rocco, Carroll et al. 1998). In Studien wurde mehrfach eine deutlich erhöhte Expression von PDGFR α und PDGF-A in höhergradigen Tumoren gefunden (Mapstone 1991; Hermanson, Funa et al. 1996; Rosenkranz und Kazlauskas 1999; Smith, Wang et al. 2000; Yu, Deuel et al. 2000). Bei rezidierten Glioblastomen wirkt sich die erhöhte Expression von PDGFR α negativ auf das Überleben der Patienten aus (Paulsson, Lindh et al. 2011). Auch die beiden weiteren Liganden, PDGF-CC und PDGF-DD, werden in Glioblastomen produziert (Lokker, Sullivan et al. 2002). Amplifikationen wie beim EGF-Rezeptor sind im Falle des PDGFR eher selten. Allerdings gibt es ähnlich wie beim EGFR, auch eine konstitutiv aktive Form des PDGFR α (Deletion der Exone 8 und 9), die zu einer Steigerung der Tumorigenität führt (Clarke und Dirks 2003).

1.4 Migration

Die Migration von Tumorzellen ist ein komplexes Geschehen, das sich aus drei voneinander unabhängigen Prozessen zusammensetzt. Der erste Schritt ist die Adhäsion der migrierenden Zellen an unterschiedliche Komponenten der ECM. Der zweite Schritt beinhaltet die Reorganisation des Aktingerüsts der Zelle. Dies geschieht zum Teil durch die Interaktion der Integrine auf der Zelloberfläche mit der ECM. Der dritte, und finale Schritt, ist die Invasion der Zellen in das umliegende Gewebe. Dazu werden von der Zelle verschiedene Enzyme, wie z.B. Matrix Metalloproteinasen sezerniert, die die ECM durch Degradierung von Proteinen auflockern (Rao 2003).

Die Migration der Tumorzellen findet häufig entlang von Gefäßen und myelinisierten Axonen der weißen Substanz statt (Bellail, Hunter et al. 2004; Claes, Idema et al. 2007). Auf molekularer Ebene kann man den Vorgang der Migration in fünf Schritte unterteilen.

(1) Als erster Schritt findet eine Polarisierung der Zelle durch Akkumulation von Aktin an der Zellmembran statt. Dadurch bilden sich Zellfortsätze, die die ECM

auseinander drücken und somit die Richtung der Migration angeben. Während dieser Polarisierung wandert der Zellkern in den hinteren Teil der Zelle.

(2) Als zweiter Schritt findet eine Interaktion dieser Zellfortsätze mit der umliegenden ECM statt.

(3) Anschließend kommt es zur proteolytischen Degradation und Neuordnung der ECM.

(4) Als nächstes erfolgt eine Myosin II vermittelte Kontraktion der Aktinfilamente und dadurch der Aufbau einer Spannung zwischen dem *leading edge* (der Vorderseite der Zelle in Migrationsrichtung) und dem *trailing edge* (dem hinteren Teil der Zelle).

(5) Schließlich kommt es zu einem allmählichen Ablösen der Adhäsionskräfte am hinteren Teil der Zelle und zu einem Gleiten der Zelle über das Substrat in Richtung des *leading edge* (Friedl, Wolf et al. 2011).

Ein wichtiger Schritt während der Migration ist die Interaktion zwischen der migrierenden Zelle und der ECM. Es gibt verschiedene ECM-Komponenten die die Migration begünstigen. Dazu zählen unter anderem Laminine, Fibronektine, Kollagene (z.B. Kollagen I, IV und XVI), *secreted protein acidic and rich in cystein* (SPARC) und Tenascin-C. Diese ECM-Komponenten sind teilweise in Tumoren stärker vertreten als im gesunden Gehirn. Es konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen im Stande sind diese Proteine selbst herzustellen, um sich so eine migrationsfreundliche Umgebung zu schaffen (Giese, Rief et al. 1994; Paulus und Tonn 1995; Bellail, Hunter et al. 2004; Senner, Ratzinger et al. 2008). Neben ihrer Rolle bei der Migration, können ECM-Komponenten auch Einfluss auf andere Eigenschaften der Tumorzellen haben, wie auf das Überleben, den Zellzyklus und die Angiogenese (Sarkar, Nuttall et al. 2006).

Die Interaktion mit der ECM geschieht über Proteine auf der Zelloberfläche. Dabei spielen Integrine eine wichtige Rolle. Besonders der β 1-Untereinheit einiger Integrine wird eine bedeutende Rolle bei dem malignen Verhalten der Tumorzellen zugeschrieben (Paulus, Baur et al. 1996; Tysnes, Larsen et al. 1996; Uhm, Gladson et al. 1999). Neben der Adhäsion, regulieren Integrine auch die Aktivität von Proteasen. Diese Proteasen sind verantwortlich für die Degradation und Neuordnung der ECM, und damit von essentieller Bedeutung für die

Migration. An diesem Prozess beteiligte Proteasen sind unter anderem Matrix Metalloproteinasen (MMPs), Serinproteasen (die Plasminogen Aktivatoren uPA und tPA) und Cysteinproteasen (Cathepsin B, DL und H) (Grondahl-Hansen, Christensen et al. 1993; Sarkar, Nuttall et al. 2006; Veeravalli, Chetty et al. 2010). Die Produktion dieser Proteasen durch die Tumorzellen begünstigt nicht nur die Migration und Invasion, sondern ist auch ein wichtiger Faktor bei der Bildung neuer Blutgefäße zur besseren Versorgung des Tumors (Raghu, Lakka et al. 2010).

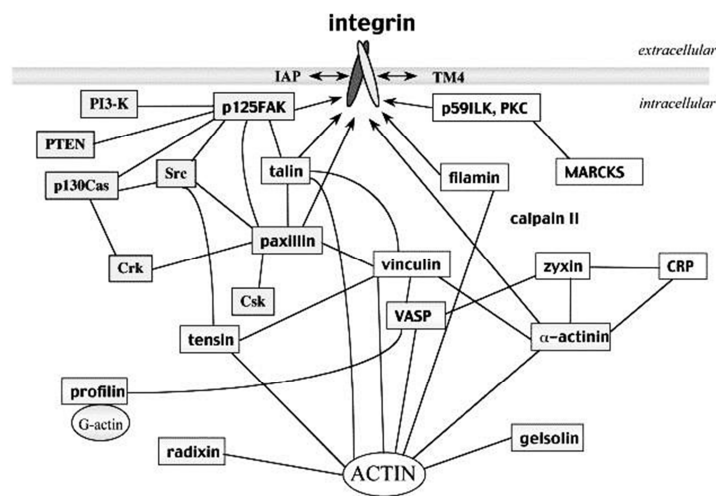


Abbildung 1.4.1: Schematische Darstellung einer Auswahl an Protein-Protein Interaktionen im Bereich der *focal adhesions*. Integrine interagieren intrazellulär mit einer Vielzahl an Proteinen (multimolekularen Komplex) und somit nicht nur mit Strukturproteinen wie Aktin, sondern auch mit verschiedenen Signalkaskaden, die nach Bindung von Integrin mit Komponenten der ECM entweder aktiviert oder inhibiert werden (Petit und Thiery 2000).

Die Adhäsion an die ECM findet an spezialisierten Bereichen der Plasmamembran statt. Diese Bereiche werden *focal adhesions* genannt und zeichnen sich durch eine Ansammlung an Aktinfilamenten aus, die durch einen multimolekularen Komplex an Integrine gekoppelt sind (Petit und Thiery 2000) (Abbildung 1.4.1). Die Interaktion dieser Integrine und anderer Membranproteine, wie Lektine und Cadherine, mit der ECM führt zu einer Aktivierung von unterschiedlichen Signalwegen in der Zelle. Darunter sind Signalwege die Proliferation, Migration und Überlebensfähigkeit der Zelle steuern (Howe, Aplin et al. 1998; Lefranc, Brotchi et al. 2005; Claes, Idema et al.

2007). Einige Proteine dieses Komplexes, die entweder direkt oder indirekt an die Aktinfilamenten des Zytoskeletts binden sind Tensin, das z.B. eine Rolle beim *crosslinking* von Aktinfilamenten spielt, Zyxin, Paxillin und die *focal adhesion kinase* (FAK) (Ilic, Furuta et al. 1995; Petit und Thiery 2000; Belot, Rorive et al. 2001).

1.5 *Drosophila melanogaster* als Glioblastom-Modellsystem

Seit einigen Jahren gilt *Drosophila melanogaster* als vielversprechendes Modellsystem zur Erforschung neuer tumorrelevanter Gene. Dies beruht auf der Tatsache, dass für die meisten humanen Onkogene und Tumorsuppressorgene ein Homolog in *Drosophila melanogaster* zu finden ist und die dazu gehörigen Signalkaskaden meist evolutionär stark konserviert sind (Rubin und Lewis 2000; Reiter und Bier 2002; Brumby und Richardson 2005; Vidal und Cagan 2006).

Die bis jetzt am häufigsten verwendeten *in vivo* Gliom-Modelle beruhen auf der Transplantation von Glioblastomzelllinien in die Gehirne von Mäusen und Ratten (Xenotransplantation) oder auf der Verwendung von transgenen Mäusen (Holland 2001; Maddison und Clarke 2005; Reilly, Rubin et al. 2008). Einige der Vorteile des *Drosophila*-Modells gegenüber diesen Methoden sind die kurze Generationenfolge, die große Menge an Nachkommen, das detaillierte Wissen über die Anatomie der Tiere und die Verfügbarkeit vieler unterschiedlicher Mutanten und genetischer Techniken zur Untersuchung. Ein weiterer großer Vorteil ist die Möglichkeit der zeit- und gewebespezifischen Expression von Überexpressions-Konstrukten bzw. RNAi-Konstrukten zum Knockdown von Genen (Brand und Perrimon 1993; Matthews, Kaufman et al. 2005; Venken und Bellen 2005; Dietzl, Chen et al. 2007). Eines dieser Systeme ist das Gal4-UAS-System. Es besteht aus Gal4, einem Transkriptionsfaktor aus der Hefe, und der *Upstream Activating Sequence* (UAS). Durch Bindung des Gal4-Proteins an UAS kommt es zum Ablesen eines *downstream* gelegenen Zielgens. Gal4 steht dabei unter der Kontrolle eines schwachen Promotors. Dieser wird häufig für eine gewebespezifische Expression des Zielgens genutzt. So ermöglicht z.B. die Verwendung des Promotors *reversed polarity* (*repo*) eine gliaspezifische

Expression (Brand und Perrimon 1993; Halter, Urban et al. 1995; Witte, Jeibmann et al. 2009).

Von besonderem Interesse im Bereich der Glioblastom-Modelle ist die Migration von Tumorzellen entlang bestimmter Strukturen im Gehirn, wie z.B. entlang von Nerven. Während der larvalen Entwicklung von *Drosophila* kommt es zu der Migration von Gliazellen entlang des sogenannten optischen Stiels in die Augenimaginalscheibe (Silies, Yuva-Aydemir et al. 2010). Die Überexpression von EGFR oder Pvr (*PDGF-and VEGF receptor related*) hat eine abnorm verstärkte Migration dieser Gliazellen zur Folge (Read, Cavenee et al. 2009; Witte, Jeibmann et al. 2009; Read 2011).

Wie bereits weiter oben beschrieben (Kapitel 1.2, S. 8) spielt die häufig zu findende Amplifikation oder Überexpression des PDGFR eine Rolle bei der Entstehung von Glioblastomen und wirkt sich negativ auf die Prognose aus. Das hier verwendete *Drosophila*-Modell dient zur Identifizierung von Genen die eine Rolle bei der Pvr vermittelten Migration von Gliazellen spielen. Es beruht auf Fliegen, die gliaspezifisch eine konstitutiv aktive Form des Pvr (λ Pvr), des Fliegenhomologs der humanen Wachstumsfaktor-Rezeptor-Gene für PDGFR α , PDGFR β und VEGFR 1-3 exprimieren. Diese Tiere zeigen aufgrund der abnorm gesteigerten Migration der Gliazellen, einen veränderten Phänotyp der optischen Loben und der peripheren Nerven. Ihre Vitalität ist gegenüber dem Wildtyp stark eingeschränkt. Die Larven überleben bei 25 °C nur bis zum dritten Larvenstadium (L3) (Kim et al., persönliche Kommunikation).

Die oben beschriebenen Fliegen wurden durch Kreuzung eines Teststamms (UAS- λ Pvr / UAS- λ Pvr; repo-Gal4 UAS-CD8GFP / TM6 tub-Gal80) mit Wildtyp Fliegen erzeugt. Innerhalb des Teststamms wird die Gal4 vermittelte Expression von λ Pvr, einer konstitutiv aktiven Form des Pvr, durch gleichzeitige Expression von Gal80 inhibiert. Bei der Kreuzung mit Wildtyp Fliegen geht in den Nachkommen die Gal80 Expression auf genetischer Ebene verloren und es kommt zur Expression von Pvr in Gliazellen. Dies wird durch die Verwendung des gliaspezifischen Promotors repo gewährleistet (Kim et al., persönliche Kommunikation).

In einem umfangreichen genetischen Interaktionsscreen wurden über 2000 RNAi-Konstrukte mit diesem Teststamm gekreuzt. Das Einkreuzen einiger dieser

RNAi-Konstrukte führte zur Verschiebung der Letalität in spätere Stadien der lavalen Entwicklung und zur partiellen Rettung des glialen Phänotyps (Kim et al., persönliche Kommunikation). Zwei der so identifizierten Gene sind *Drosophila melanogaster* Lysyloxidase-like 1 (*DmLOXL1*) und *Tetraspanin 2A* (*TSP2A*). Mittels der BLAST-Software des *National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurde nach humanen Homologen gesucht. Das humane Homolog von *DmLOXL1* ist Lysyloxidase-like 4. Im Falle von *TSP2A* wurde innerhalb der Familie der humanen Tetraspanine CD9 als Kandidatengen identifiziert.

1.6 Kandidaten

1.6.1 Lysyloxidase und Lysyloxidase-like 4

Die Familie der Lysyloxidasen besteht aus fünf Mitgliedern, der Lysyloxidase (LOX), Lysyloxidase-like 1 (LOXL1), Lysyloxidase-like 2 (LOXL2), Lysyloxidase-like 3 (LOXL3) und Lysyloxidase-like 4 (LOXL4) (Trackman, Pratt et al. 1990; Kenyon, Modi et al. 1993; Saito, Papaconstantinou et al. 1997; Mäki und Kivirikko 2001; Mäki, Tikkanen et al. 2001). Lysyloxidasen sind Kupfer-abhängige Aminoxidasen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Formation der ECM durch *crosslinking* von Kollagenen und Elastin (Kagan und Trackman 1991). LOX wird sezerniert und oxidiert spezifisch die Lysin-Reste von Kollagen und Elastin. Die dadurch entstehenden Aldehyd-Reste können nun entweder mit Peptidyl-Aldehyden oder mit ϵ -Aminogruppen der Peptidyl-Lysine interagieren und kovalente Bindungen eingehen. Dadurch werden aus den löslichen Vorstufen der ECM-Proteine die unlöslichen Kollagen- und Elastinfibrillen der ECM (Smith-Mungo und Kagan 1998; Kagan und Li 2003; Thomassin, Werneck et al. 2005). Die durch LOX vermittelten Modifikationen der ECM resultieren in erhöhter Festigkeit und Dehnbarkeit (Erler und Weaver 2009; Levental, Yu et al. 2009).

Die Aufgaben der Lysyloxidasen sind jedoch weitaus vielfältiger. Sie spielen unter anderem auch eine Rolle bei der embryonalen Entwicklung, Zellproliferation, intrazellulären Signalantworten und Migration (Payne, Hendrix et al. 2007; Grimsby, Lucero et al. 2010). Lysyloxidasen können aber auch bei Tumorerkrankungen zu einer Verschlechterung der Prognose und der Bildung

von Metastasen beitragen (Kirschmann, Seftor et al. 2002; Eler, Bennewith et al. 2006; Görögh, Weise et al. 2007; Sakai, Kato et al. 2009).

Die C-terminalen Regionen der fünf LOX-Proteine weisen sehr viele Homologien auf und lassen daher vermuten, dass alle Familienmitglieder an ähnlichen enzymatischen Funktionen beteiligt sind. Diese C-terminale Region besteht aus einer Kupferbindungs-Domäne, dem Lysyl, Tyrosyl, Chinon (LTQ) Kofaktor und zehn Cystein-Resten (Wang, Mure et al. 1996; Thomassin, Werneck et al. 2005). Die N-terminalen Regionen hingegen unterscheiden sich sehr deutlich voneinander. So kann aufgrund der An- bzw. Abwesenheit von *scavenger receptor cysteinerich* (SRCR) Domänen zwischen zwei Subfamilien unterschieden werden. LOXL2, 3 und 4 bilden gemeinsam einer Subfamilie. Sie besitzen vier *scavenger receptor cysteinerich* (SRCR) Domänen und liegen daher wahrscheinlich als stabil gefaltete Proteine vor (Mäki, Tikkanen et al. 2001). Im Gegensatz dazu fehlen diese SRCR-Domänen bei LOX und LOXL1 komplett (Abbildung 1.6.1.1). Diese beiden Proteine werden als inaktive Vorstufen sezerniert und müssen noch durch proteolytische Spaltung aktiviert werden (Csiszar 2001; Kagan und Li 2003). SRCR-Domänen sind im Stande die Liganden Bindung einiger sezernierter Proteine und Membranrezeptoren zu vermitteln. Dies könnte auf eine ganz neue Funktion dieser LOXL-Unterfamilie hinweisen (Sasaki, Brakebusch et al. 1998; Hohenester, Sasaki et al. 1999; Kim, Kim et al. 2003). LOX, LOXL1, LOXL3 und LOXL4 können durch die Zugabe von β -Aminopropionitril (BAPN) inhibiert werden (Waddell, Wilk et al. 1974; Martin, Sosa-Melgarejo et al. 1991; Smith-Mungo und Kagan 1998; Payne, Hendrix et al. 2007).

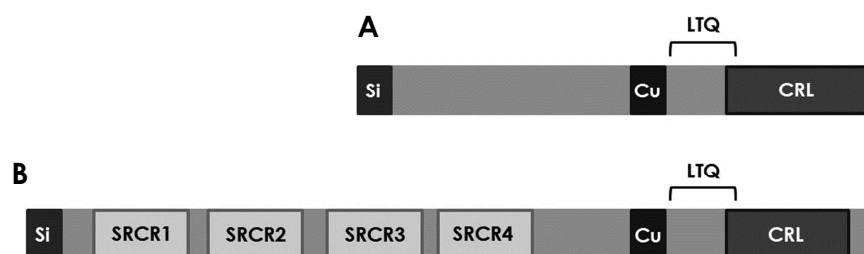


Abbildung 1.6.1.1: Schematische Darstellung von **A** LOX und **B** LOXL4. Si: Signalpeptid, Cu: Kupfer-Bindungs-Domäne, LTQ: LTQ (Lysyl, Tyrosyl, Chinon) Kofaktor-Bindungsstelle, CRL: *cytokine receptor-like domain*, SRCR: *scavenger-receptor cysteine-rich domains*. Abbildung nach (Payne, Hendrix et al. 2007).

1.6.2 CD9

Cluster of differentiation 9 (CD9) ist ein 22-27 kDa großes Transmembranprotein und gehört zur Familie der Tetraspanine (Boucheix und Benoit 1988; Hemler 2008). Diese umfasst bis jetzt 33 bekannte Proteine, darunter CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82 und CD151 (Maecker, Todd et al. 1997; Berditchevski 2001; Hemler 2003; Hemler 2008; Murayama, Shinomura et al. 2008).

Alle Tetraspanine sind Oberflächenproteine mit vier Transmembrandomänen. Sie besitzen einen kleinen intrazellulären Loop zwischen den Transmembrandomänen 2 und 3 (TM2 und TM3), einen kleinen extrazellulären Loop (ECL1) zwischen TM1 und TM2 und einen großen extrazellulären Loop (ECL2) zwischen TM3 und TM4 (Zöller 2009)n (Abbildung 1.6.2.1).

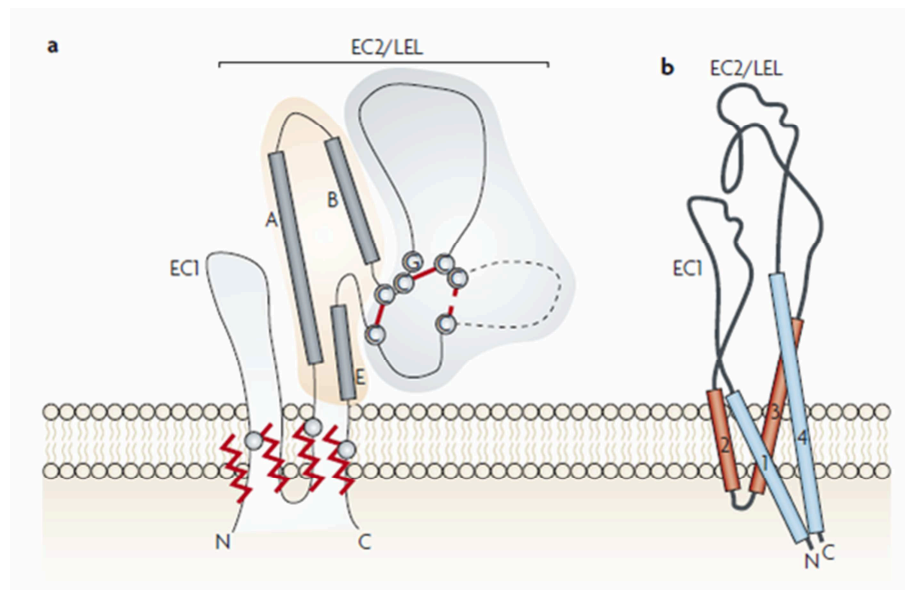


Abbildung 1.6.2.1: a) Schematische Darstellung eines Tetraspanins. Membrannähe Palmitoylierungen (rot), hydrophile Reste in den Transmembranbereichen (graue Kugeln), kleiner extrazellulärer Loop (ECL1) und großer extrazellulärer Loop (ECL2). ECL2 kann in eine konstante Region mit den alpha Helices A, B und E, und in eine variable Region mit ihrem CCG-Motiv und den konservierten Disulfidbrücken unterteilt werden (rot). Der gestrichelte Bereich zeigt einen weiteren Teil des ECL2, der in manchen Tetraspaninen durch eine weitere Disulfidbrücke entsteht. **b)** Zeigt die eigentlich vorliegende, sehr enge räumliche Anordnung der vier Transmembrandomänen. Abbildung nach (Hemler 2008).

Tetraspanine bilden sogenannten *tetraspanin enriched microdomains* (TEMs). Dies sind Komplexe aus unterschiedlichen Tetraspaninen und einer Vielzahl anderer Proteine, zu denen unter anderem einige Integrine (Berditshevski 2001) und Wachstumsfaktor-Rezeptoren gehören (Sridhar und Miranti 2006; Murayama, Shinomura et al. 2008). Aufgrund dieser vielseitigen Protein-Protein Interaktionen, spielen Tetraspanine eine wichtige Rolle als Interaktionsvermittler auf der Zelloberfläche (Boucheix und Rubinstein 2001).

CD9 wird, in unterschiedlicher Stärke, in fast allen menschlichen Geweben exprimiert (Sincock, Mayrhofer et al. 1997; Yubero, Jimenez-Marin et al. 2010). Im Gehirn ist CD9 hauptsächlich im Marklager zu finden. CD9 ist dort vor allem in Teilen des Rückenmarks, im Hirnstamm und in der weißen Substanz des Kleinhirns lokalisiert (Nakamura, Iwamoto et al. 1996). In humanen Gehirnen mit einer *Transmissible Spongiforme Enzephalopathie* (TSE) Infektion wurde eine Steigerung der CD9-Expression in Astrozyten beobachtet. Diese Astrozyten zeigten eine erhöhte Proliferation und Migration (Doh-ura, Mekada et al. 2000).

CD9 spielt eine sehr kontroverse Rolle in der Entwicklung und Migration von Tumoren. Auf der einen Seite führt eine gesteigerte Expression von CD9 in einigen Tumoren zu weniger Metastasen Bildung und einer Verlängerung der Lebensdauer (Hashida, Takabayashi et al. 2003; Mhawech, Herrmann et al. 2003; Mhawech, Dulguerov et al. 2004; Murayama, Shinomura et al. 2008; Woegerbauer, Thurnher et al. 2010), auf der anderen Seite korreliert die CD9-Expression mit der Malignität von astrozytären Tumoren (Kawashima, Doh-ura et al. 2002; Soyuer, Soyuer et al. 2010). In einigen Zelllinien wurde beobachtet, dass eine erhöhte CD9-Expression die Migration und Invasion fördert (Fan, Zhu et al. 2010), bzw. ein CD9-Knockdown zu verringerter Invasion führt (Lafleur, Xu et al. 2009).

Diese unterschiedlichen Rollen von CD9 hängen vermutlich mit der Zusammensetzung der TEMs und der assoziierten Proteine zusammen (Zöller 2009). Diese Vermutung wird durch die Tatsache bekräftigt, dass es während der Zelldifferenzierung bzw. der Entwicklung einer malignen Veränderung auch zu Veränderungen in der Zusammensetzung der TEMs kommt (Le Naour, Andre et al. 2006; Yang, Kovalenko et al. 2006).

Es ist bekannt, dass CD9 mit dem epidermalem Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) (Murayama, Shinomura et al. 2008), mit TGF α (Imhof, Gasper et al. 2008) und mit dem heparin-binding EGF-like Wachstumsfaktor (HB-EGF) (Higashiyama, Iwamoto et al. 1995) interagiert.

1.7 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen humane Homologe der auf Grundlage des Drosophila-Modells identifizierten Kandidatengene auf ihre Expression in Biopsaten von Glioblastomen und in humanen Glioblastomzelllinien überprüft werden. Hierzu sollen RTqPCRs und immunhistochemische Färbungen durchgeführt werden. Anschließend sollen siRNA Knock-downs für beide die charakterisierten Gene in mehreren humanen Glioblastomzelllinien etabliert werden. Der Knock-down soll dabei durch RTqPCRs überprüft werden und eine negative Wirkung auf das Überleben der Zellen und die Proliferation mittels MTT-Assay ausgeschlossen werden.

Nach Etablierung des Knock-downs sollen funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden, um die Rolle der identifizierten Proteine bei der Migration von Glioblastomzellen zu studieren. Zu diesem Zweck sollen *in vitro* Migrations-Assays zur Anwendung kommen. Durch zusätzliche Stimulation mit PDGF-BB soll ein eventueller Zusammenhang der gefundenen Proteine mit der Aktivierung der PDGF-Rezeptoren beobachtet werden.

Bei Vorhandensein eines Inhibitors für das untersuchte Protein soll dessen Einfluss auf die Migration der Glioblastomzellen *in vitro* und *in vivo* überprüft werden. Hierzu soll, neben Migrations-Assays, eine Glioblastomzelllinie aus der Ratte in NMRI nu/nu Mäusen implantiert werden (Xenotransplantation) und die Wirkung des Inhibitors auf das Migrationsverhalten der Zellen bestimmt werden.

2. Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Kultivierung von etablierten Zelllinien

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen und unter Verwendung steriler Medien und Materialien durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen fand in Standard-Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 5% CO₂ und 37 °C statt. Die verwendeten A172 und U343 MG Zellen wurden in DMEM, high Glucose 4,5 g/l + L-Glutamin mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (Standardmedium) kultiviert. Für die Kultivierung der C6SPGFP wurde zusätzlich 1mg/ml G418 hinzugegeben. Die Zellen wurden, je nach Wachstum, alle 2-5 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen erst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA behandelt.

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese pelletiert, in frischem Standardmedium aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurden je 900 µl der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen gegeben und 100 µl DMSO (99,5%) hinzugefügt. Die Röhrchen wurden mehrere Male invertiert und bei -80 °C eingefroren.

2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit zwei unterschiedlichen Methoden. Zur Vorbereitung der Zellen zur Implantation in Mäuse wurden die Zellen mittels einer Neubauerzählkammer gezählt. Für alle anderen Versuche wurde der CASY® 1 DT verwendet.

Zur Bestimmung der Zellzahl mittels der Neubauerkammer wurden 10 µl einer verdünnten Zellsuspension zwischen Kammer und Glasplatte gesaugt und vier Großquadrate ausgezählt. Aus der Zellzahl der vier gezählten Quadrate wurde der Mittelwert gebildet. Durch Einsetzen in unten stehende Formel konnte die Zellzahl/ml berechnet werden.

$$\text{Mittelwert der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellen/ml}$$

Bei der Bestimmung der Zellzahl mittels CASY® 1 DT wurden 10 µl der Zellsuspension in 10 ml C CASYton-Lösung verdünnt. Das Gerät zählt automatisch alle Partikel zwischen 9,9 und 30,0 µm Größe und berechnet daraus die Zellzahl der Ausgangssuspension pro ml. Die Einschränkung der Partikelgröße von 9,9 bis 30,0 µm dient dazu, die Zählung von toten Zellen bzw. Zellfragmenten zu vermeiden.

2.1.3 siRNA Transfektion (Transiente Transfektion)

Die Transfektion von siRNA wurden nach dem Fast-Forward Protokoll von Qiagen in 24 well Platten durchgeführt. Es wurden 6×10^4 (A172) bzw. 9×10^4 Zellen (U343 MG) pro Vertiefung in Standardmedium ausgesät und bis zur Transfektion bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Für die transiente Transfektion der Zellen wurden pro well 5-7,5 ng siRNA und 1-1,5 µl HiPerFect Transfektionsreagenz in 100 µl Serum freien Medium verdünnt (siehe Tabelle 2.1.3.1), kurz gemischt und zur Ausbildung der Transfektionskomplexe 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 100 µl des Transfektionsansatz pro well langsam auf die Zellen getropft. Anschließend wurden die Zellen mindestens 24 h bei 5% CO₂ und 37 °C inkubiert.

Tabelle 2.1.3.1: Zusammensetzung der Transfektionsansätze für die unterschiedlichen Zelllinien und siRNAs in 24 well Platten

	siRNA	siRNA/well	HiPerFect/well	DMEM(serumfrei)
A172	Hs_LOXL4_1Hp siRNA Hs_LOXL4_4Hp siRNA	7,5 ng	1,5 µl	100 µl
A172	Hs_CD9_1 FlexiTube siRNA Hs_CD9_7 FlexiTube siRNA	5 ng	1 µl	100 µl
U343 MG	Hs_LOXL4_1Hp siRNA Hs_LOXL4_4Hp siRNA	7,5 ng	1,5 µl	100 µl
U343 MG	Hs_CD9_1 FlexiTube siRNA Hs_CD9_7 FlexiTube siRNA	7,5 ng	1,5 µl	100 µl
Die siRNA zur Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden in den unterschiedlichen Versuchen jeweils so eingesetzt wie die zu untersuchende siRNA.				

2.1.4 Bestimmung der relativen Stoffwechselaktivität (MTT-Assay)

Mit Hilfe des MTT-Assays wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen bestimmt, um dadurch Rückschlüsse auf ihre Vitalität und Proliferation zu ziehen. Die Funktionsweise dieses Assay beruht auf der Aufnahme und des Umbaus von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu Formazan. Das dafür benötigte NAD(P)H stammt aus der Glycolyse. Nach Lysieren der Zellen befindet sich das blau-lilafarbene Formazan im Überstand und kann spektroskopisch quantifiziert werden. Die Menge an Formazan korreliert direkt mit der metabolischen Aktivität der Zellen, da nur lebende Zellen das für die Umsetzung notwendige NAD(P)H produzieren.

Die Zellen wurden 20 h nach der Transfektion in 24 well Platten pelletiert und mittels CASY® 1 DT ausgezählt. Anschließend wurden je 1×10^4 Zellen in 100 μ l Standardmedium pro well in eine 96 well Platte ausgesät. Zur Normierung wurde bei jedem Versuch 4 h nach dem Aussäen der 0 h Wert bestimmt. Das Medium wurde vorsichtig abgenommen und durch 200 μ l 0,5 mg/ml MTT in Standardmedium ersetzt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurde die MTT-Lösung vorsichtig abgenommen und die Zellen mittels 200 μ l 2-Propanol aufgeschlossen. Nach kurzem Schwenken der Platten wurden diese im ELISA-Reader bei $\lambda = 570$ nm gemessen. Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen. Nach der Normierung auf den 0 h Wert wurden die Proben noch auf die jeweilige Kontrolle normiert und mittels EXCEL (Windows XP und 2010) statistisch ausgewertet.

2.1.5 Wundheilungsassay (Scratch Assay)

Um Unterschiede im Migrationsverhalten verschieden behandelter Zellen zu analysieren, wurde ein Wundheilungsassay verwendet. Mittels dieses Assays ist es möglich bis zu 72 h das Migrationsverhalten von Zellen zu beobachten. Die Dokumentation erfolgt dabei durch mehrmaliges Fotografieren einer definierten Stelle im Zellrasen alle 24 h (Rodriguez, Wu et al. 2005).

Die Zellen wurden wie oben für die siRNA-Transfektion beschrieben ausgesät und transfiziert. Pro Bedingung wurden vier Vertiefungen einer 24 well Platte transfiziert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurde der konfluente

Zellrasen mit Hilfe der breiten Seite einer sterilen 100µl Pipettenspitze verwundet und die Zellen mit PBS gewaschen. Bevor frisches Medium auf die Zellen gegeben wurde, wurde mit einem dicken Filzstift eine Markierung auf dem Boden jedes wells gesetzt. Die Markierung wurde so gewählt, dass sie sich am Rand des Zellrasens in der Mitte der Wunde befand. Die entstandene längliche Wunde wurde nun als 0 h Wert dokumentiert. Dabei war darauf zu achten die Markierung am Bildrand mit zu fotografieren. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass zum 24 h, 48 h und 72 h Zeitpunkt exakt der gleiche Bereich der Wunde dokumentiert wurde. Die Auswertung der in die Wunde einwandernden Zellen wurde mittels analySIS FIVE Software von Olympus, bzw. mit der TScratch Software (Eidgenössische Technische Hochschule Zürich) durchgeführt. Durch das Ermitteln der freien Fläche zu den unterschiedlichen Zeitpunkten konnte anhand des 0 h Werts die relative Migration der Zellen in Bezug auf eine Kontrolle ermittelt werden.

2.1.6 Monolayer Migrations-Assay

Das Monolayer Migrations Assay beruht auf der Methode nach Giese (Giese, Rief et al. 1994). Die Zellen werden mittels eines Zylinders als kreisförmige Kolonie ausgesät und die Auswertung erfolgt über den Zuwachs der zellbewachsene Fläche.

Es wurden mit Matrigel (20 µg/well) beschichtete 8 well Nunc® Lab-Tek™ Chamber Slides verwendet. Die wells wurden mit 200 µl des jeweiligen Mediums gefüllt (Standardmedium ohne BAPN, mit 100 µM, mit 1 mM und mit 5 mM BAPN). Anschließend wurden Glaszylinder mit einem Innendurchmesser von 1,2 mm durch Eintunken mit dem passenden Medium gefüllt. Dabei war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen in den Zylindern bildeten. Die gefüllten Zylinder wurden nun in die wells gestellt und mittels einer Hamilton Pipette mit 2×10^3 Zellen in einem µl Medium befüllt. Nach 16 h bei 5% CO₂ und 37 °C befinden sich die Zellen auf dem Boden der wells und sind adhärent. Nach dem Entfernen der Zylinder wurde das Medium durch frisches Medium (mit und ohne BAPN) ersetzt und die kreisförmige Zellkolonie fotografiert (0 h Wert). Dies wurde nach 24 h, 48 h und 72 h wiederholt. Teilweise war es nötig vier Teilbilder eines wells zu fotografieren, da die Zellkolonie sehr groß war. Diese Bilder

wurden mit Photoshop zu einem Gesamtbild zusammengesetzt, die mittels der analysis FIVE Software von Olympus ausgewertet wurden.

2.2 Isolierung und Amplifikation von Nukleinsäuren

2.2.1 RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen und aus gefrorenem Gewebe wurde das Gene Elute Mammalian total RNA Miniprep Kit von Sigma-Aldrich verwendet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, pelletiert und anschließend in Lysepuffer mit 1% (v/v) β -Mercaptoethanol lysiert. Das Gewebe wurde im Lysepuffer zusätzlich noch mit einem Pistill homogenisiert. Alle weiteren Schritte wurden den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt.

2.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem Nanophotometer und der LabelGuard-Küvette von Implen.

2.2.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Um eine qRT-PCR durchführen zu können, war eine Umwandlung der isolierten RNA in cDNA nötig. Dazu wurde eine reverse Transkription mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems durchgeführt.

Es wurden jeweils 500 ng RNA mit 10 μ l DEPC-H₂O verdünnt. Zusätzlich zu den im Kit enthaltenen Puffern wurde dem Mastermix pro Reaktion 5 Units RNase Inhibitor (Applied Biosystems) zugegeben. Die Zusammensetzung des Mastermix und das Programm des Thermocyclers entsprachen den Angaben des Herstellers. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.4 Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Für die Bestimmung der relativen Expression von Zielgenen wurde die Methode der quantitativen Realtime-PCR genutzt. Die Berechnung der relativen Expressionslevel erfolgte mittels der $\Delta\Delta C_t$ Methode (Livak und Schmittgen 2001). Das dazu benötigte Referenzgen (Housekeeping-Gen) war für alle untersuchten humanen Gene und Ratten Gene *gapdh*. Die dafür verwendeten Primer und Sonden wurden über Eurofins MWG bezogen (Sequenzen siehe Kapitel 6.10 Material). Die restlichen verwendeten Primer und Sonden wurden als TaqMan Gene Expression Assays bei Applied Biosystems bestellt.

Tabelle 2.2.4.1: Reaktionsansatz für die qRT-PCR

GAPDH-Ansatz		TaqMan Assay-Ansatz	
cDNA	1 μ l	cDNA	1 μ l
TaqMan Universal PCR Master Mix	10,42 μ l	TaqMan Universal PCR Master Mix	10 μ l
		TaqMan Gene Expression Assays	1 μ l
Primer forward (10pmol/ μ l)	0,83 μ l		
Primer reverse (10pmol/ μ l)	0,83 μ l		
Sonde (10pmol/ μ l)	0,83 μ l		
DEPC-H ₂ O	ad. 20 μ l	DEPC-H ₂ O	ad. 20 μ l

Tabelle 2.2.4.2: Standardprogramm für die qRT-PCR

2 min	50 °C	} 40 Zyklen
10 min	95 °C	
15 s	95 °C	
1 min	60 °C	

2.3 Nachweis von Proteinen

2.3.1 Proteinbestimmung mittels LOWRY

Nach der Lyse der Zellen in RIPA Puffer (mit Protease-Inhibitor und PMSF) erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951). Hierzu wurde das BioRad DC Protein Assay verwendet. Die Konzentrationsbestimmung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.2 Western Blot

Auftrennung der Proteine

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Diese Methode beruht auf den größenabhängigen Unterschieden in der Laufgeschwindigkeit der Proteine. Der dem Proteinlysate beigemischte Lammeli-Auftragspuffer enthält Natrium-Dodecylsulfat (SDS) und sorgt dadurch für eine gleichmäßige negative Ladung der unterschiedlichen Proteine.

Die SDS-Page erfolgte mittels des Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System von BioRad und einem zwei geteilten Polyacrylamid SDS-Gels. Der untere Teil des Gels bestand aus einem basischen Trenngel (pH 8,8), der obere Teil aus einem Sammelgel mit niedrigerem pH-Wert (pH 6,8). Im Sammelgel erfolgte eine Verdichtung der Proteine, durch die es im anschließenden Trenngel zu einer gleichmäßigen Auftrennung der Proteine kommt. Für die Detektion von CD9 wurde ein Trenngel mit 12% Acrylamid verwendet für die Detektion von PDGFR α und β ein Trenngel mit 7,5% Acrylamid. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden die unterschiedlichen Proben mittels Verdünnung in Lysepuffer auf die gleiche Proteinkonzentration gebracht und mit 5 x Lammeli-Auftragspuffer versetzt. Nach 5 min Denaturierung bei 95 °C wurden die Proben 4 min bei 2000 rpm zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V.

Tabelle 2.3.2.1: Zusammensetzung der Polyacrylamid SDS-Gele

	Sammelgel 5%	Trenngel 7,5%	Trenngel 10%
Acrylamid	415 μ l	1,75 ml	2,33 ml
Lower Tris	—	1,75 ml	1,75 ml
Upper Tris	625 μ l	—	—
H₂O	1,4 ml	3,5 ml	2,9 ml
10% APS	20 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	10 μ l	10 μ l

Transfer der Proteine auf die Membran

Zum Transfer der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurde die Tank-Blot-Methode verwendet (Towbin, Staehelin et al. 1992). Die Proteine wurden auf eine in Methanol aktivierte PVDF Membran übertragen. Die Membran und das SDS-Gel wurden zwischen zwei Filterpapiere und Schwämme gelegt und in die Mini Trans-Blot Cell-Apparatur (BioRad) eingespannt. Die Apparatur wurde mit Blotpuffer gefüllt und auf 4 °C gekühlt. Durch die angelegte Spannung von 100 V und die Stromstärke von 0,25 A wandern die negativ geladenen Proteine zur Kathode und werden somit vom Gel auf die Membran übertragen. Aufgrund der geringen Größe des Proteins (CD9, 22-27 kDa) wurde 45 min geblottet um die Proteine auf die Membran zu übertragen. Die anschließende reversible Ponceau S-Färbung diente auf der einen Seite zur Anfärbung der auf die Membran transferierten Proteine um den Erfolg des Blotens zu überprüfen, zusätzlich wurden die Proteine durch die im Ponceau S-Puffer enthaltene Trichloressigsäure auf der Membran fixiert.

Immundetektion

Je nach Antikörper wurden verschiedene Puffer zum Blocken und Waschen der Membranen verwendet (Tabelle 2.3.2.2). Je nach verwendeten Sekundärantikörper weist das verwendete Protokoll Unterschiede auf. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter Schwenken auf einem Schüttler.

Nach dem Entfärben der Ponceau S-Färbung in Waschpuffer wurden die Membranen zum Absättigen unspezifischer Bindungen 30 min bei 20 °C inkubiert. Direkt im Anschluss wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C in der Primärantikörper-Blockierungspuffer-Verdünnung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membranen für 10 min in Waschpuffer bei 20 °C erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase- bzw. Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper in Blockierungspuffer für 1 h bei 20 °C. Anschließend wurden die Membranen erneut drei Mal 10 min mit Waschpuffer gewaschen.

Die mit Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörper behandelten Membranen wurden bei 20 °C für drei Minuten mit Luminata Forte Western HRP Substrat von Millipore inkubiert. Dabei kommt es zur Umsetzung des zur Verfügung gestellten Substrats durch die am Sekundärantikörper gebundene Peroxidase und es entsteht ein im blauen Bereich des Lichtspektrums emitierendes Intermediat. Die so entstandene Lichtstrahlung wurde mittels Röntgenfilm detektiert.

Bei der mit einem Biotin-gekoppeltem Sekundärantikörper behandelten Membran erfolgte noch ein weiterer Inkubationsschritt. Dazu wurde ExtrAvidin Peroxidase (1:8000) in PBS verdünnt und 30 min bei 20 °C auf der Membran inkubiert. Die ExtrAvidin Peroxidase bindet mit ihrem Streptavidinteil an das Biotin. Da mehrere ExtrAvidin Peroxidasen an ein Biotin binden können, kommt es zu einer Verstärkung des durch die Peroxidasen erzeugten Signals. Anschließend wurde die Membran erneut drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Die Detektion erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei dem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper. Als Substrat wurde hier das UptiLight HRP Blot Substrat von Uptima verwendet. Pro Membran wurde 1 ml Luminol-Reagenz mit einem Tropfen Oxidationsmittel versetzt und 1 min bei 20 °C auf der Membran inkubiert. Die Detektion erfolgte auch hier mittels Röntgenfilm.

Tabelle 2.3.2.2: Kombinationen der unterschiedlichen Antikörper und Puffer

Primärantikörper	CD9 (EPR2949) 1:2000	β-Aktin 1:15000
Membran	PVDF Membran	PVDF Membran
Waschpuffer	1 x TST	1 x TST
Blockierungspuffer	2,5%	2,5%
Sekundärantikörper	Biotin gekoppelt	Peroxidase gekoppelt
ExtrAvidin Peroxidase	1:8000 in PBS	—
UptiLight HRP Blot Substrat	ja	ja

2.3.3 Immunhistologie und Immuncytochemie an Paraffinmaterial

Aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebe bzw. den eingebetteten Zellen wurden mit einem Mikrotom 3 µm-Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Vor der Färbung wurden die Schnitte in einer Xylol-Ethanol-Reihe entparaffiniert (siehe Tabelle 2.3.3.1). Nach einer antikörperspezifischen Vorbehandlung im Garkocher (z.B. pH 6,1) wurden die Schnitte im Autostainer (Autostainer Link 48, DaKo) gefärbt. Die bei dieser Methode verwendeten Sekundärantikörper führen, bei Nachweis des betreffenden Epitops durch den Primärantikörper, durch Oxidation von 3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochlorid (DAB) zu einer braunen Färbung der Schnitte. Die Zellkerne wurden durch 3 min Inkubation in Hämatoxilin gefärbt und anschließend 5 min in Leitungswasser gewässert. Das Eindecken der Objektträger erfolgte mit Eukitt.

2.3.4 Immunfluoreszenz

Die zu färbenden Zellen wurden in 24 well Platten auf runden Glas-Deckgläschen (ø 12mm) ausgesät und mit Standardmedium bei 5% CO₂ und 37 °C inkubiert bis die Oberseite des Deckgläschen mit einem konfluenten Zellrasen bewachsen war. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und mit 3,7%igen Formaldehyd 10 min bei 20 °C fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut drei Mal mit PBS gewaschen. (Wenn nicht anders beschrieben, besteht jeder Waschschrift aus drei maligem Waschen mit PBS für jeweils fünf Minuten). Nach fünf minütigem Permeabilisieren mit 0,1% Triton X-100 in PBS wurden die Zellen nochmals gewaschen und 30 min bei 20 °C mit 10% Ziegenerum/PBS inkubiert. Dieser Schritt diente dem Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen. Die Deckgläschen wurden nun mit ebenfalls in 10% Ziegenerum/PBS verdünnten Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen erneut gewaschen und für 1 h bei 20 °C mit dem in 10% Ziegenerum/PBS verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Da dieser an ein Fluoreszenzmolekül gekoppelt ist, wurden ab diesem Zeitpunkt alle weiteren Schritte lichtgeschützt durchgeführt. Nach dem Entfernen des überschüssigen Sekundärantikörpers durch Waschen wurden die Zellen zur Anfärbung des Zellkerns für 1 min bei 20 °C mit Hoechst-Farbstoff (1 µg/ml in Aqua bidest) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Aqua bidest gewaschen und die Deckgläschen mit Fluoromount-Eindeckmedium (DaKo) eingedeckt. Zum Abschluss wurden die Deckgläschen noch mit klarem Nagellack versiegelt, um ein Austrocknen des Eindeckmediums und Blasenbildung zu verhindern.

2.4 Xenotransplantations-Modell in der Maus

2.4.1 Verwendete Zellen

Für die Implantation wurden C6-SP-GFP Zellen verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine Rattenglioblastomzelllinie, die stabil mit einem GFP-exprimierenden Plasmid transfiziert wurde (Tatenhorst, Püttmann et al. 2005).

Die Zellen wurden bei 5% CO₂ und 37°C mit 100 mg/ml G418 in Standardmedium kultiviert.

Am Morgen der Implantation wurden die Zellen pelletiert, mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend in PBS aufgenommen (2×10^4 / μ l). Pro Maus wurden 4×10^4 Zellen implantiert.

2.4.2 Implantation der Tumorzellen

Die Implantation der Zellen erfolgte mit Hilfe eines stereotaktischen Rahmens (Narashige, Tokyo, Japan) (Senner, Sturm et al. 2000).

Die für diesen Versuch verwendeten neun Wochen alten NMRI nu/nu Mäuse zeichnen sich durch das Fehlen des Thymus und der Körperbehaarung aus. Verglichen mit gewöhnlichen NMRI Mäusen zeigen NMRI nu/nu Mäuse eine verringerte Zahl an T-Zellen und eine leicht erhöhte Zahl an Natürlichen Killerzellen.

Die Mäuse wurden mit einer Injektionsnarkose betäubt und in den stereotaktischen Rahmen eingespannt. Nach dem Hautschnitt wurde die Position der Injektion bestimmt und mit einer Kanüle, durch vorsichtiges Drehen, eine Öffnung in die Schädeldecke gebohrt. Die Injektion erfolgte 4 mm anterior der Interaurallinie, 2,5 mm lateral der Mittellinie in einer Tiefe von 3,5 mm mit einer Hamilton Spritze (0,15 mm Innendurchmesser der Spitze, 0,72 mm Außendurchmesser). Es wurden je Maus 4×10^4 Zellen in 2 μ l PBS implantiert. Die Hamilton Pipette wurde 3 min nach der Injektion langsam aus dem Gewebe gezogen um das Zurückfließen der Zellsuspension zu minimieren. Anschließend wurde das Loch in der Schädeldecke mit Knochenwachs verschlossen und der

Hautschnitt mit zwei Stichen genäht. Während der Aufwachphase wurden die Mäuse mit einer Infrarotlampe gewärmt.

2.4.3 BAPN-Behandlung

Die Mäuse wurden einen Tag vor der Implantation der Zellen in zwei Gruppen aufgeteilt. Während der einen Gruppe ab diesem Zeitpunkt täglich 100 mg/kg BAPN intraperitoneal injiziert wurde, bekam die andere Gruppe PBS injiziert und diente somit als Kontrollgruppe.

2.4.4 MRT

Das Tumorwachstum wurde an Tag 10 und 15 nach der Implantation mittels MRT (3 Telsa Philips Achieva System) dokumentiert. Als Kontrastmittel wurde den Mäusen 0,5 mmol/kg Körpergewicht Magnevist verabreicht.

Zur anschließenden Bestimmung des Tumolvolumens wurde die Amira Software verwendet.

2.4.5 Entnahme und Fixierung der Gehirne

Nach Versuchsende wurden die Mäuse in Narkose getötet. Die Gehirne wurden herauspräpariert und für mindestens 24 h in Formaldehyd 3,7% fixiert. Anschließend wurden die Gehirne in Einbettungskassetten überführt, gewässert und für 24 h in 70%igen Ethanol äquilibriert. Nach der Entwässerung des Gewebes im Einbettautomaten Tissue Tek VIP, wurden die Gehirne in Paraffinblöcke gegossen. Zur weiteren Untersuchung wurden 5-6 µm dicke Hirschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht.

2.5 Nachweis von Protein-Interaktionen

2.5.1 PLA (*proximity ligation assay*)

Zur Bestimmung einer Koloalisation von Proteinen und somit einer potentiellen Protein-Interaktion wurde der *proximity ligation assay* (PLA) verwendet (Abbildung 2.5.1.1). Diese Methode beruht auf der Detektion zweier Proteine mittels Primärantikörpern aus unterschiedlichen Spezies (in diesem Fall Maus und Kaninchen). Die dazu passenden Sekundärantikörper sind nicht Fluoreszenz markiert, stattdessen besitzen sie einen kurzen DNA-Einzelstrang. Liegen die beiden Sekundärantikörper in räumlicher Nähe zueinander (2-40 nm), so entsteht durch die Zugabe von circle-forming DNA Oligonukleotiden und einer Ligase ein geschlossener DNA-Ring. Dieser wird anschließend mittels rolling circle Mechanismus amplifiziert. Das Signal entsteht durch die Zugabe eines mit einem Fluorophor gekoppelten komplementären Oligonukleotids, das an die amplifizierte DNA bindet.

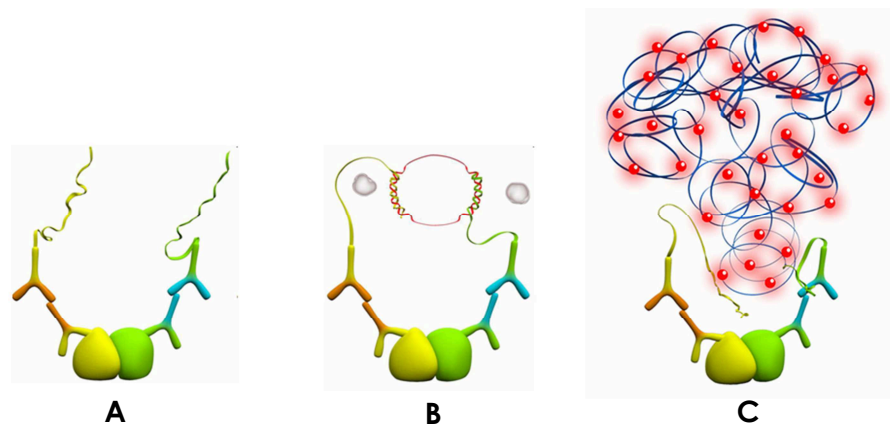


Abbildung 2.5.1.1: Prinzip des *proximity ligation assays* **A** An den beiden zu untersuchenden Proteinen (grün und gelb) binden die Primärantikörper aus Kaninchen (orange) und Maus (blau). Anschließend binden daran die passenden PLA Probes. Dies sind gegen Kaninchen bzw. Maus gerichtete Sekundärantikörper an deren Fc-Teil sich ein kurzer DNA-Einzelstrang befindet. **B** Durch die Zugabe von circle-forming DNA Oligonukleotiden (rot) und Ligasen (weiße Kugeln) kommt es zum Ringschluss. **C** Die entstandene ringförmige DNA wird durch den rolling circle Mechanismus amplifiziert. An die so vervielfältigte DNA binden im letzten Schritt Fluoreszenz-gelabelte, komplementäre Oligonukleotide. Dies führt zu einer Verstärkung jedes einzelnen Signals. (Abbildung modifiziert nach Olink.com).

U343 MG und A172 Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und fixiert. Bis zur Inkubation über Nacht mit den Primärantikörpern entsprach das Protokoll dem der Immunfluoreszenz (2.3.4). Danach wurden alle weiteren Schritte nach dem Custom Solutions Protokoll des Herstellers durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellmembranen noch mit DiO (3,3'-Diocetadecyloxacarbocyanin-Perchlorat) (1:200 in PBS) angefärbt und die Zellen anschließend nochmals mit PBS gewaschen. Danach wurden die Objektträger wie im Protokoll des Herstellers beschrieben eingedeckt.

2.6 Statistik

In dieser Arbeit wurden sämtliche statistischen Berechnungen mit Hilfe des Programms GraphPad Prism® durchgeführt. Zur Anwendung kamen one und two way Anova in Kombination mit dem Bonferoni post Test. Die erhaltenen Ergebnisse wurden in die Gruppen nicht signifikant ($p > 0,05$) und signifikant ($p < 0,05$ - $p < 0,001$, *) eingeteilt.

3. Ergebnisse

3.1 Auswahl der Kandidaten

In vorangegangenen Arbeiten wurden unter Verwendung eines *Drosophila melanogaster* Glioblastom-Modells (Witte, Jeibmann et al. 2009) eine Reihe von Kandidatengenen ermittelt, die im Zusammenhang mit der Pvr-vermittelten Migration von Gliazellen in *Drosophila* zu stehen scheinen. Als erster Schritt wurden die humanen Homologe bzw. die verwandten Proteingruppen für die Fliegen Gene mittels der BLAST-Software des *National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) auf Gen- und Proteinebene identifiziert. Aus den gefundenen humanen Genen wurden zwei ausgewählt (*loxl4* und *cd9*), die wie im Folgenden charakterisiert wurden.

LOXL4

Für das im *Drosophila*-Modell identifizierte Kandidatengen CG11335, welches das Protein DmLOXL-1 kodiert, wurde mittels Blast-Software nach einem humanen Homolog auf Proteinebene gesucht. Mit einem Expect-Wert (E-Wert) von $8 \cdot 10^{-70}$ konnte auf diesem Weg das humane Protein LOXL4 identifiziert werden.

3.2 Expression von LOX, LOXL1 und LOXL4 in Glioblastomen und Glioblastomzelllinien

Als erster Schritt wurde die Expression von humanem LOX, LOXL1 und LOXL4 in Tumoren, Kortex und Marklager auf RNA- und auf Proteinebene untersucht.

Zur Bestimmung der Expression auf RNA-Ebene wurde aus zehn Glioblastom-Biopsaten (TB 762, TB 764, TB 777, TB 784, TB 785, TB 788, TB 793, TB 797, TB 811 und TB 813), unauffälligem Kortex und Marklager RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine RTqPCR durchgeführt. Unauffälliger humaner Kortex

wurde dabei als Kontrolle verwendet (100% relative Expression) und alle anderen Proben wurden darauf bezogen. Die Expression aller drei LOX-RNAs war, verglichen mit Kortex und Marklager, in fast allen Tumoren deutlich erhöht (Abbildung 3.2.1). Im Falle von LOX war die Expression in neun von zehn Glioblastomen signifikant erhöht ($p < 0,05$). Die Werte lagen dabei zwischen dem $9,09 \pm 2,11$ -Fachen (TB 785) bis hin zum $669,37 \pm 25,89$ -Fachen (TB 762). Nur TB 793 zeigte, mit einer $1,68 \pm 0,49$ -fachen Überexpression keine signifikante Erhöhung der LOX-Expression. LOXL1 zeigt ebenfalls eine deutliche Überexpression zwischen $2,64 \pm 0,21$ -fach (TB 777) und $214,54 \pm 70,05$ -fach (TB 762). Dabei war die LOXL1-Expression ebenfalls in neun von zehn Tumoren um signifikant erhöht ($p < 0,05$), verglichen mit Kortex. LOXL4 zeigte zwar in keinem der zehn Tumoren eine ähnlich starke Überexpression wie LOX und LOXL1, dennoch war die Expression in sieben der zehn untersuchten Tumoren signifikant erhöht ($p < 0,05$). Die Hochregulation lag dabei zwischen dem $3,43 \pm 0,71$ -Fachen (TB 793) und dem $18,22 \pm 1,18$ -Fachen (TB 784). Die anderen drei Tumoren zeigten mit einer Hochregulation um das $1,32 \pm 0,12$ -Fache (TB 777), einer $2,62 \pm 0,48$ -Fache (TB 811) und das $2,91 \pm 0,24$ -Fache (TB 788) keine signifikante Veränderung bezogen auf die Kontrolle (unauffälliger humaner Kortex).

Die Expression auf Proteinebene wurde mittels Immunzytochemie überprüft. Im gesunden humanen Gehirn werden LOX, LOXL1 und LOXL4 in Neuronen, in Gefäßen und in einigen Gliazellen des Marklagers exprimiert (Abbildung 3.2.1 A-F). Im Gegensatz dazu wurde in Glioblastom-Biopsaten eine erhöhte Expression von LOX, LOXL1 und LOXL4 festgestellt (Abbildung 3.2.1 G-I) ($n=17$ Patienten). Es wurden insgesamt 17 Glioblastome für alle drei Proteine gefärbt und nach einem modifizierten Remmele-Score ausgewertet. Dazu wurde jeweils eine Zahl für den Prozentteil der positiven Zellen vergeben [0 (keine), 1 (<10%), 2 (10-50%), 3 (51-80%), 4 (81-100%)] und eine Weitere für die Intensität der Färbung [0 (keine), 1 (schwach), 2 (stark)]. Daraus ergaben sich durch Multiplikation ein maximal möglicher *staining score* von 8. Die gefärbten Glioblastome zeigten für LOX und LOXL1 einen *staining score* von 4-5 und für LOXL4 einen score von 5-6 (Abbildung 3.2.2).

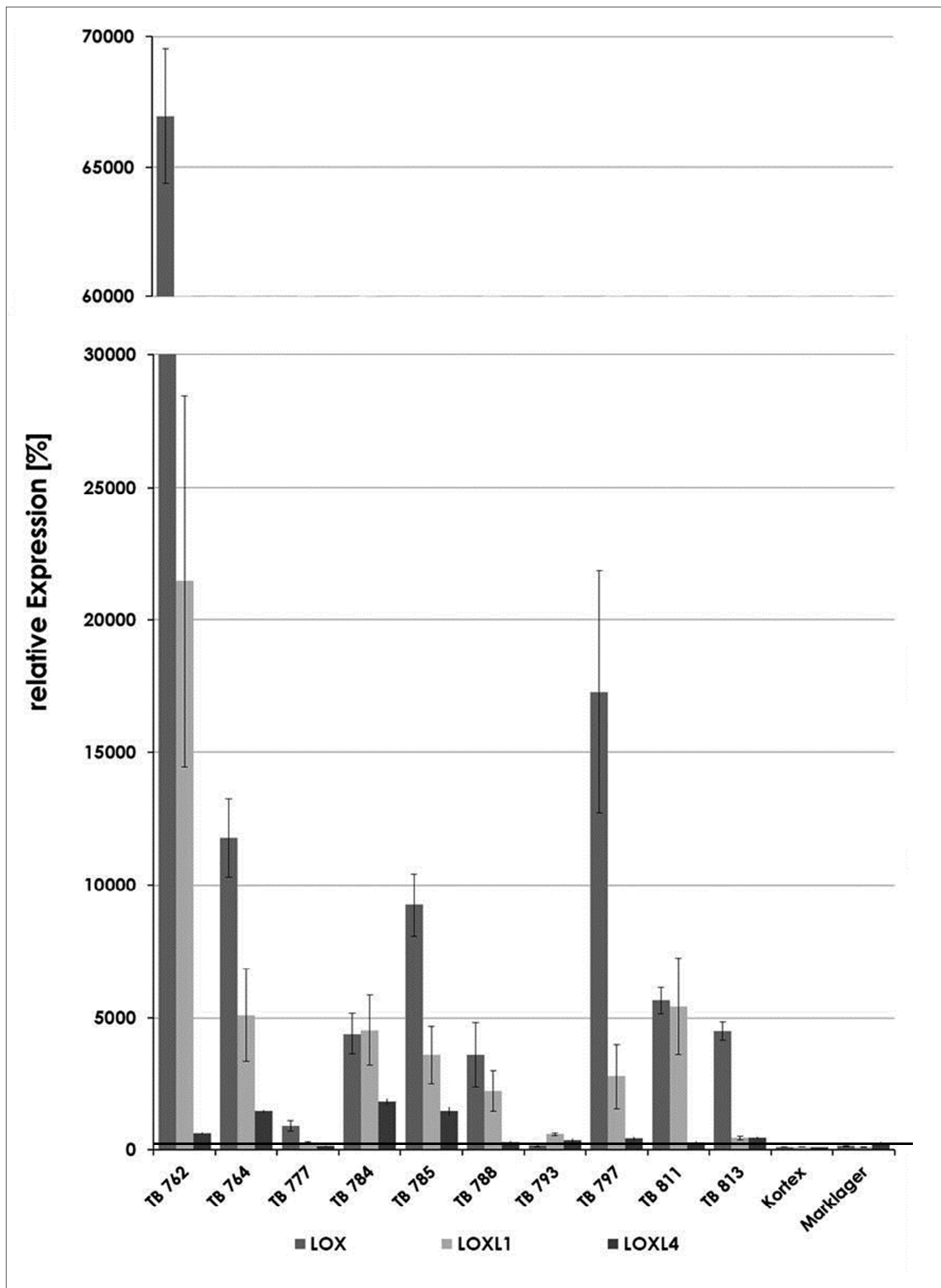


Abbildung 3.2.1: Relative Expression in % von LOX, LOXL1 und LOXL 4 in zehn unterschiedlichen Glioblastomen, in humanem Kortex und Marklager. Der Kortex wurde als Kontrolle verwendet und auf 100% gesetzt. Die Linie entspricht einer 3-fachen Hochregulation der entsprechenden Gens auf RNA-Ebene. Werte über dieser Linie sind bezogen auf unauffälligen humanen Kortex mit $p < 0,05$ signifikant erhöht. $n=3$, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

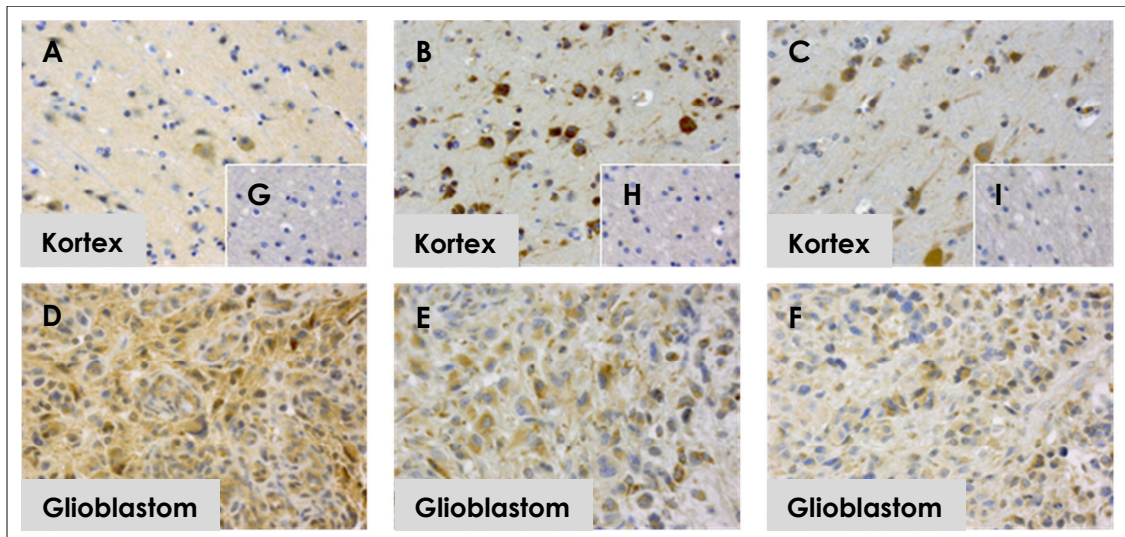


Abbildung 3.2.2: Immunhistochemische Färbungen für LOX (A, D und G), LOXL1 (B, E und H) und LOXL4 (C, F und I). Obere Reihe: Kortex und das dazu gehörige Marklager (G, H und I).

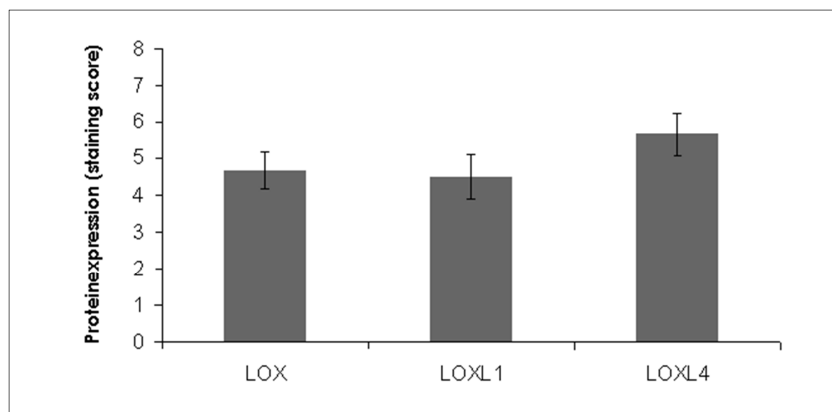


Abbildung 3.2.3: Auswertung der gefärbten Glioblastomschnitte (n=17) nach einem modifizierten Remmele-Score. Prozent positiven Zellen [0 (keine), 1 (<10%), 2 (10-50%), 3 (51-80%), 4 (81-100%)] Intensität der Färbung [0 (keine), 1 (schwach), 2 (stark)]. Der Score wurde ermittelt durch Multiplikation der vergebenen Faktoren für Prozent positive Zellen und Intensität der Färbung.

Durch die Überprüfung der Expression von LOX, LOXL1 und LOXL4 in zwei ausgewählten humanen Glioblastomzelllinien (A172 und U343 MG) konnte auf RNA-Ebene in beiden Zelllinien eine signifikante Hochregulation aller drei Kandidaten verglichen mit humanem Kortex nachgewiesen werden ($p < 0,05$) (Abbildung 3.2.4). LOX war in A172-Zellen um das $500,81 \pm 110,32$ -Fache und in U343 MG um das $1015,85 \pm 127,35$ -Fache hochreguliert. LOXL1 zeigte in A172 eine Hochregulation um das $712,61 \pm 269,26$ -Fache und in U343 MG um das $407,02 \pm 156,96$ -Fache. Für LOXL4 lag die Hochregulation auf RNA-Ebene in A172 beim $71,88 \pm 12,49$ -Fachen und in U343 MG beim $33,29 \pm 9,68$ -Fachen, verglichen mit humanem Kortex.

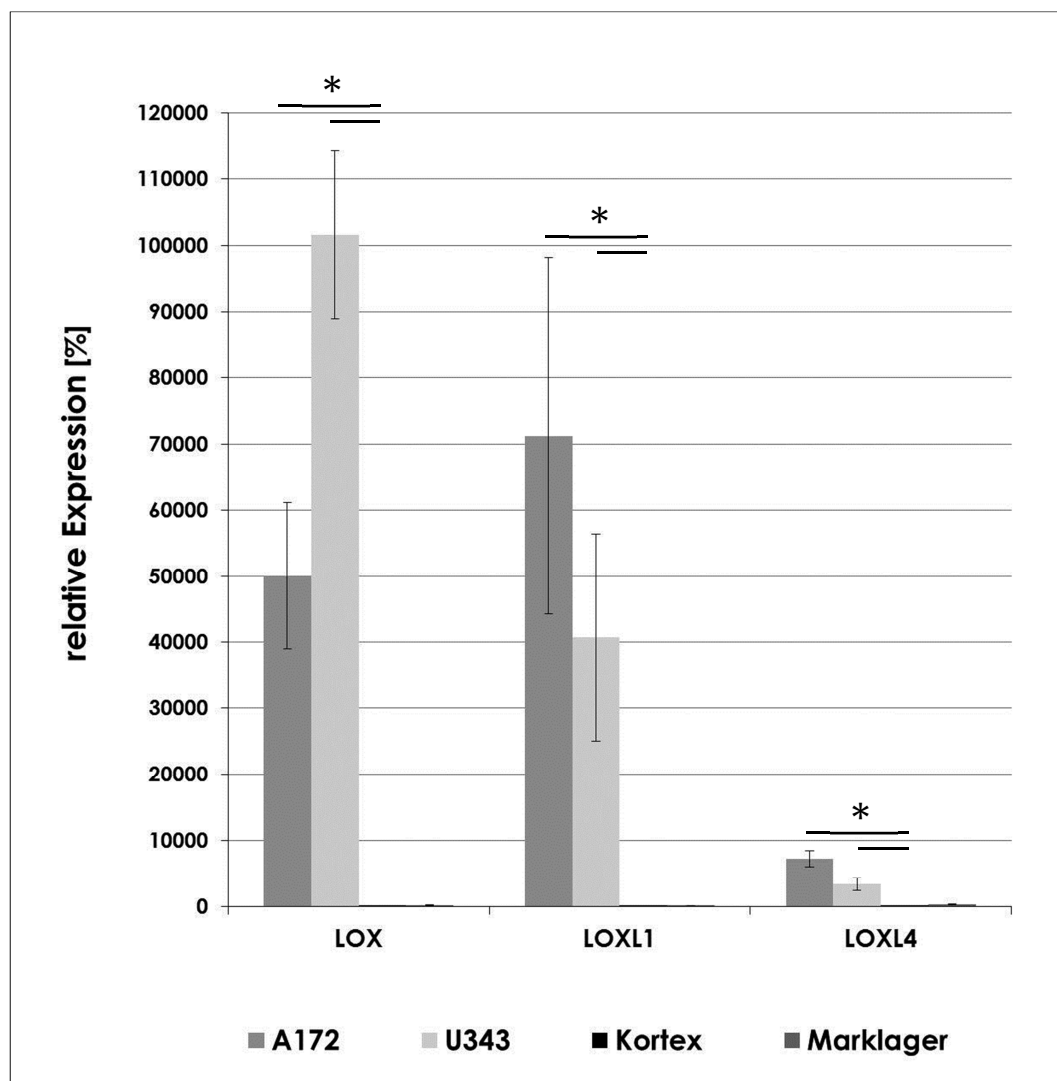


Abbildung 3.2.4: Relative Expression in % von LOX, LOXL1 und LOXL4 in A172, U343 MG und Marklager verglichen mit unauffälligem humanem Kortex (Kortex = 100%). $n=3$, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung, $p < 0,05$.

Die Expression auf Proteinebene wurde an beiden humanen Glioblastomzelllinien und einer Ratten-Glioblastomzelllinie untersucht.

Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen LOX, LOXL1 und LOXL4 durchgeführt (Abbildung 3.2.5). Als Negativkontrolle wurde IgG anstelle des Primärantikörpers eingesetzt. Im Falle von A172 und U343 MG konnten die Ergebnisse der RTqPCR auch auf Proteinebene bestätigt werden. In beiden humanen Zelllinien konnte eine deutliche Expression der drei Proteine nachgewiesen werden. Auch in der stabil mit GFP transfizierten Ratten-Glioblastomzelllinie C6-SP-GFP (Tatenhorst, Püttmann et al. 2005) konnten alle drei Proteine nachgewiesen werden.

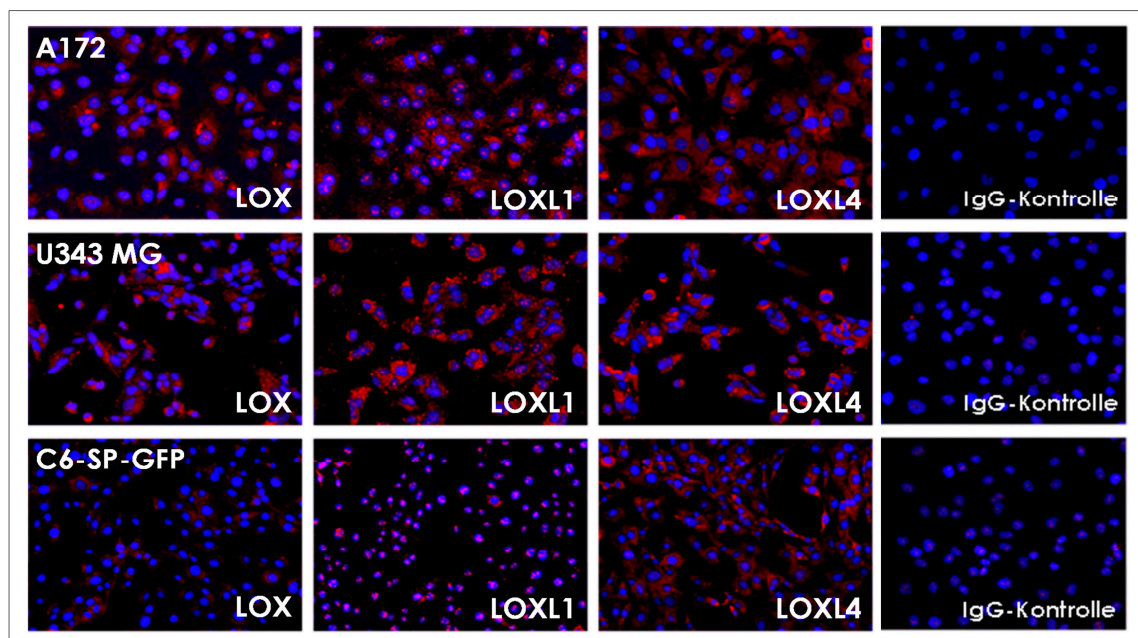


Abbildung 3.2.5: Fluoreszenzfärbung für LOX, LOXL1 und LOXL4 (rot) in den verwendeten humanen (A172, U343 MG) und Ratten Zelllinien (C6-SP-GFP). Die Zellkerne wurden mit Höchst gefärbt (blau). Als Negativkontrolle wurde IgG verwendet. Die IgG-Konzentration entsprach der jeweiligen Primärantikörper-Konzentration.

3.3 Transienter Knock-down von LOXL4

Um die potentielle Rolle von LOXL4 bei der Migration von Tumorzellen *in vitro* zu überprüfen wurde ein transienter LOXL4 Knock-down mit zwei verschiedenen siRNAs (LOXL4_1 und LOXL4_4 siRNA, Qiagen) wie unter 2.1.3 beschrieben durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde eine unspezifische siRNA verwendet, die an keine bekannte RNA-Sequenz binden kann (AllStar negative siRNA, Qiagen).

Mit den verwendeten siRNA Mengen konnte in beiden Zelllinien ein deutlicher Knock-down von LOXL4 erzeugt werden (Abbildung 3.3.1). Die Restexpression war in beiden Zelllinien nach 24 h und 96 h signifikant verringert verglichen mit der Kontrolle. In U343 MG Zellen (Abbildung 3.3.1 A) lag die Restexpression nach 24 h bei $13,6 \pm 4,6\%$ (LOXL4_1 siRNA) bzw. $10,7 \pm 3,2\%$ (LOXL4_4 siRNA) und 96 h nach dem Knock-down bei $11,6 \pm 5,2\%$ (LOXL4_1 siRNA) bzw. bei $16,1 \pm 7,0\%$ (LOXL4_4 siRNA). In den A172 Zellen konnte nach 24 h mit der LOXL4_1 siRNA ein Knock-down auf $6,1 \pm 5,7\%$ und mit der LOXL4_4 siRNA auf $4,5 \pm 2,3\%$ Restexpression erreicht werden. Auch nach 96 h war noch ein deutlicher Knock-down auf höchstens $16,4 \pm 14,6\%$ Restexpression zu sehen (Abbildung 3.3.1 B).

Um einen negativen Einfluss des LOXL4 Knock-downs auf die Vitalität der Zellen auszuschließen wurde ein MTT-Assay durchgeführt (Abbildung 3.3.2). Als Kontrolle dienten auch hier wieder mit AllStar negative siRNA transfizierte Zellen (100%). Die relative Stoffwechselaktivität der U343 MG Zellen zeigte nach 24 h mit $95,5 \pm 13,2\%$ (LOXL4_1 siRNA) und $103,2 \pm 7,9\%$ (LOXL4_4 siRNA) keine signifikante Änderung verglichen mit der Kontrolle (100%) (Abbildung 3.3.2 A). Nach 96 h war jedoch bei den mit LOXL4_1 siRNA transfizierten Zellen eine signifikante ($p < 0,01$) Verringerung der Stoffwechselaktivität auf $79,1 \pm 6,2\%$ zu beobachten. Die mit LOXL4_4 siRNA transfizierten Zellen zeigten auch zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Verringerung der Stoffwechselaktivität ($96,5 \pm 5,5\%$).

Die A172 Zellen verhielten sich nach 24 h ähnlich wie die U343 MG Zellen (Abbildung 3.3.2 B). Die relative Stoffwechselaktivität zeigte mit $94,2 \pm 4,2\%$ (LOXL4_1 siRNA) und $95,9 \pm 4,1\%$ (LOXL4_4 siRNA) keine signifikante Veränderung verglichen mit der Kontrolle (100%). Auch nach 96 h konnte keine signifikante

Änderung beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt lagen die Werte bei $95,1 \pm 2,7\%$ (LOXL4_1 siRNA) und $92,9 \pm 10,5\%$ (LOXL4_4 siRNA).

Alle weiteren Versuche wurden mit den hier getesteten siRNA Konzentrationen durchgeführt.

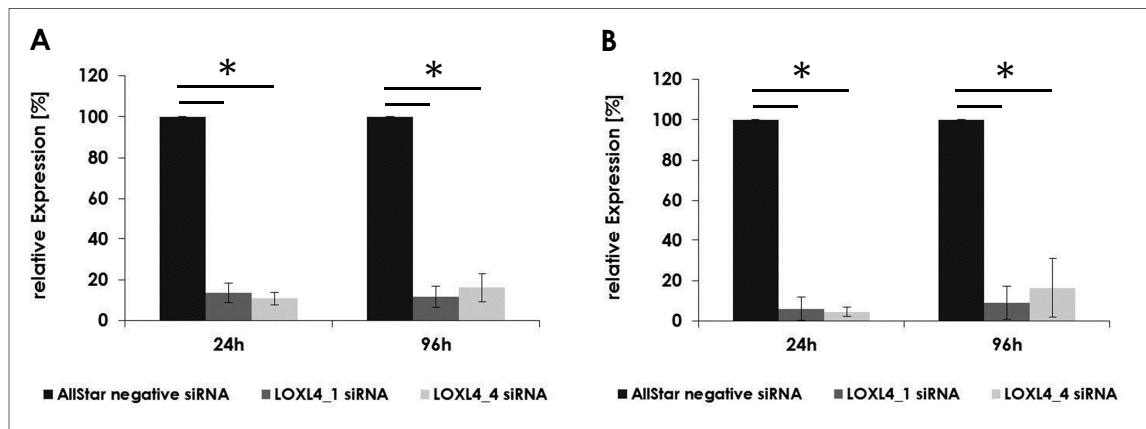


Abbildung 3.3.1: Relative Expression von LOXL4 nach LOXL4 Knock-down bezogen auf mit AllStar negative siRNA transfizierte Zellen (100%) **A** in U343 MG Zellen und **B** in A172 Zellen. n=3, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Die p-Werte liegen in allen Fällen bei $p < 0,001$.

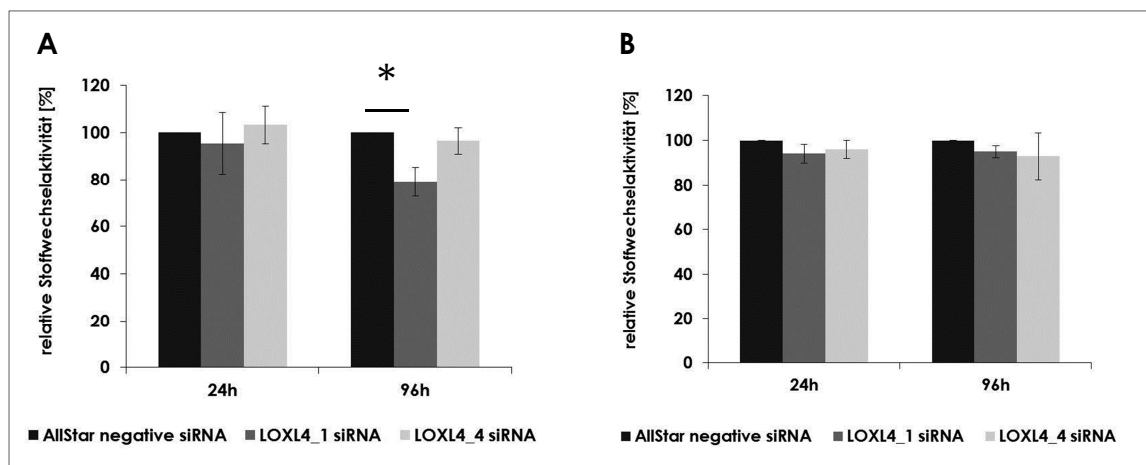


Abbildung 3.3.2: Relative Stoffwechsellaktivität von LOXL4 nach LOXL4 Knock-down bezogen auf mit AllStar negative siRNA transfizierte Zellen (100%) **A** in U343 MG Zellen ($p < 0,01$) und **B** in A172 Zellen. n=3, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

3.3.1 Migration nach LOXL4 Knock-down in Anwesenheit von PDGF-BB

Nach Etablierung des Knock-downs wurden Scratch-Assays durchgeführt (siehe 2.1.5) um den Einfluss von LOXL4 auf die Migration der Glioblastomzelllinien A172 und U343 MG *in vitro* zu untersuchen. Zusätzlich wurden die Zellen nach Knock-down mit unterschiedlichen Konzentrationen von PDGF-BB behandelt (1 ng/ml, 5 ng/ml, 20 ng/ml und 40 ng/ml) um einen eventuellen Zusammenhang des PDGF-Rezeptor Signalwegs und LOXL4 zu überprüfen. Als Kontrolle wurden mit AllStar negative siRNA transfizierte und ohne PDGF-BB behandelte Zellen verwendet. Diese Kontrolle wurde auf 100% relative Migration gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen.

Abbildung 3.3.1.1 zeigt die relative Migration der U343 MG Zellen nach 48 h. Die AllStar negative transfizierten Zellen zeigten nach Stimulation mit PDGF-BB eine deutliche Tendenz in Richtung Steigerung der Migration verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (100%) auf $125,2 \pm 8,7\%$ (1 ng/ml), $125,0 \pm 21,3\%$ (5 ng/ml), $129,9 \pm 13,4\%$ (20 ng/ml) und $167,6 \pm 28,0\%$ (40 ng/ml). Diese Steigerung der Migration war nur bei den mit 40 ng/ml PDGF-BB behandelten Zellen signifikant ($p < 0,05$). Nach LOXL4 Knock-down konnte mit beiden verwendeten siRNAs, ohne Zugabe von PDGF-BB eine Verringerung der relativen Migration auf $74,9 \pm 1,5\%$ (LOXL4_1 siRNA) und $65,1 \pm 6,2\%$ (LOXL4_4 siRNA) verglichen zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen (AllStar negative siRNA) konnte nach LOXL4 Knock-down weder die Tendenz in Richtung Steigerung noch eine signifikante Steigerung der Migration nach Stimulation mit PDGF-BB gezeigt werden.

Abbildung 3.3.1.2 zeigt die relative Migration von A172 Zellen nach 48 h. Hier zeigten die Kontrollzellen ohne Knock-down (AllStar negative siRNA) nach Stimulation mit PDGF-BB keine signifikante Steigerung der Migration. Die Werte lagen zwischen $110,3 \pm 8,7$ (1 ng/ml), $108,3 \pm 27,9\%$ (5 ng/ml), $141,3 \pm 43,4\%$ (20 ng/ml) und $117,3 \pm 38,9$ (40 ng/ml). Die LOXL4 Knock-down Zellen ohne PDGF-BB zeigten im Vergleich zur ebenfalls unstimulierten Kontrolle eine deutliche Verringerung der Migration auf $57,9 \pm 10,2\%$ (LOXL4_1 siRNA) und $77,6 \pm 3,1\%$ (LOXL4_4 siRNA). Ähnlich wie bei den U343 MG Zellen konnte auch bei den A172 Knock-down Zellen keine Steigerung der Migration durch Zugabe von PDGF-BB erzielt werden.

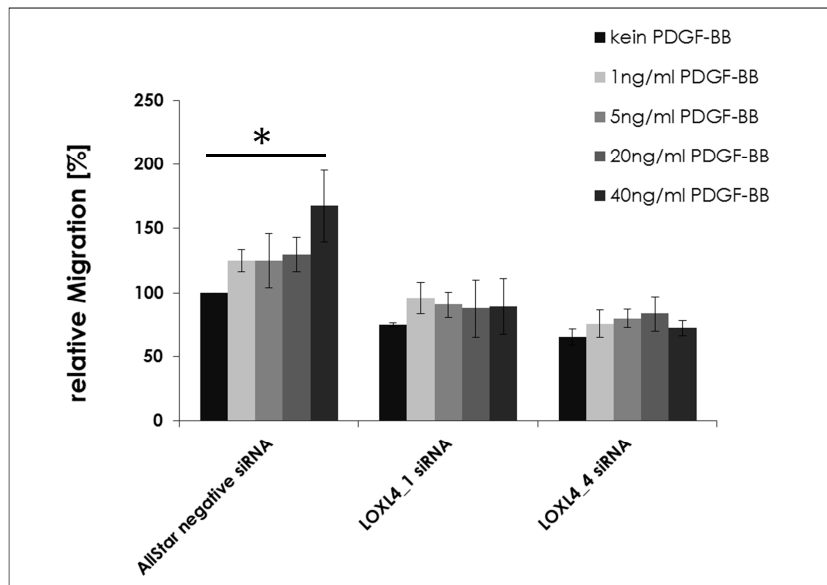


Abbildung 3.3.1.1: Relative Migration von U343 MG Zellen nach LOXL4-Knock-down mit und ohne PDGF-BB bezogen auf die Kontrolle (ohne Knockdown, ohne PDGF-BB). n=3, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung, $P < 0,05$.

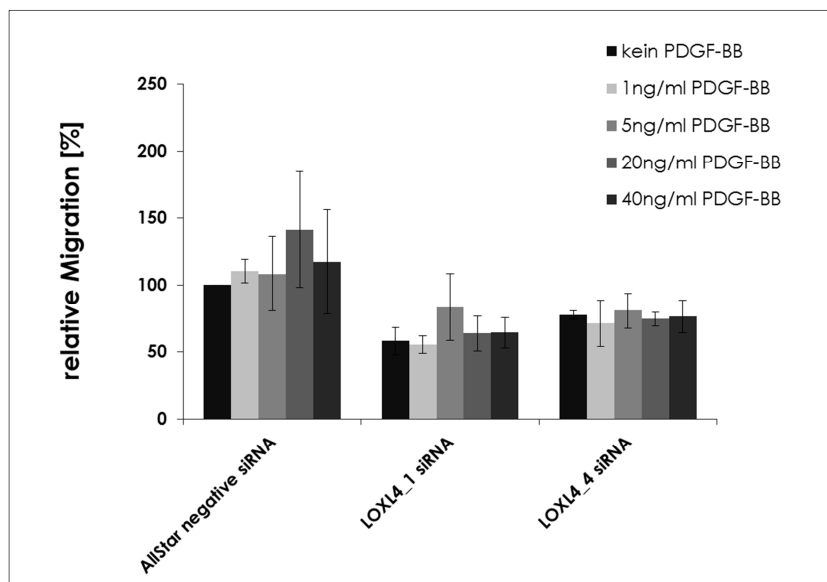


Abbildung 3.3.1.2: Relative Migration von A172 Zellen nach LOXL4-Knock-down mit und ohne PDGF-BB bezogen auf die Kontrolle (ohne Knockdown, ohne PDGF-BB). n=3, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung, $P > 0,05$.

3.3.2 MTT-Assay nach LOXL4 Knock-down in Anwesenheit von PDGF-BB

Parallel zur Untersuchung der relativen Migration nach LOXL4 Knock-down und Stimulation mit PDGF-BB wurde die relative Stoffwechselaktivität der Zellen mittels MTT-Assay bestimmt. Dazu wurden erneut AllStar negative siRNA, LOXL4_1 siRNA und LOXL4_4 siRNA transfizierte Zellen verwendet. Als Kontrolle dienten in diesem Fall unstimulierte Zellen zum entsprechenden Zeitpunkt. Diese wurden jeweils auf 100% relative Stoffwechselaktivität gesetzt und alle dazu gehörigen Werte wurden darauf bezogen.

Abbildung 3.3.2.1 zeigt die relative Stoffwechselaktivität der U343 MG Zellen. Die AllStar negative transfizierten Zellen zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Steigerung der Stoffwechselaktivität nach Stimulation mit PDGF-BB. Nach 24 h lagen die Werte zwischen $93,6 \pm 20,6\%$ (1 ng/ml) und $96,1 \pm 14,2\%$ (40 ng/ml) verglichen mit der unstimulierten Kontrolle zu diesem Zeitpunkt (100%). Nach 48 h lag die relative Stoffwechselaktivität zwischen $93,2 \pm 8,2\%$ (1 ng/ml) und $87,7 \pm 2,7\%$ (40 ng/ml). Auch bei den LOXL4_1 siRNA Knock-down Zellen konnte weder nach 24 h noch nach 48 h eine signifikante Änderung der Stoffwechselaktivität in Anwesenheit von PDGF-BB nachgewiesen werden. Nach 24 h lag die Stoffwechselaktivität zwischen $110,0 \pm 20,4\%$ (1 ng/ml) und $105,4 \pm 13,0\%$ (40 ng/ml) und nach 48 h zwischen $107,7 \pm 25,4\%$ (1 ng/ml) und $100,8 \pm 7,7\%$ (40 ng/ml) verglichen mit der jeweiligen Kontrolle (100%). Die LOXL4_4 siRNA Knock-down Zellen verhielten sich ähnlich. Auch hier waren keine deutlichen Unterschiede in der relativen Stoffwechselaktivität zu erkennen. Die Werte lagen bei diesen Zellen nach 24 h zwischen $98,6 \pm 19,7\%$ (1 ng/ml) und $103,1 \pm 1,6\%$ (40 ng/ml) und nach 48 h zwischen $100,1 \pm 24,4\%$ (1 ng/ml) und $92,2 \pm 6,0\%$ (40 ng/ml). Auch wenn bei der Kontrolle und den Knock-down Zellen einige Schwankungen in der Stoffwechselaktivität beobachtet wurden, waren diese in keinem Fall signifikant ($P > 0,05$).

Abbildung 3.3.2.2 zeigt die relative Stoffwechselaktivität in A172 Zellen. Auch bei diesen Zellen war nach AllStar negative siRNA Transfektion zum Zeitpunkt 24 h keine signifikante Änderung der Stoffwechselaktivität verglichen mit der unstimulierten Kontrolle zu erkennen ($98,6 \pm 2,3\%$ (1 ng/ml) und $104,0 \pm 2,0\%$ (40 ng/ml)). Nach 48 h konnte nur nach Stimulation mit 40 ng/ml PDGF-BB eine Steigerung der relativen Stoffwechselaktivität auf $111,0 \pm 3,9\%$ verglichen mit der

unstimulierten Kontrolle beobachtet werden. Die LOXL4_1 transfizierten Zellen zeigten ebenfalls keine signifikante Veränderung der relativen Stoffwechselaktivität nach Zugabe von PDGF-BB. Die Werte lagen nach 24 h zwischen $99,4 \pm 9,3\%$ (1 ng/ml) und $105,0 \pm 4,0\%$ (40 ng/ml). Nach 48 h war eine leichte Zunahme der Stoffwechselaktivität auf $110,1 \pm 4,7\%$ (20 ng/ml) und $111,0 \pm 3,9\%$ (40 ng/ml) zu beobachten. Bei den LOXL4_4 siRNA Knock-down Zellen konnte nur nach 24 h und Zugabe 40 ng/ml PDGF-BB eine leichte Steigerung der relativen Stoffwechselaktivität beobachtet werden ($106,5 \pm 1,6\%$).

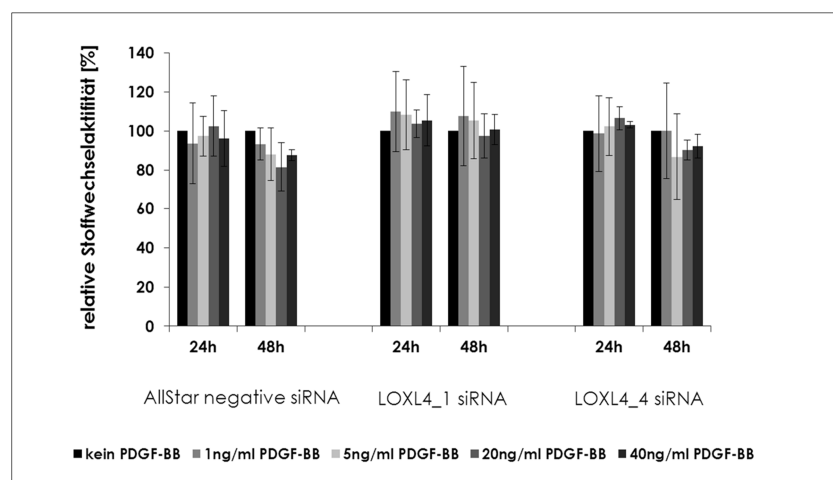


Abbildung 3.3.2.1: Relative Stoffwechselaktivität von U343 MG Zellen mit und ohne LOXL4-Knock-down nach Stimulation mit PDGF-BB bezogen auf unstimulierte Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt (100%). n=3, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

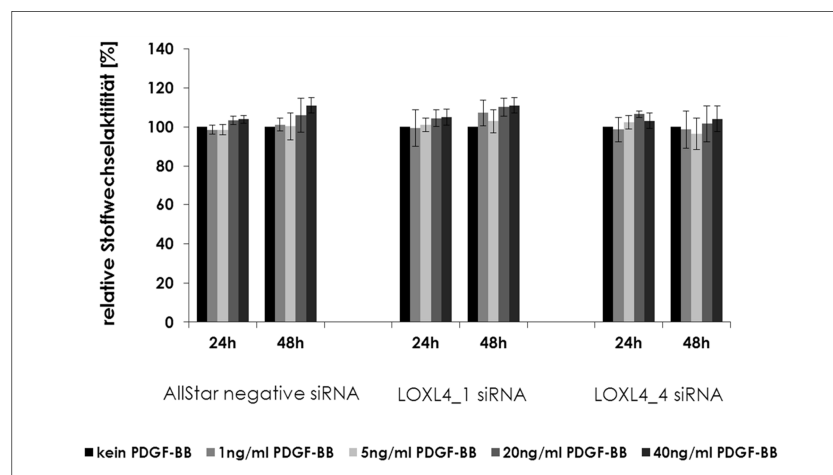


Abbildung 3.3.2.2: Relative Stoffwechselaktivität von A172 Zellen mit und ohne LOXL4-Knock-down nach Stimulation mit PDGF-BB bezogen auf unstimulierte Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt (100%). n=3, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung, $p > 0,05$.

3.4 Inhibition von LOXL4

β -Aminopropionitril (BAPN) ist ein etablierter Inhibitor von LOX, LOXL1 und LOXL4. BAPN ist ein kleines wasserlösliches Molekül, das irreversibel an den katalytisch aktiven Teil der LOX-Proteine bindet und sie so inhibiert. Da BAPN in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, eignet es sich auch als LOX-Inhibitor *in vivo* (Waddell, Wilk et al. 1974; Martin, Sosa-Melgarejo et al. 1991).

Die Wirkung dieses Inhibitors auf die Migration der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Glioblastomzelllinien wurde als erstes *in vitro* mittels Monolayer Migrations-Assay und MTT-Assay untersucht.

3.4.1 Monolayer Migrations-Assay nach BAPN-Behandlung

Zur Überprüfung des Einflusses von BAPN auf die Migration von Glioblastomzelllinien *in vivo* wurde mit A172, U343 MG und C6-SP-GFP Zellen ein Monolayer Migrations-Assay wie unter 2.1.6 beschrieben durchgeführt (Tatenhorst, Senner et al. 2004). Bei Verwendung dieses Assays kann im Gegensatz zum Wundheilungsassay eine Beschichtung des Untergrunds vorgenommen werden. In diesem Fall wurde der Untergrund mit Matrigel beschichtet. Matrigel ähnelt in seiner Zusammensetzung der humanen zellulären Basalmembran (Benton, Kleinman et al. 2011).

Die Migration wurde dabei über 48 h in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von BAPN (100 μ M, 1 mM und 5 mM) dokumentiert und mit Kontrollzellen, die ohne BAPN kultiviert wurden, verglichen (Abbildung 3.4.1.1). Die von den Zellen zum Zeitpunkt 0 h bewachsene Fläche wurde bei allen Bedingungen auf 100% gesetzt.

Die A172 Zellen zeigten nach 24 h zwar bereits eine Verdopplung der durch die Zellen bedeckte Fläche. Es konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen mit BAPN und der Kontrolle festgestellt werden. Die bedeckte Fläche lag zwischen 196,7 \pm 15,6% (unbehandelte Kontrolle) und 218,6 \pm 28,9% (5 mM BAPN). Nach 48 h lag die bedeckte Fläche zwischen 339,9 \pm 30,6 % (unbehandelte Kontrolle) und 378,3 \pm 55,3 % (5 mM BAPN). Somit war weder

nach 24 h noch nach 48 h eine signifikante Änderung in der bedeckten Fläche und damit der relativen Migration mit und ohne BAPN-Behandlung zu erkennen.

Die U343 MG Zellen zeigten hingegen eine leichte Tendenz in Richtung einer migrationshemmenden Wirkung von BAPN. Nach 24 h lag die von Zellen bedeckte Fläche bei $160,7 \pm 4,3\%$ (unbehandelte Kontrolle) bzw. $146,0 \pm 9,5\%$ (5 mM BAPN) und nach 48 h bei $261,8 \pm 3,3\%$ (unbehandelte Kontrolle) bzw. $230,0 \pm 20,2\%$ (5 mM BAPN).

Die C6-SP-GFP Zellen verhielten sich ähnlich wie die A172 Zellen. Auch bei ihnen war weder nach 24 h noch nach 48 h ein Einfluss von BAPN auf die Zunahme der bedeckten Fläche und damit auf die Migration zu beobachten. Nach 24 h lagen die Werte zwischen $228,6 \pm 11,5\%$ (unbehandelte Kontrolle) und $234,2 \pm 3,7\%$ (5 mM BAPN), nach 48 h zwischen $417,4 \pm 20,8\%$ (unbehandelte Kontrolle) und $415,7 \pm 22,0\%$ (5 mM BAPN).

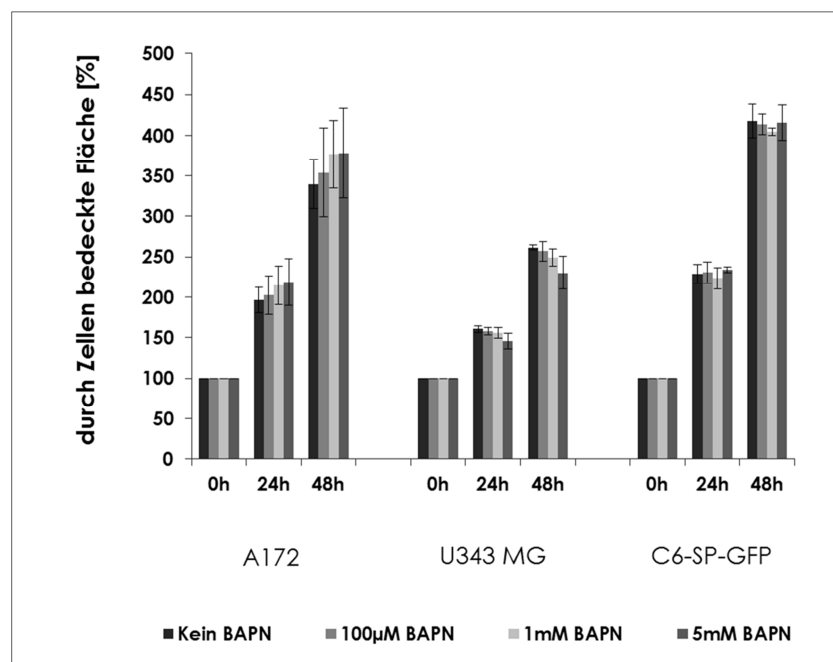


Abbildung 3.4.1.1: Durch Zellen bedeckte Fläche in Prozent als Maß für die Migration von A172, U343 MG und C6-SP-GFP Zellen nach Behandlung mit BAPN (100 µM bis 5 mM). Als Kontrolle wurden jeweils unbehandelte Zellen verwendet (0 h Zeitpunkt auf 100% gesetzt). n=3, Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung, $p > 0,05$.

3.4.2 MTT-Assay mit BAPN-Behandlung

Um einen Einfluss von BAPN auf die Proliferation der Zellen ausschließen zu können wurde ein MTT-Assay durchgeführt (siehe unter 2.1.4).

Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die zum Zeitpunkt 24 h und 48 h jeweils auf 100% gesetzt wurden. Alle anderen Werte des jeweiligen Zeitpunkts wurden darauf nomiert.

Die A172 Zellen zeigten nach 24 h eine relative Stoffwechselaktivität zwischen $96,4 \pm 2,9\%$ (100 μM BAPN) und $95,3 \pm 4,6\%$ (5 mM BAPN) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100%). Der einzige Ansatz der eine leichte Veränderung der Stoffwechselaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigte waren Zellen die mit 1 mM BAPN behandelt wurden ($93,6 \pm 2,8\%$). Nach 48 h lagen die Werte zwischen $100,1 \pm 6,2\%$ (100 μM BAPN) und $97,9 \pm 5,4\%$ (5 mM BAPN) und zeigten damit keine signifikanten Änderungen zur unbehandelten Kontrolle.

Auch im Falle der U343 MG Zellen waren weder nach 24 h noch nach 48 h deutliche Unterschiede in der relativen Stoffwechselaktivität zu beobachten. Nach 24 h lagen die Werte der BAPN behandelten Zellen, im Vergleich zur Kontrolle (100%), zwischen $97,4 \pm 5,4\%$ (100 μM BAPN) und $98,0 \pm 5,2\%$ (5 mM BAPN). Nach 48 h lagen die Werte zwischen $99,0 \pm 3,3\%$ (100 μM) und $100,2 \pm 4,0\%$ (5 mM BAPN).

Die C6-SP-GFP Zellen zeigten ebenfalls keine deutliche Änderung der relativen Stoffwechselaktivität nach Behandlung mit BAPN. Die Werte lagen hier nach 24 h zwischen $93,8 \pm 2,5\%$ (100 μM BAPN) und $97,3 \pm 1,7\%$ (5 mM BAPN) bezogen auf die unbehandelten Kontrollzellen (100%) und nach 48 h zwischen $99,9 \pm 2,8\%$ (100 μM BAPN) und $107,0 \pm 4,1\%$ (5 mM BAPN). Nur ein Ansatz zeigte nach 48 h eine leichte Steigerung der relativen Stoffwechselaktivität auf $109,9 \pm 6,9\%$ (1 mM BAPN).

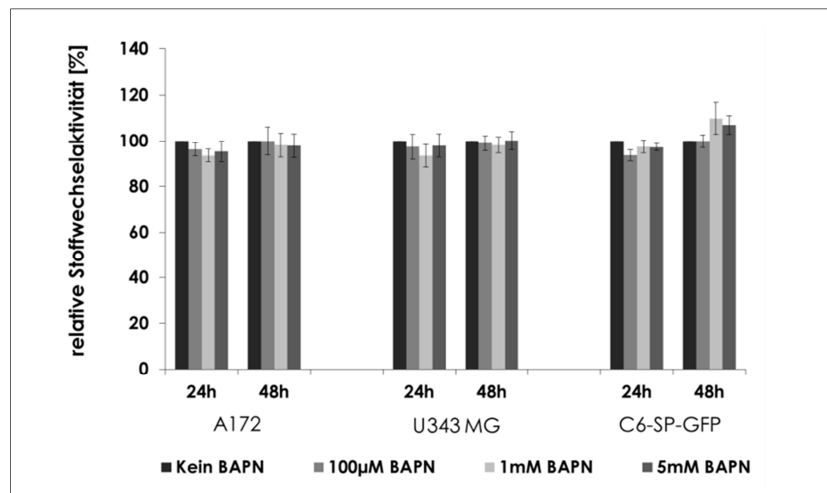


Abbildung 3.4.2.1: relative Stoffwechselaktivität in % von A172, U343 MG und C6-SP-GFP Zellen nach Behandlung mit BAPN (100 µM bis 5 mM). Als Kontrolle wurden jeweils unbehandelte Zellen verwendet (24h Zeitpunkt auf 100% gesetzt). n=3, Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung, $p > 0,05$.

3.5 *In vivo* Versuche: Untersuchung des Tumorwachstums im Mausmodell in Anwesenheit eines LOXL4-Inhibitors

Um zu überprüfen, ob der Inhibitor BAPN unter *in vivo* Bedingungen Einfluss auf die Migration von Glioblastomzellen hat, wurden zwei Gruppen aus je fünf Mäusen C6-SP-GFP Zellen in das Gehirn transplantiert. Während der einen Gruppe ab einem Tag vor der Transplantation täglich 100 mg/kg BAPN intraperitoneal injiziert wurden, diente die zweite Gruppe als Kontrolle. Dieser Gruppe wurde anstelle von BAPN PBS injiziert.

3.5.1 Volumenbestimmung

Die Kontrolle des Tumorwachstums erfolgte zehn und fünfzehn Tage nach der Implantation der Zellen mittels MRT. Aus den so generierten Einzelbildern (Abbildung 3.5.1.1 A und B) wurde, mit Hilfe eines Computerprogramms, ein 3-dimensionales Bild der Tumoren erstellt, anhand dessen das Volumen des soliden Anteils des Tumors berechnet werden konnte (Abbildung 3.5.1.1 C und

D). Die ermittelten Tumolvolumina der BAPN-Mäuse zeigten weder nach zehn, noch nach fünfzehn Tagen einen Unterschied im Volumen zu den mit PBS behandelten Kontrollmäusen (Abbildung 3.5.1.1 E). Zehn Tage nach der Implantation der C6-SP-GFP Zellen lag die mittlere Größe der mit PBS behandelten Tumoren bei $18,9 \pm 10,6 \text{ mm}^3$ (Standardabweichung $18,9 \pm 28,2 \text{ mm}^3$) und bei den mit BAPN behandelten Tumoren bei $8,4 \pm 1,3 \text{ mm}^3$ (Standardabweichung $8,4 \pm 7,5 \text{ mm}^3$). Nach 15 Tagen waren die Tumoren der PBS-Mäuse im Durchschnitt $89,6 \pm 23,1 \text{ mm}^3$ (Standardabweichung $89,6 \pm 65,4 \text{ mm}^3$) und die der BAPN-Mäuse $86,4 \pm 16,3 \text{ mm}^3$ (Standardabweichung $86,4 \pm 51,7 \text{ mm}^3$) groß.

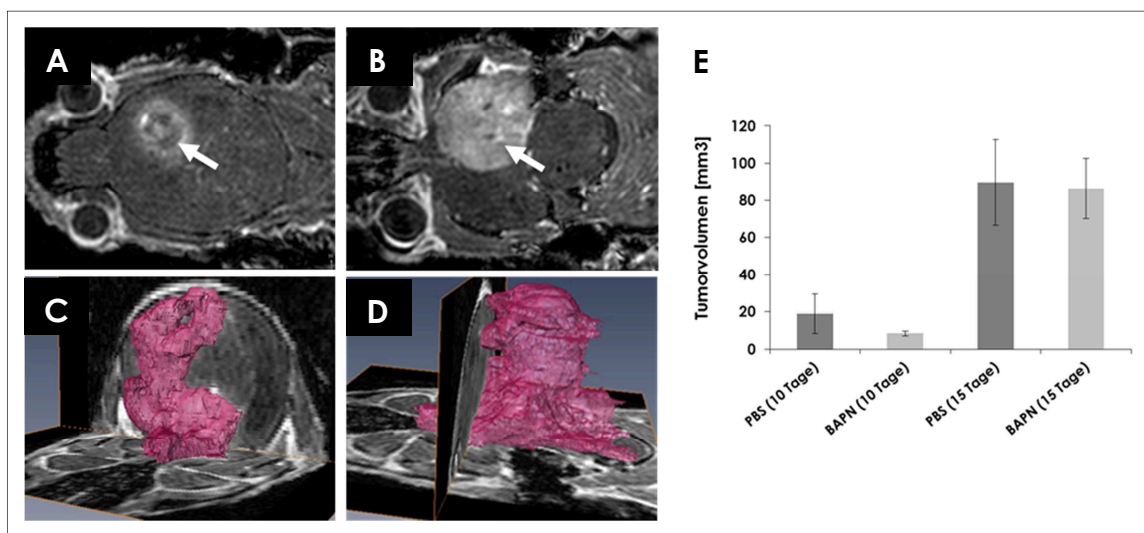


Abbildung 3.5.1.1: **A** und **B:** Zwei Beispielbilder der MRT-Aufnahmen einer mit BAPN-behandelten NMRI nu/nu Maus. Die Bilder zeigen zwei unterschiedliche Ebenen im Gehirn einer Maus. Der Tumor wurde jeweils durch einen Pfeil markiert. **C** und **D:** 3D-Rekonstruktion eines PBS-behandelten Tumors nach 15 Tagen. **E:** Anhand der 3D-Rekonstruktionen bestimmtes Volumen in mm^3 der PBS- und BAPN-Behandelten C6-SP-GFP Tumoren. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des arithmetischen Mittels, $n=10$, $p>0,05$.

3.5.2 Histologie und Charakterisierung der Infiltrationszone

Zur weiteren Charakterisierung der Tumoren wurden die Gehirne der Mäuse mit Formalin fixiert, in Paraffinblöcke gegossen und seriell aufgeschnitten. Aufgrund der grünen Fluoreszenz der implantierten C6-SP-GFP-Zellen konnten die Grenzen der Tumoren zum umliegenden Gewebe mit Hilfe von Fluoreszenzaufnahmen dokumentiert werden. Zusätzlich wurden weitere Schnitte Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt um die Tumorzellen auch im Durchlicht sichtbar zu machen (Abbildung 3.5.2.1). Bei den mit PBS behandelten Kontrollmäusen (A und C) waren deutlich kleine Zell-Cluster zu erkennen, die vom soliden Anteil des Tumors in das umliegende Gewebe gewandert waren. Im Vergleich dazu erschienen die Tumoren der mit BAPN behandelten Mäuse klarer abgegrenzt und zeigten keine Infiltrationszone (B und D).

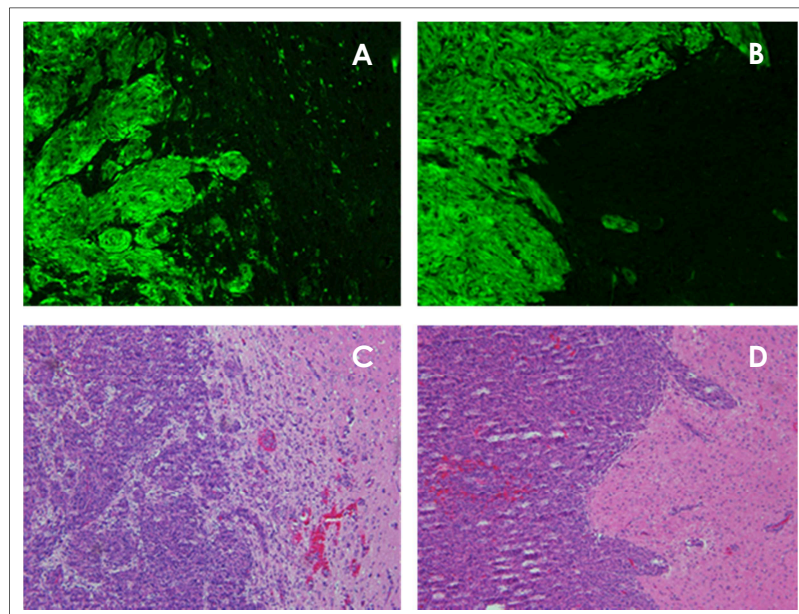


Abbildung 3.5.2.1: Paraffinschnitte der C6-SP-GFP-Tumoren: **A** und **C**: PBS-behandelter Tumor. **B** und **D**: BAPN-behandelter Tumor. **A** und **B**: Fluoreszenzaufnahme der GFP-exprimierenden Tumorzellen. **C** und **D**: HE-Färbung. 10-fache Vergrößerung.

Für die quantitative Bestimmung der Tumor-Zell-Cluster wurde jeweils der Schnitt mit der größten Tumorausdehnung in einer Serie von Einzelbildern komplett fotografiert. Die Einzelbilder wurden unter Verwendung des Programms Photoshop zu einem Komplettbild zusammengesetzt (Abbildung 3.5.2.2 A).

Anhand dieser Bilder konnte mittels des Programms *analySIS FIVE* eine weitere Charakterisierung der Tumoren und des umliegenden Gewebes durchgeführt werden. Der auf diesem Wege ermittelte solide Anteil der Tumoren war bei den mit BAPN behandelten Mäusen mit $15,8 \pm 2,7 \text{ mm}^2$ signifikant größer als bei den PBS behandelten Tumoren ($9,3 \pm 1,9 \text{ mm}^2$) ($p < 0,05$) (Abbildung 3.5.2.2 B). Im Gegensatz dazu war die Anzahl der Tumor-Zell-Cluster bei den PBS-Mäusen mit $260,8 \pm 66,5$ signifikant höher als bei den BAPN-Mäusen ($51,4 \pm 8,4$) ($p < 0,05$). Dies galt auch für die durchschnittliche Fläche der Tumor-Zell-Cluster, die bei den PBS-Mäusen bei $336110,4 \pm 146759,0 \mu\text{m}^2$ und bei den BAPN-Mäusen bei $71832,6 \pm 8279,0 \mu\text{m}^2$ lag ($p < 0,05$) (Abbildung 3.5.2.2 C und D).

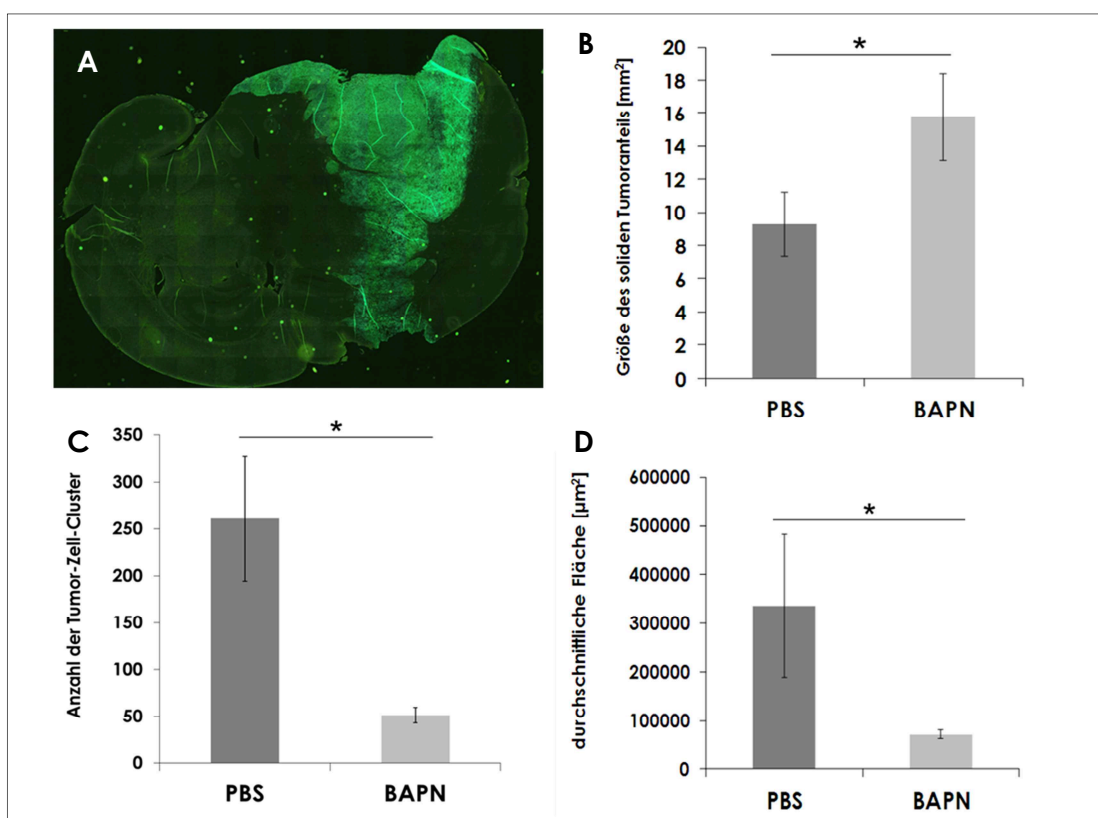


Abbildung 3.5.2.2: Charakterisierung der Infiltrationszone. **A** Aus Einzelbildern zusammengesetzte Gesamtansicht eines Paraffinschnitts (PBS-behandelter C6-SP-GFP Tumor). Es wurde jeweils der Schnitt mit der größten Tumorausdehnung verwendet. **B** Größe des soliden Tumoranteils in mm^2 (jeweils $n=5$, $p < 0,05$). **C** Anzahl der gezählten Tumor-Zell-Cluster in der Infiltrationszone bei PBS- und BAPN-behandelten C6-SP-GFP Tumoren (jeweils $n=5$, $p < 0,05$). **D** Durchschnittliche Fläche in μm^2 der Tumor-Zell-Cluster in der Infiltrationszone von PBS- und BAPN-behandelten C6-SP-GFP Tumoren (jeweils $n=5$, $p < 0,05$).

3.5.3 Proliferation der unterschiedlich behandelten Tumorzellen

Zur Klärung des Proliferationsverhaltens der Tumoren wurden Schnitte von jeweils fünf mit BAPN behandelten und fünf Kontrollmäusen mit einem Ki67-Antikörper gefärbt. Das Ki67-Protein wird von Zellen in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S- und M-Phase) exprimiert, nicht aber in ruhenden Zellen (G0-Phase).

Abbildung 3.5.3.1 zeigt exemplarisch eine Ki67-Färbung eines mit PBS behandelten (A) und eines mit BAPN behandelten (B) Tumors. Die Anzahl der Ki67-positiven Zellen lag im Falle der PBS-behandelten Tumoren bei $77,9 \pm 1,8\%$ und in den BAPN-behandelten Tumoren bei $80,1 \pm 3,5\%$ (C). Somit konnte kein signifikanter Unterschied in der Proliferation der unterschiedlich behandelten Tumoren nachgewiesen werden.

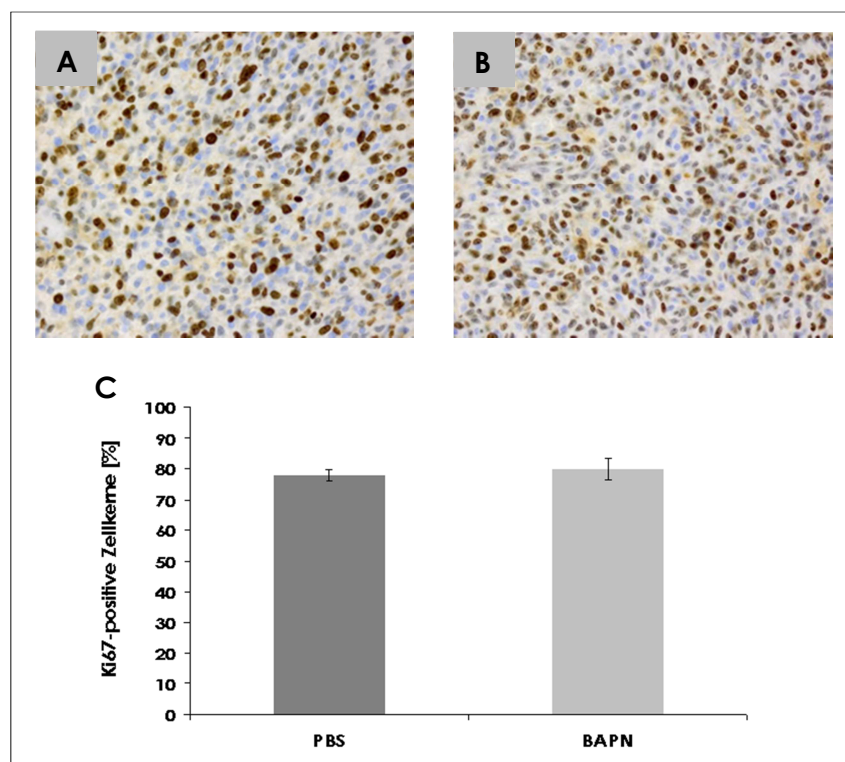


Abbildung 3.5.3.1: Ki67-Färbung **A** eines mit PBS behandelten und **B** eines mit BAPN behandelten C6-SP-GFP Tumors. **C** Anzahl der Ki67-positiven Zellkerne in PBS- und BAPN behandelten C6-SP-GFP Tumoren (jeweils $n=5$, $p>0,05$).

CD9

Wie LOXL4 wurde auch CD9 mittels BLAST-Software des *National Center for Biotechnology Information* mit einem E-Wert von $4 \cdot 10^{-14}$ als humaner Kandidat auf Proteinebene identifiziert. CD9 kann auf Grund des E-Werts nicht als direktes Homolog des im *Drosophila*-Modell gefundenen TSP2A gezählt werden, es handelt sich um ein verwandtes Protein aus der humanen Familie der Tetraspanine.

3.6 Expression von CD9 in Glioblastomen und humanen Glioblastomzelllinien

Zur Bestimmung der Expression von CD9 in Glioblastomen wurde eine RTqPCR mit sieben unterschiedlichen Glioblastomen (TB 762, TB 764, TB 784, TB 797, TB 811 und TB 813), humanem Kortex und Marklager durchgeführt. Kortex wurde als Kontrolle verwendet (100%) und alle anderen Proben wurden darauf nomiert (Abbildung 3.6.1). Der Großteil der Tumoren zeigte eine relative Expression zwischen $275,7 \pm 95,6\%$ (TB 762) und $540,1 \pm 252,5\%$ (TB 784) bezogen auf Kortex (100%). Fünf der untersuchten Tumoren (TB 764, TB 784, TB 797, TB 811 und TB 813) zeigten eine signifikante Hochregulation von CD9 verglichen mit gesundem humanem Kortex ($p < 0,05$). Zwei der untersuchten Glioblastome zeigten dabei eine besonders deutliche Hochregulation von CD9 um das 19,5- (TB 764) bzw. das 23,4-Fache (TB 813). Die relative Expression lag bei diesen beiden Tumoren bei $1950,0 \pm 263,8\%$ (TB 764) und $2344,1 \pm 762,9\%$ (TB 813). Die Expression von CD9 im Marklager war, verglichen mit dem Kortex (100%), ebenfalls sehr stark erhöht ($2298,3 \pm 302,1\%$).

Nach der Bestimmung der CD9-Expression auf RNA Ebene wurde mittels Immunzytochemie und Western Blot die Expression auf Proteinebene überprüft (Abbildung 3.6.2). Es wurden 22 Glioblastome für CD9 gefärbt und zur Auswertung in folgende Kategorien eingeteilt, CD9 abwesend, weniger als 20% CD9 positive Tumorzellen und mehr als 20% CD9 positive Tumorzellen (Abbildung 3.6.2, C). Der Großteil dieser Tumoren war CD9 positiv ($n=16$). Dabei lag bei 12 Tumoren der Anteil an CD9 positiven Zellen unter 20% und bei vier

Tumoren über 20%. In sechs Tumoren konnte gar kein CD9 nachgewiesen werden.

Die Abbildungen 3.6.2 A und B zeigen exemplarisch zwei der gefärbten Glioblastome, wobei B einen Tumor mit deutlich mehr als 20% positiver Zellen zeigt und A einen Tumor mit weniger als 20% CD9 positiver Zellen. Die in A mit einem Pfeil markierten CD9 positiven Gefäße wurden in keinem der Tumore für die Auszählung berücksichtigt, da CD9 auch in gesundem Gehirn in Gefäßwänden exprimiert wird (Sincock, Mayrhofer et al. 1997; Yubero, Jimenez-Marin et al. 2010). Zusätzlich wurde mit einem der mittels RTqPCR charakterisierten Tumoren (TB 813) ein Western Blot durchgeführt (Abbildung 3.6.2 D). In diesem Blot konnten zwei deutliche Banden auf der Höhe von ca. 24 kDa und 70 kDa detektiert werden. Die kleinere Bande entspricht der in der Literatur beschriebenen Größe von CD9 (22-27 kDa) (Hemler 2008; Kaewmala, Uddin et al. 2011). Von der zweiten, größeren Proteinbande ist bekannt dass sie durch die Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers in Verbindung mit einem Verstärker-Kit auftritt und unabhängig vom verwendeten Primärantikörper ist. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

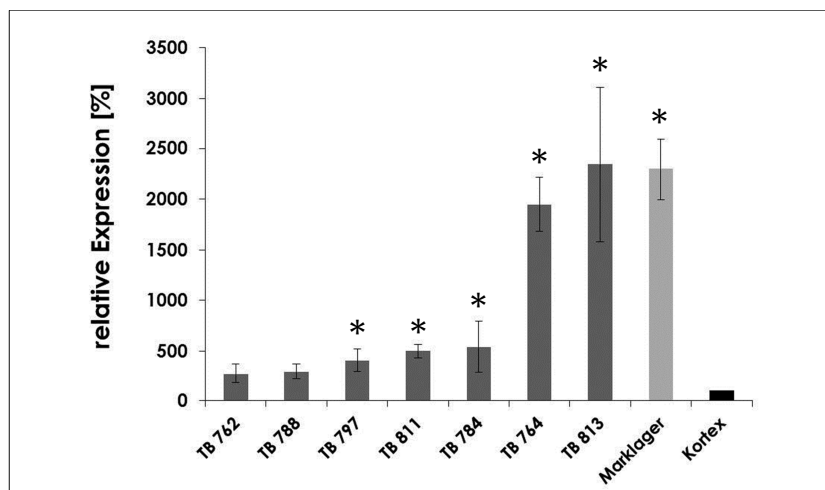


Abbildung 3.6.1: Relative Expression in % von CD9 in Glioblastomen, in humanen Kortex und Marklager. Kortex wurde als Kontrolle verwendet und auf 100% gesetzt. n=3, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung, $p < 0,05$.

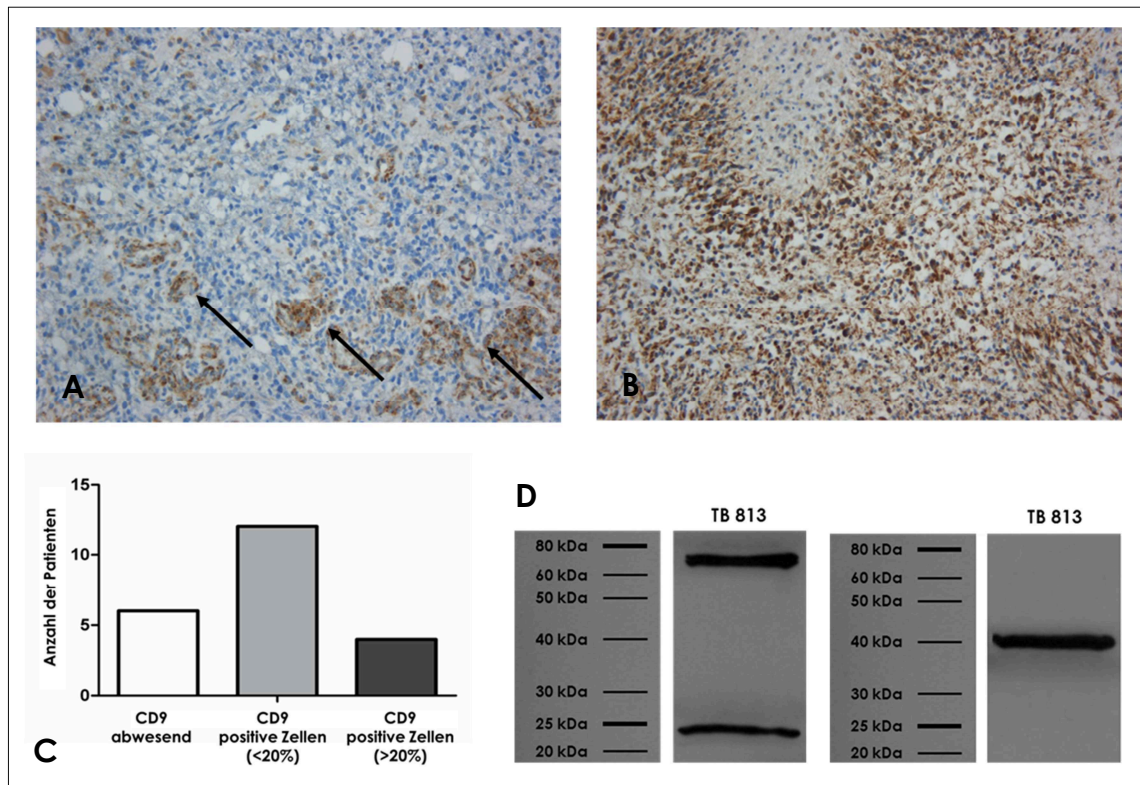


Abbildung 3.6.2: Immunhistochemische CD9-Färbung an Glioblastomschnitten (**A** und **B**) (die Pfeile in **A** markieren CD9 positive Gefäße). **C** Auswertung der Färbereintensität in 22 Glioblastomen. Western Blot für CD9 (**D**) an einem Glioblastom. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

Als nächster Schritt wurde die Expression von CD9 in sechs humanen Glioblastomzelllinien mittels RTqPCR überprüft. Als Kontrolle diente gesunder humaner Kortex auf alle anderen Werte nomiert wurden. Fünf der untersuchten Zelllinien zeigten eine signifikante ($P < 0,05$) Hochregulation der relativen CD9 Expression (Abbildung 3.6.3). Nur im Fall der H4 Zellen konnte mit einer relativen Expression von $114,8 \pm 18,3\%$ kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (100%) nachgewiesen werden. Bei den restlichen Zelllinien lag die Erhöhung der CD9-Expression zwischen dem $1,6 \pm 0,1$ -Fachen bis hin zum $6,9 \pm 0,4$ -Fachen. Die Zelllinien D54 ($640,6 \pm 23,6\%$), A172 ($588,6 \pm 11,6\%$) und U343 MG ($694,7 \pm 38,4\%$) zeigten dabei die höchste CD9 Expression verglichen mit Kortex (100%).

Der anschließende Western Blot zur Überprüfung der CD9-Expression auf Proteinebene. Dazu wurden zwei der Zelllinien ausgewählt (A172 und U343 MG), die in der RTqPCR eine hohe Expression von CD9 zeigten. Beide Zelllinien zeigten zwei deutliche Banden (Abbildung 3.6.4). Eine auf der Höhe von etwa 70 kDa

und eine bei etwa 24 kDa. Dabei war die kleinere der beiden Banden bei den U343 MG Zellen stärker ausgeprägt als bei den A172 Zellen. Die zweite Bande stammt, wie bereits weiter oben beschrieben (3.6, S. 58), von der Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers. Der als Ladekontrolle durchgeführte β -Aktin Blot zeigte jeweils eine deutliche Bande mit der gleichen Intensität auf der Höhe von ca. 40 kDa.

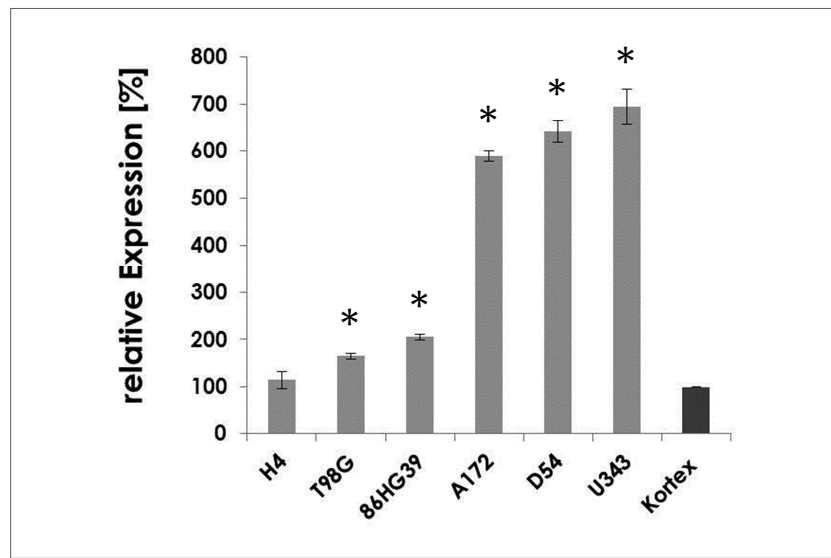


Abbildung 3.6.3: Relative Expression in % von CD9 in humanen Glioblastomzelllinien (T98G, D54, 86HG39, H4, A172, U343 MG), Kortex und Marklager. Kortex diente als Kontrolle und wurde auf 100% gesetzt. n=3, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung, $P < 0,05$.

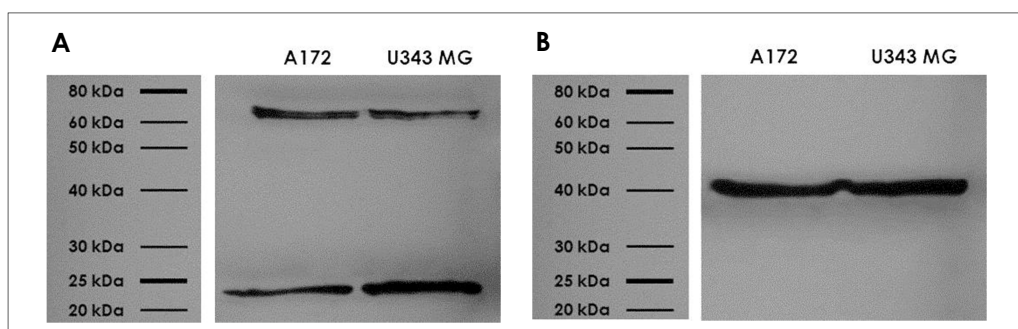


Abbildung 3.6.4: Western Blot für CD9 an A172 und U343 MG Zellen (A). β -Aktin Ladekontrolle (B).

Für die weiteren Versuche wurden die Zelllinien A172 und U343 MG ausgewählt. Diese Zelllinien zeigten nicht nur eine deutliche Hochregulation von CD9 auf RNA Ebene, verglichen mit gesundem Kortex (Abbildung 3.6.3), sondern sie zeichneten sich auch durch ihr unterschiedliches Expressionsprofil der PDGF Rezeptoren aus. Dies konnte auf Proteinebene anhand einer Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Abbildung 3.6.5 U343 MG (A-E) und A172 (F-J)). Während die U343 MG Zellen eine deutlich stärkere Expression von PDGFR α (A) und eine schwächere Expression von PDGFR β (B) zeigten, war dies bei den A172 Zellen umgekehrt. Diese Zellen zeigten eine geringere Expression von PDGFR α (F) und eine stärkere von PDGFR β (G). Im Fall von CD9 konnte in beiden Zelllinien eine Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden. Diese war in A172 Zellen (H) etwas geringer als in den U343 MG Zellen (C). Als Kontrolle wurden zeitgleich Färbungen mit Maus und Kaninchen IgG anstelle der Primärantikörper durchgeführt. Diese waren in allen Fällen negativ (D, E, I und J).

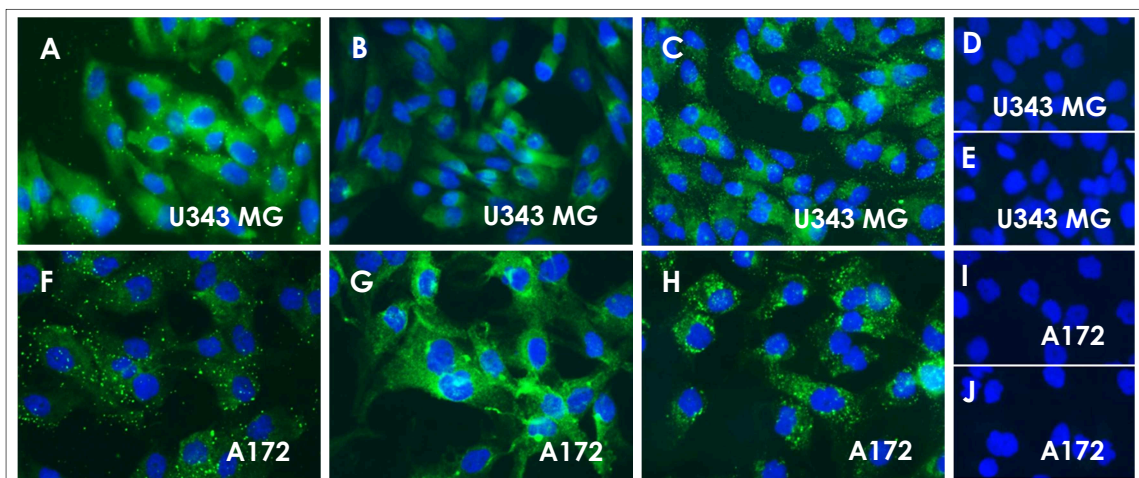


Abbildung 3.6.5: Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen PDGFR α (A, F), PDGFR β (B, G) und CD9 (C, H) in U343 MG und A172 Zellen. Zusätzlich wurden Negativkontrollen mit Maus IgG (D, I) und Kaninchen IgG (E, F) durchgeführt. 40-fache Vergrößerung. (Verwendete Antikörper: anti-CD9 [EPR2949] Kaninchen monoklonal; anti-PDGFR α , Maus monoklonal; anti-PDGFR β , Maus monoklonal.)

3.7 Transienter Knock-down von CD9

Nach abgeschlossener Charakterisierung der CD9 Expression wurde in den beiden ausgewählten humanen Glioblastomzelllinien ein transienter CD9 Knock-down mit zwei verschiedenen siRNAs etabliert (CD9_1 und CD9_7 siRNA) (siehe Methoden 2.3.1). Dieser wurde mittels RTqPCR überprüft. Als Kontrolle dienten mit AllStar negative siRNA transfizierte Zellen, auf die nomiert wurde.

Mit den verwendeten siRNA Konzentrationen (siehe unter 2.1.3) konnte in beiden Zelllinien über einen Zeitraum von 96 h ein signifikanter ($P < 0,0001$) Knock-down von CD9 erreicht werden (Abbildung 3.7.1).

In U343 MG Zellen (A) lag die Restexpression nach 24 h bei $14,3 \pm 2,7\%$ in den CD9_1 siRNA transfizierten Zellen und bei $10,8 \pm 2,0\%$ in den CD9_7 siRNA transfizierten Zellen. Auch nach 96 h konnte noch ein signifikanter Knock-down auf $24,2 \pm 14,9\%$ (CD9_1 siRNA) und $13,3 \pm 6,6\%$ (CD9_7 siRNA) nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte in A172 Zellen ein signifikanter Knock-down mit beiden verwendeten siRNAs erreicht werden (B). Hier lag die Restexpression nach 24 h bei $14,1 \pm 4,1\%$ (CD_1 siRNA) und $5,8 \pm 2,3\%$ (CD9_7 siRNA) verglichen mit den Kontrollzellen. Ähnlich wie in den U343 MG Zellen stieg die CD9 Expression nach 96 h wieder leicht an. Dennoch war auch in A172 Zellen die Restexpression mit $26,1 \pm 8,4\%$ (CD9_1 siRNA) bzw. $12,0 \pm 6,5\%$ (CD9_7 siRNA) immer noch signifikant reduziert.

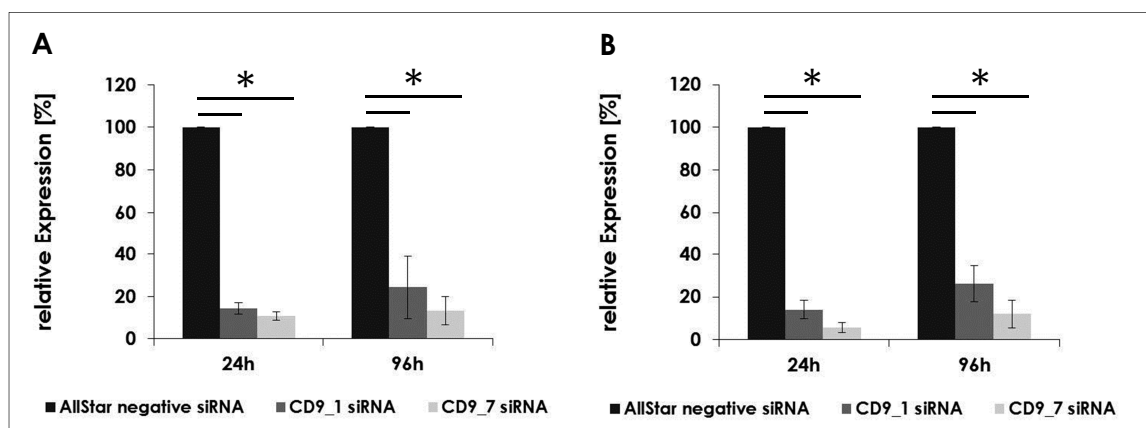


Abbildung 3.7.1.: Relative Expression von CD9 nach CD9 Knock-down bezogen auf mit AllStar negative siRNA transfizierte Zellen (100%) **A** in U343 MG und **B** in A172 Zellen. n=3, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung, $p < 0,001$.

Als nächstes wurde mittels eines MTT-Assay überprüft ob ein Knock-down von CD9 Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der Zellen hat. Als Kontrolle wurden AllStar negative siRNA transfizierte Zellen verwendet. Die anderen Werte wurden darauf nomiert.

Abbildung 3.7.2 zeigt die relative Stoffwechselaktivität von U343 MG Zellen (A) 24 h und 96 h nach dem Knock-down. Im Falle des Knock-downs mit der CD9_1 siRNA war eine leichte Verringerung der relativen Stoffwechselaktivität auf $84,3 \pm 14,2\%$ (24 h) bzw. $82,5 \pm 6,2\%$ (96 h) zu erkennen. Nach Knock-down mit der CD9_7 siRNA war kein Unterschied in der Stoffwechselaktivität zur Kontrolle ersichtlich. Die Werte lagen bei einer relativen Stoffwechselaktivität von $95,5 \pm 15,1\%$ (24 h) und $91,8 \pm 24,1\%$ (96 h). Diese beobachteten Unterschiede waren nicht signifikant ($P > 0,05$).

Im Falle der A172 Zellen (B) war ebenfalls zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der Stoffwechselaktivität der beiden Knock-down Zellen verglichen mit der Kontrolle (100%) zu erkennen ($P > 0,05$). Nach 24h lagen die Werte bei $103,1 \pm 16,2\%$ (CD_1 siRNA) und $92,4 \pm 10,6\%$ (CD9_7 siRNA) relative Stoffwechselaktivität und nach 96h bei $96,3 \pm 15,0\%$ (CD_1 siRNA) bzw. $95,6 \pm 20,9\%$ (CD9_7 siRNA).

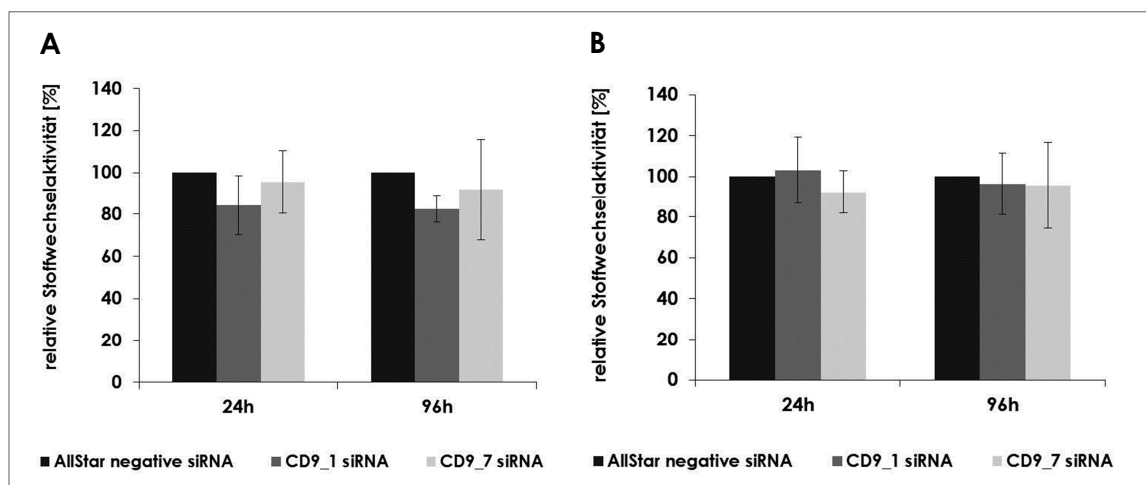


Abbildung 3.7.2.: Relative Stoffwechselaktivität nach CD9 Knock-down bezogen auf mit AllStar negative siRNA transfizierte Zellen (100%) **A** in U343 MG und **B** in A172 Zellen. n=3, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung, $p > 0,05$.

3.7.1 Migration nach CD9-Knock-down in Anwesenheit von PDGF-BB

Nach Etablierung des Knock-downs wurden Wundheilungsassays durchgeführt, um einen Einfluss von CD9 auf die Migration der verwendeten humanen Glioblastomzelllinien nachzuweisen. Zusätzlich wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von PDGF-BB stimuliert, um einen möglichen Einfluss des CD9 Knock-downs auf die Stimulation der PDGF-Rezeptoren zu überprüfen.

In Abbildung 3.7.1.1 sind die Ergebnisse des CD9 Knock-downs und der Stimulation mit PDGF-BB in U343 Zellen dargestellt. Im Falle der Zellen ohne PDGF-BB Stimulation war eine signifikante ($P < 0,05$) Verringerung der relativen Migration von 100% (AllStar negative siRNA transfizierte Zellen) auf $73,0 \pm 4,2\%$ nach Transfektion mit CD9_1 siRNA bzw. $66,1 \pm 9,6\%$ nach Transfektion mit CD9_7 siRNA zu beobachten. Zusätzlich konnte nach CD9 Knock-down keine Steigerung der Migration durch die Zugabe von PDGF-BB erzeugt werden. Bei den Kontrollzellen ohne CD9 Knock-down hingegen konnte die relative Migration durch Zugabe von PDGF-BB im Vergleich zur Kontrolle ohne PDGF (100%) signifikant ($P < 0,05$) gesteigert werden. In Anwesenheit von 1 ng/ml PDGF-BB lag die Migration bei $125,8 \pm 6,9\%$, mit 5 ng/ml PDGF-BB bei $146,8 \pm 15,8\%$, mit 20 ng/ml bei $147,8 \pm 15,8\%$ und mit 40 ng/ml bei $147,0 \pm 6,0\%$.

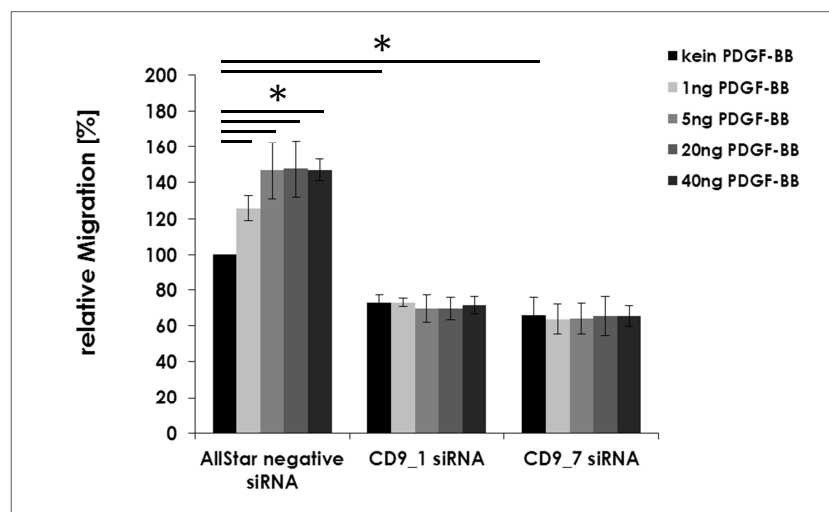


Abbildung 3.7.1.1: Relative Migration von U343 MG Zellen nach CD9 Knock-down mit und ohne PDGF-BB 48 h nach zufügen der Wunde. Als Kontrolle wurden mit AllStar negative siRNA transfizierte Zellen ohne PDGF-BB verwendet und auf 100% gesetzt. $n=3$, Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung, $p < 0,05$.

Im Unterschied zu den U343 MG Zellen konnte bei der Zelllinie A172 keine signifikante Steigerung der Migration nach Stimulation mit PDGF-BB nachgewiesen werden (Abbildung 3.7.1.2).

Zwar konnte auch hier eine Verringerung der Migration nach CD9 Knock-down beobachtet werden, diese war mit $87,5 \pm 3,8\%$ (CD9_1 siRNA) und $83,8 \pm 13,8\%$ (CD9_7 siRNA) allerdings deutlich geringer als bei den U343 MG Zellen und nicht signifikant.

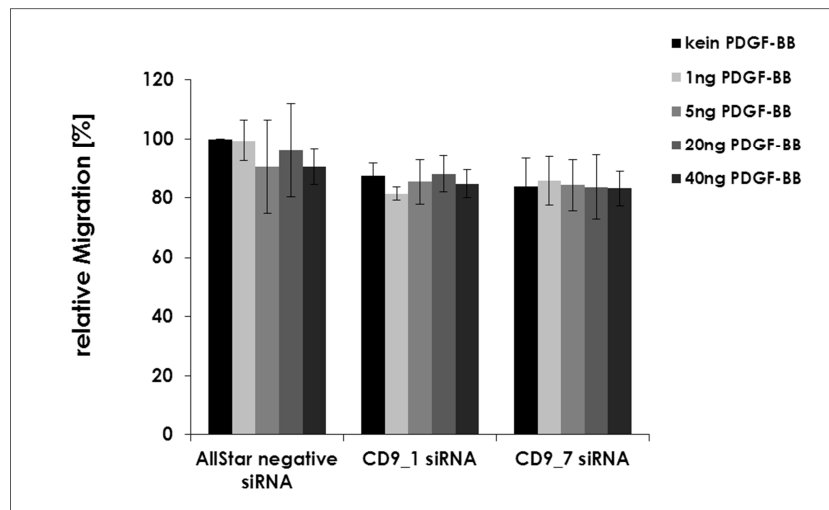


Abbildung 3.7.1.2: Relative Migration von A172 Zellen nach CD9 Knock-down mit und ohne PDGF-BB 48 h nach zufügen der Wunde. Als Kontrolle wurden mit AllStar negative siRNA transfizierte Zellen ohne PDGF-BB verwendet und auf 100% gesetzt. n=3, Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung, $p > 0,05$.

3.7.2 MTT-Assay nach CD9-Knock-down in Anwesenheit von PDGF-BB

Parallel zur Untersuchung der Migration wurden MTT-Assays durchgeführt, um die Stoffwechselaktivität der Zellen nach Knock-down und Stimulation mit PDGF-BB zu überprüfen. Dazu wurden AllStar negative siRNA, CD9_1 siRNA und CD9_7 siRNA transfizierte Zellen mit unterschiedlichen PDGF-BB Konzentrationen behandelt (1 ng/ml, 5 ng/ml, 20 ng/ml und 40 ng/ml). Als Kontrolle wurden jeweils unbehandelte Zellen zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h verwendet und die weiteren Werte wurden darauf nomiert.

Abbildung 3.7.2.1 zeigt die relative Stoffwechselaktivität der U343 MG Zellen. Zum Zeitpunkt 24 h nach Transfektion mit AllStar negative siRNA lag die

Stoffwechselaktivität zwischen $95,6 \pm 11,8\%$, nach Behandlung mit 1 ng/ml PDGF-BB, und $85,7 \pm 12,7\%$, nach Behandlung mit 40 ng/ml PDGF-BB, bezogen auf die Kontrolle ohne PDGF. Nach 48 h war die Stoffwechselaktivität nach Stimulation mit PDGF-BB teilweise verringert. Dies war der Fall nach Behandlung mit 1 ng/ml ($89,5 \pm 5,1\%$), 20 ng/ml ($83,1 \pm 10,7\%$) und 40 ng/ml PDGF ($80,9 \pm 3,9\%$). Nach Knock-down mit der CD9_1 siRNA konnten zum Zeitpunkt 24 h keine signifikanten Unterschiede in der Stoffwechselaktivität der Zellen beobachtet werden. Die Werte lagen zwischen $107,7 \pm 12,3\%$ (1 ng/ml) und $93,4 \pm 7,9\%$ (40 ng/ml). Auch nach 48 h konnte keine signifikante Veränderung der relativen Stoffwechselaktivität in Anwesenheit von PDGF-BB beobachtet werden. Im Falle der mit CD9_7 siRNA transfizierten Zellen konnte nach 24 h ebenfalls keine signifikante Änderung der Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden. Hier lagen die Werte zwischen $96,8 \pm 13,6\%$ (1 ng/ml) und $99,6 \pm 9,7\%$ (40 ng/ml). Zwar konnte hier nach 48 h eine Steigerung der Stoffwechselaktivität nach Zugabe von 20 ng/ml PDGF-BB auf $112,5 \pm 8,5\%$ und nach Zugabe von 40 ng/ml auf $113,1 \pm 9,6\%$ beobachtet werden, diese war aber nicht signifikant.

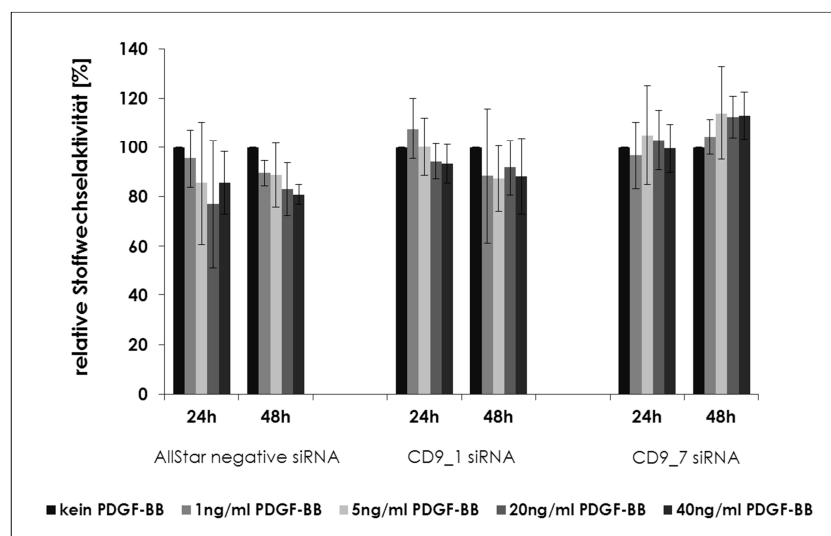


Abbildung 3.7.2.1: Relative Stoffwechselaktivität in U343 MG Zellen nach CD9 Knock-down in An- und Abwesenheit unterschiedlicher PDGF-BB Konzentrationen bezogen auf nicht PDGF-BB behandelte Zellen (100%). n=3, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung, $p > 0,05$.

Im Gegensatz zu den U343 MG Zellen, die zum Teil eine Verringerung der Stoffwechselaktivität nach Stimulation mit PDGF-BB zeigten, wurde die Stoffwechselaktivität der A172 Zellen entweder nicht beeinflusst (AllStar negative siRNA transfizierte Zellen) oder sie zeigte eine Steigerung nach Zugabe von PDGF (CD9_1 und CD9_7 siRNA transfizierte Zellen) (Abbildung 3.7.2.2).

Die mit AllStar negative siRNA transfizierten Kontrollzellen zeigten nach 24 h Behandlung mit PDGF-BB eine Stoffwechselaktivität zwischen $103,7 \pm 5,67\%$ (5 ng/ml) und $90,7 \pm 19,3\%$ (40 ng/ml) bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (100%). Damit war zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Änderung der Stoffwechselaktivität zu beobachten. Dies war auch nach 48 h der Fall. Hier lagen die Werte zwischen $96,6 \pm 8,6\%$ (1 ng/ml) und $105,7 \pm 13,1\%$ (40 ng/ml).

Bei den CD9_1 siRNA Knock-down Zellen war nach 24 h und nach 48 h eine Steigerung der relativen Stoffwechselaktivität zu beobachten. Nach 24 h lagen die Werte zwischen $122,6 \pm 18,3\%$ (1 ng/ml) und $122,3 \pm 10,5\%$ (40 ng/ml) bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (100%). Die deutlichste Steigerung der Stoffwechselaktivität war hier nach Zugabe von 5 ng/ml PDGF-BB zu beobachten ($128,7 \pm 8,3\%$). Nach 48 h lag die Stoffwechselaktivität nach Zugabe von PDGF-BB zwischen $118,0 \pm 16,9\%$ (1 ng/ml) und $121,4 \pm 0,3\%$ (40 ng/ml).

Auch im Falle der CD9_7 siRNA Knock-down Zellen war zum Teil eine Steigerung der Stoffwechselaktivität nach Zugabe von PDGF-BB zu beobachten. Nach 24 h war die Stoffwechselaktivität nach Behandlung mit 1 ng/ml ($115,3 \pm 3,9\%$), 5 ng/ml ($118,6 \pm 13,2\%$) und 20 ng/ml ($123,1 \pm 16,1\%$). Nach 48 h war die Stoffwechselaktivität bei allen PDGF-BB Konzentrationen verglichen zur unbehandelten Kontrolle erhöht. Die deutlichste Steigerung war nach Zugabe von 20 ng/ml ($126,3 \pm 15,1\%$) und 40 ng/ml PDGF-BB ($121,2 \pm 13,1\%$) zu erkennen.

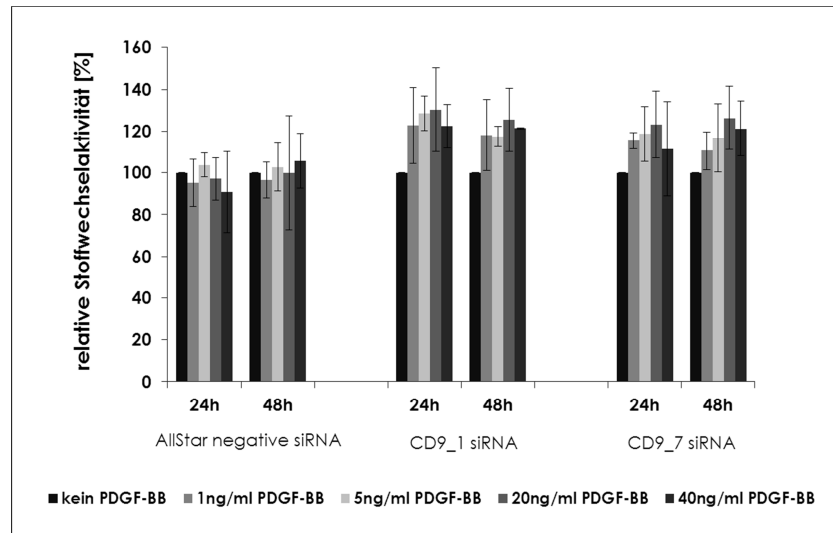


Abbildung 3.7.2.2: Relative Stoffwechselaktivität in A172 Zellen nach CD9 Knock-down in An- und Abwesenheit unterschiedlicher PDGF-BB Konzentrationen bezogen auf nicht PDGF-BB behandelte Zellen (100%). n=3, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung, $p > 0,05$.

3.8 PLA (*proximity ligation assay*)

Es ist bekannt, dass CD9 in den TEMs (*tetraspanin enriched microdomains*) der Zellmembran mit unterschiedlichen Proteinen und Rezeptoren interagiert. Unter anderem auch mit dem EGF Rezeptor (Murayama, Shinomura et al. 2008). Aufgrund des auf *Pvr* basierenden *Drosophila*-Modells in dem *cd9* als ein Kandidatengen gefunden wurde, lag die Vermutung nahe, dass CD9 ebenfalls mit einem oder mehreren der PDGF Rezeptoren eine Interaktion eingehen kann. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde die PLA als geeignete Methode ausgewählt (siehe Kapitel 2.5.1). Mit dieser Methode können Proteininteraktionen bzw. sehr enge räumliche Nähe zweier Proteine durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Dabei entstehen durch Verstärkung der einzelnen Fluoreszenzsignale rotfluoreszierende Punkte, die jeweils für ein detektiertes Signal stehen. Um die Lokalisation dieser roten Signale besser erkennen zu können wurden die Membranen der Zellen mittels des Farbstoffs DiO grün angefärbt und die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das PLA-Kit von Olink verwendet (Kapitel 2.5.1). Dieses enthält als proximity probes Sekundärantikörper gegen Maus und Kaninchen. Als Negativkontrolle dient bei der PLA normalerweise nur ein PLA-Ansatz in dem einer der Primärantikörper weg gelassen wird. Damit kann ein falsch-positives Signal aufgrund von unspezifischen Bindungen eines der verwendeten Antikörper ausgeschlossen werden (OlinkBioscience www.olink.com). Zusätzlich wurde hier noch eine weitere Negativkontrolle durchgeführt. Dazu wurden Antikörper gegen die membranständigen Proteine CD9 und Catherin 11 (CDH11) eingesetzt.

Abbildung 3.8.1 zeigt die bei allen durchgeführten PLAs verwendeten biologische Positiv- und Negativkontrollen. Für die Positivkontrolle wurden Antikörper gegen β -Catenin und CDH11 verwendet, da bei diesen beiden Proteinen bereits mit anderen Methoden eine Interaktion nachgewiesen werden konnte (Mertsch, persönliche Kommunikation). Diese Positivkontrolle zeigte in beiden Zelllinien ein deutliches Signal (B und D). Für die Negativkontrolle wurden, wie oben beschrieben, Antikörper gegen CD9 und CDH11 verwendet. Beide Proteine liegen in der Zellmembran, es konnte aber keine Interaktion nachgewiesen werden. Diese Negativkontrolle zeigte in keiner

der beiden Zelllinien ein PLA-Signal (A und C). Zusätzlich wurden alle verwendeten Antikörper alleine, ohne Antikörper gegen einen potentiellen Interaktionspartner, in einer PLA eingesetzt. Keiner der Antikörper zeigte dabei ein Signal (Daten nicht gezeigt). Somit konnten unspezifische Signale für alle Antikörper ausgeschlossen werden.

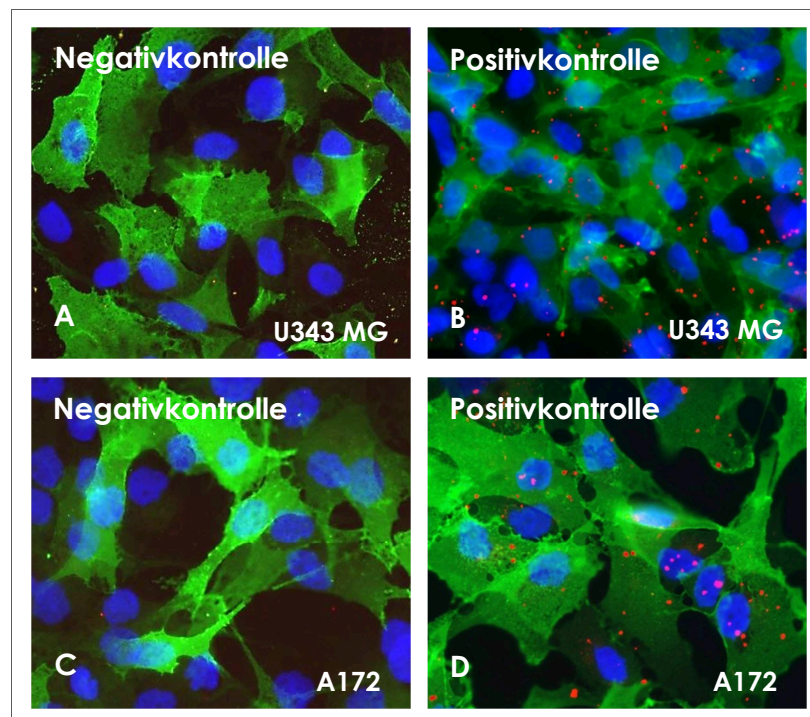


Abbildung 3.8.1: Biologische Negativkontrolle: CD9 Antikörper [EPR2949] (1:100) + CDH11 Antikörper (1:100) und Positivkontrolle für die PLA: β -Catenin Antikörper (1:100) + CDH11 (1:100) **A** und **B** U343 MG, **C** und **D** A172. Membranfärbung mit DiO (grün), Kernfärbung mit DAPI (blau), PLA-Signal (rot). 40-fache Vergrößerung.

Als nächstes wurden A172 und U343 MG Zellen auf eine potentielle Interaktion von CD9 mit PDGFR α und β getestet (Abbildung 3.8.2 A und B). In U343 MG Zellen konnte mit Antikörpern gegen beide PDGF-Rezeptoren in Verbindung mit CD9 ein deutliches PLA-Signal detektiert werden. In dem Ansatz mit Antikörpern gegen CD9 und PDGFR α war das Signal am stärksten (A).

Auch in der Zelllinie A172 konnte mit beiden Antikörperkombinationen ein PLA-Signal erzeugt werden (Abbildung 3.8.2 C und D). Hier wurde im Ansatz mit CD9 und PDGFR β Antikörpern das stärkere PLA-Signal detektiert. Allerdings war dieses bei beiden Antikörperkombinationen schwächer als das Signal in U343 MG Zellen mit Antikörpern gegen CD9 und PDGFR α .

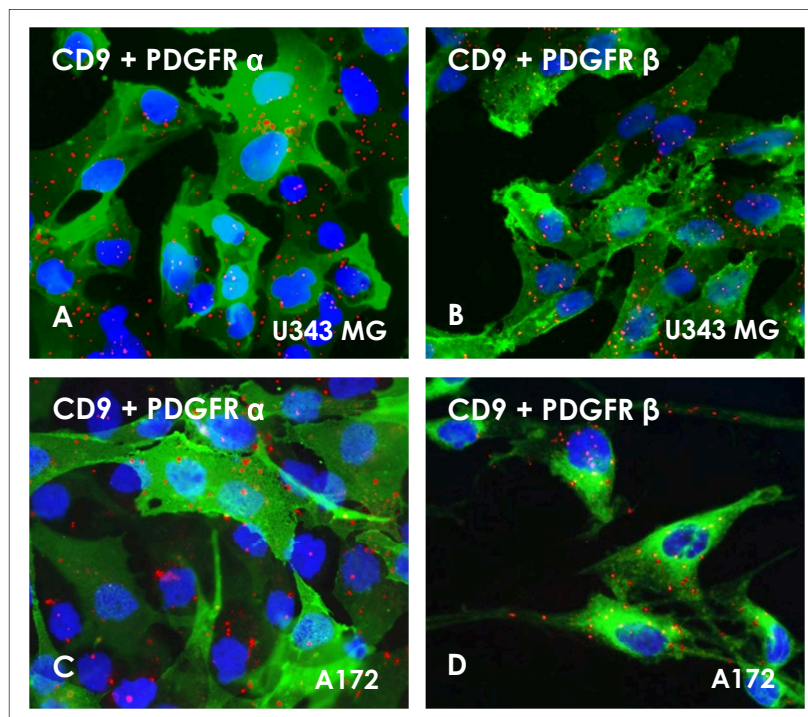


Abbildung 3.8.2: PLA mit CD9 und PDGFR α/β an U343 MG (**A** und **B**) und A172 (**C** und **D**) Zellen (CD9 Antikörper [EPR2949] Kaninchen monoklonal (1:100), PDGFR α Antikörper [BM028] Maus monoklonal (1:100) und PDGFR β Antikörper [PDGFR-B2] Maus monoklonal (1:100). Membranfärbung mit DiO (grün), Kernfärbung mit DAPI (blau), PLA-Signal (rot). 40-fache Vergrößerung.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen wurde die PLA mit anderen Antikörpern gegen CD9 (72F6), PDGFR α (#3164) und PDGFR β (28E1) wiederholt. Die dazu verwendeten Antikörper gegen die PDGF-Rezeptoren waren bereits vorher im Rahmen von immunhistologischen Färbungen an Paraffinschnitten etabliert worden. Der CD9 Antikörper wurde mittels Immunfluoreszenz etabliert.

Auch mit dieser Antikörperkombination konnte in beiden Zelllinien jeweils ein PLA-Signal für CD9 mit PDGFR α und β detektiert werden (Abbildung 3.8.3). Die Intensität der Signale entsprach ebenfalls den Ergebnissen der ersten PLA. So konnte auch hier das stärkste Signal in U343 MG Zellen unter Verwendung der Antikörper gegen CD9 und PDGFR α detektiert werden (Abbildung 3.8.3 A).

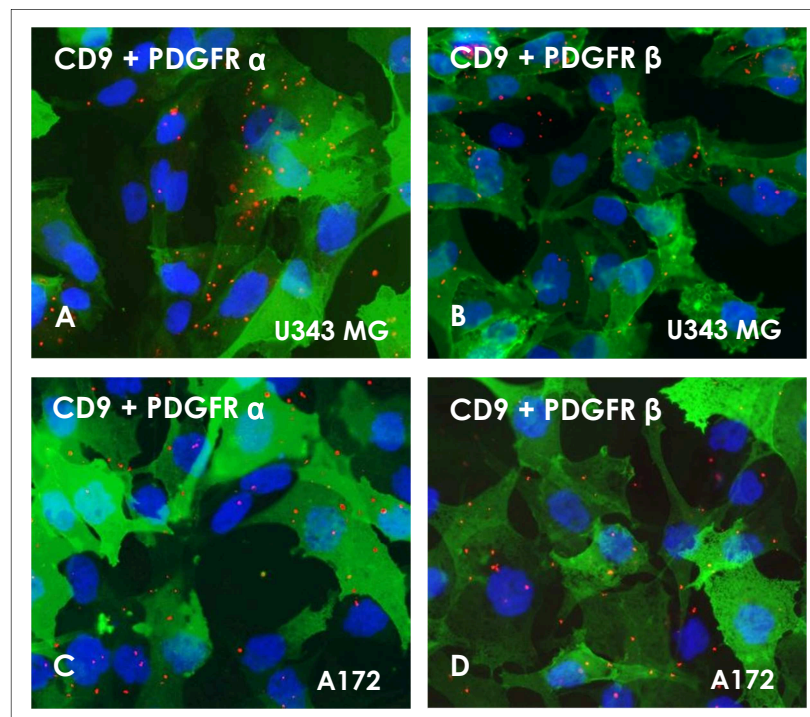


Abbildung 3.8.3: PLA mit CD9 und PDGFR α/β an U343 MG (**A** und **B**) und A172 (**C** und **D**) Zellen (CD9 Antikörper [72F6] Maus monoklonal (1:100), PDGFR α Antikörper [#3164] Kaninchen monoklonal (1:100) und PDGFR β Antikörper [28E1] Kaninchen monoklonal (1:100)). Membranfärbung mit DiO (grün), Kernfärbung mit DAPI (blau), PLA-Signal (rot). 40-fache Vergrößerung.

4. Diskussion

4.1 Identifikation von Kandidaten in einem Glioblastom-Modell

Migration von Zellen ist ein essentieller Schritt während der Entwicklung des Nervensystems bei Vertebraten wie auch Invertebraten. Hierbei wird die Migration häufig durch die Aktivierung von PDGF-Rezeptoren ausgelöst. Mit dem hier verwendeten *Drosophila*-Modell war es möglich den Einfluss der PDGF-Rezeptor Aktivierung auf die Migration von retinalen Gliazellen in *Drosophila melanogaster* zu untersuchen (Witte, Jeibmann et al. 2009).

Dazu wurde ein Fliegenstamm mit einem konstitutiv aktiven *Pvr*, des Fliegenhomologes der humanen PDGF- und VEGF-Rezeptoren, hergestellt. Dieser Rezeptor ist in der Fliege an einer Reihe migratorischer Prozesse beteiligt (Cho, Keyes et al. 2002; Wood, Faria et al. 2006; Learte, Forero et al. 2008; Janssens, Sung et al. 2010). Unter anderem beeinflusst *Pvr* in der Fliege die Migration von Zellen des Ovars durch Einflussnahme auf das Aktingerüst (Duchek, Somogyi et al. 2001; Fulga und Rorth 2002; Rosin, Schejter et al. 2004; Wang, Bo et al. 2006).

Durch die konstitutive Aktivierung des *Pvr* in diesen Fliegen, kommt es zu einer verstärkten Migration von Gliazellen. Dies ist verbunden mit der Entstehung eines tumorähnlichen Phänotyps und der Letalität der Fliegen im dritten Larvenstadium (Watson, Justice et al. 1994; Bier 2005; Vidal und Cagan 2006; Witte, Jeibmann et al. 2009). Humane PDGF-Rezeptoren spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems. Des Weiteren kommt es in Glioblastomen häufig zu einer Überexpression des PDGFR α und seiner Liganden (Dai, Celestino et al. 2001; Hoch und Soriano 2003; Jones und Cross 2004; Shih und Holland 2006). Aufgrund dessen eignet sich dieses *Drosophila*-Modell als Modellsystem zur Erforschung humaner Glioblastome.

Um mehr über Modulationen von auf *Pvr* basierenden Signalwegen zu erfahren wurde in dem oben beschriebenen *Drosophila*-Modell ein siRNA-Screen durchgeführt. Wie bereits erwähnt zeigten die für den Screen verwendeten Fliegen einen tumorähnlichen Phänotyp und starben im dritten Larvenstadium. Bei diesem siRNA-Screen wurden mehrere Proteine identifiziert, deren Knock-

down nicht nur zu einer Verlängerung der Überlebensdauer der Fliegen führte, sondern auch zu einer Rettung des Phänotyps (Kim et al., persönliche Kommunikation).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels der Blast-Software des *National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) humane Homologe für zwei dieser Kandidaten gesucht. Im Fall von DmLOXL-1 konnte durch Blast auf Proteinebene, mit einem E-Wert von $8 \cdot 10^{-70}$, das humane Protein LOXL4 als direktes Homolog identifiziert werden. Aufgrund der großen Ähnlichkeit von DmLOXL-1 mit allen fünf humanen LOX-Proteinen (LOX 48%, LOXL1 50%, LOXL2 48%, LOXL3 49% und LOXL4 53%) (Molnar, Ujfaludi et al. 2005) wurden neben LOXL4 auch noch zwei weitere Mitglieder der LOX-Familie (LOX und LOXL1) untersucht.

Im Fall des Fliegenproteins TSP2A konnte kein direktes humanes Homolog identifiziert werden. Daher wurde ein TSP2A ähnliches Protein aus der Familie der humanen Tetraspanine ausgewählt. Dieses Protein zeigte im Blast einen E-Wert von $4 \cdot 10^{-14}$ und wurde bereits mit Malignität und gesteigerter Migrationsfähigkeit einiger Tumoren in Verbindung gebracht (Kawashima, Dohura et al. 2002; Lafleur, Xu et al. 2009; Fan, Zhu et al. 2010; Soyuer, Soyuer et al. 2010). Des Weiteren scheint es mit einer schlechteren Prognose bei unterschiedlichen Gehirntumoren verbunden zu sein (Rembrandt <http://rembrandt.nci.nih.gov>).

4.2 Lysyloxidasen

4.2.1 Expression von LOX, LOXL1 und LOXL4 in Glioblastomen und Glioblastomzelllinien

Die Proteine der LOX-Familie spielen eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung. So kommt es in LOX Knock-out Mäusen zu einer gestörten Entwicklung der Gefäßwände und dadurch zum Tod der Tiere kurz nach der Geburt (Hornstra, Birge et al. 2003). Des Weiteren zeigen diese Tiere eine Unterentwicklung der Atemwege (Mäki, Sormunen et al. 2005).

Neben ihrer Rolle bei der embryonalen Entwicklung sind die LOX-Proteine auch an der Entstehung von Tumoren und der Bildung von Metastasen beteiligt (Kirschmann, Seftor et al. 2002; Görögh, Weise et al. 2007; Payne, Hendrix et al. 2007; Eler und Weaver 2009; Sakai, Kato et al. 2009). Auch in anaplastischen Astrozytomen konnte eine erhöhte Expression von LOX nachgewiesen werden (Laczko, Szauter et al. 2007). In Glioblastomen wurde unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Expression von LOX auf RNA-Ebene beobachtet (Bar, Lin et al. 2010). Ansonsten ist bis heute nur wenig über die Expression der LOX-Proteine in Glioblastomen bekannt.

In dieser Arbeit kann, auf RNA- und Proteinebene, eine Hochregulation von LOX, LOXL1 und LOXL4 in Glioblastomen im Vergleich zu unauffälligem Gehirn gezeigt werden. Während auf RNA-Ebene die Expression von LOX und LOXL1 in fast allen Proben deutlich höher ist als die LOXL4 Expression, kann dieses Ergebnis auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Hier ist die Expression aller drei Proteine sehr ähnlich. Die starken Schwankungen in der Expression zwischen den einzelnen Glioblastomen beruht wahrscheinlich auf der unter 1.2 beschriebenen Heterogenität dieser Tumoren. Auch in den zwei verwendeten humanen Glioblastomzelllinien kann auf RNA- und Proteinebene eine Überexpression aller drei Proteine, verglichen mit unauffälligem humanem Kortex und Marklager, nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Beobachtung einer Überexpression der LOX-Proteine in einer Reihe von Tumorerkrankungen (Kirschmann, Seftor et al. 2002; Görögh, Weise et al. 2007; Baker, Cox et al. 2010). So exprimieren stark invasive Brustkrebszelllinien mehr LOX und LOXL1-4 als nicht invasive Brustkrebszelllinien (Kirschmann, Seftor et al. 2002). Bei kolorektalen Tumoren ist eine erhöhte Expression von LOX mit

der Bildung von Metastasen assoziiert (Baker, Cox et al. 2010). Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die erhöhte Expression von Lysyloxidasen in einigen Tumoren unmittelbar mit der Migration der Tumorzellen in Verbindung steht. Durch die in dieser Arbeit bestätigte erhöhte Expression von LOX, LOXL1 und LOXL4 in Glioblastomzellen, liegt die Annahme nahe, dass Lysyloxidasen auch hier an der Migration beteiligt sein können.

4.2.2 Rolle von LOXL4 bei der Migration von Glioblastomzelllinien

Lysyloxidasen spielen nicht nur eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung (Hornstra, Birge et al. 2003; Mäki, Sormunen et al. 2005), sondern sie sind auch an der Entstehung unterschiedlicher Krankheitsbilder beteiligt.

So führt eine verringerte LOX-Expression zu Erkrankungen des Bindegewebes (Cutis laxa) (Smith-Mungo und Kagan 1998). Bei einer zu hülsenfrüchte-reichen Ernährung kommt es, durch den darin enthaltenen natürlichen LOX-Inhibitor BAPN, zur Entstehung von Lathyrismus (Paschalis, Tatakis et al. 2011). Diese Erkrankung führt unter anderem zur Änderung der Knochenstruktur und -stärke (El Rouby, Bashir et al. 2008; Turecek, Fratzl-Zelman et al. 2008; Paschalis, Tatakis et al. 2011). Des Weiteren werden LOX und einige LOXL-Proteine, wie bereits oben beschrieben, mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen in Zusammenhang gebracht (Kirschmann, Seftor et al. 2002; Görögh, Weise et al. 2007; Sebban, Davidson et al. 2009).

Im oben beschriebenen *Drosophila*-Modell (Kapitel 4.1) führt der Knock-down des Fliegenhomologs von LOXL4 (DmLOXL1) zu einer Verringerung der erhöhten Migration von Gliazellen (Kim et al., persönliche Kommunikation). Auch in den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen Glioblastomzelllinien löst ein Knock-down von LOXL4 *in vitro* eine signifikante Reduktion der Migration aus. Durch gleichzeitige Kontrolle der relativen Stoffwechselaktivität kann eine Beeinflussung der Migration durch Verringerung der Stoffwechselaktivität bzw. Proliferation der Knock-down Zellen im Vergleich zur Kontrolle ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis bestätigt somit eine entscheidende Rolle von LOXL4 bei der Migration von Glioblastomzelllinien *in vitro* und steht im Einklang mit der bereits bei anderen Tumorerkrankungen beobachteten migrationsfördernden Wirkung der Lysyloxidasen (Kirschmann, Seftor et al. 2002).

4.2.3 Einfluss von LOXL4 auf die PDGF-Rezeptoren

Lysyloxidasen stehen in Verdacht eine Reihe von Membranproteinen zu oxidieren. Darunter auch die PDGF-Rezeptoren. Dabei scheint besonders die Oxidation der Lysylreste an der D2 Domäne der Rezeptoren Einfluss auf die Affinität der Rezeptor-Liganden-Bindung zu haben (Shim, Liu et al. 2010). In *vascular smooth muscle cells* konnte durch Inhibition von LOX mittels BAPN eine Verringerung der Bindung von PDGF-BB an den PDGFR β erreicht werden (Lucero, Mäki et al. 2011).

Auch im Rahmen dieser Arbeit kann ein Einfluss von LOXL4 auf die PDGF-Rezeptor vermittelte Migration von Glioblastomzelllinien gezeigt werden. In der Zelllinie U343 MG kann durch Zugabe von PDGF-BB eine Steigerung der Migration erzeugt werden. Diese Steigerung kann in beiden Wundheilungsassays (LOXL4 und CD9 Knock-down) nach Transfektion mit AllStar negative siRNA und Stimulation mit PDGF-BB beobachtet werden. Im Fall der Zellen die als Kontrolle in den Migrations-Assays nach LOXL4 Knock-down dienten ist diese Steigerung nur nach Stimulation mit 40ng/ml PDGF-BB signifikant. Dies beruht vermutlich auf der schlechteren Bildqualität der zu diesem Zeitpunkt für die Dokumentation verwendeten Kamera. Im Zusammenhang mit der Verwendung der analysis Software zur Auswertung dieser Versuche führte dies zu starken Schwankungen der Werte. Deshalb kann hier nur eine Tendenz in Richtung Steigerung der Migration in Anwesenheit von PDGF-BB beobachtet werden. Bei der AllStar negative Kontrolle die im Rahmen der Migrations-Assays nach CD9 Knock-down verwendet wurde konnte eine signifikante Steigerung der Migration nach Stimulation mit allen verwendeten PDGF-BB Konzentrationen gezeigt werden. Dieser Unterschied resultiert vermutlich aus der Kombination einer moderneren Kamera zur Dokumentation der Migration und der seit kurzer Zeit im Institut verwendeten neuen Software zur Auswertung dieser Versuche (TScratch Software der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich).

Nach Knock-down von LOXL4 in diesen Zellen (U343 MG) kann jedoch keine Steigerung der Migration nach Stimulation mit PDGF-BB beobachtet werden. Im Falle der A172 Zellen ist hingegen nach Stimulation mit PDGF-BB weder mit noch ohne Knock-down von LOXL4 eine Änderung der Migration zu erkennen.

Eine Erklärung für diese stark voneinander abweichenden Ergebnisse könnten die unterschiedliche Ausstattung der beiden Zelllinien mit PDGF Rezeptoren sein. Während die U343 MG Zellen mehr PDGFR α als β exprimieren, exprimieren A172 Zellen mehr PDGFR β . Diese Ergebnisse könnten somit darauf hinweisen, dass die Migration von Glioblastomzelllinien hauptsächlich über PDGFR α vermittelt wird.

4.2.4 Einfluss von Lysyloxidasen auf die Extrazelluläre Matrix

Eine weitere Möglichkeit wie Lysyloxidasen die Migration von Zellen beeinflussen können, ist ihre Aufgabe beim Aufbau der ECM. Durch Oxidation der löslichen Vorläuferstufen entstehen kovalente Bindungen zwischen den ECM Komponenten und somit die fibriläre Struktur der ECM (Trackman, Bedell-Hogan et al. 1992; Smith-Mungo und Kagan 1998; Kagan und Li 2003; Thomassin, Werneck et al. 2005; Lucero und Kagan 2006). Die durch verstärkte Expression von Lysyloxidasen entstehende Versteifung der ECM führt bei Tumoren in Brust und Kolon zu einer gesteigerten Migration der Tumorzellen (Levental, Yu et al. 2009; Baker, Cox et al. 2010) und steht häufig in Zusammenhang mit gesteigerter Malignität und Metastasenbildung (Paszek, Zahir et al. 2005; Krdija, Schmid et al. 2010). Die Festigkeit und Struktur der ECM ist ein wichtiger Faktor bei der Migration von Zellen. So bevorzugen migrierende Zellen eine eher steife Struktur der ECM (Sheetz, Felsenfeld et al. 1998; Moore, Roca-Cusachs et al. 2010).

β -Aminopropionitril (BAPN) ist ein natürlich vorkommender, irreversibler Inhibitor für LOX, LOXL1, LOXL3 und LOXL4 (Waddell, Wilk et al. 1974; Martin, Sosa-Melgarejo et al. 1991; Smith-Mungo und Kagan 1998; Payne, Hendrix et al. 2007). BAPN kann über die Nahrung aufgenommen werden und ist im Stande die Blut-Hirn Schranke zu überwinden (Martin, Sosa-Melgarejo et al. 1991). In zu hohen Mengen führt BAPN zu Lathyrismus (Paschalis, Tatakis et al. 2011) (siehe 4.2.2). In geringeren Dosen verabreicht, kann BAPN die Metastasenbildung von Brustkrebszellen im Maus-Modell verringern (Bondareva, Downey et al. 2009).

In den für diese Arbeit durchgeführten *in vitro* Versuchen ist kein Einfluss von BAPN auf die Migration von U343 MG, A172 und C6-SP-GFP Zellen zu erkennen. Zwar wurden die für das Monolayer Migrations-Assay verwendeten

Zellkulturplatten mit Matrigel beschichtet, um eine möglichst ECM-ähnliche Umgebung für die Zellen zu schaffen, dennoch ist es nicht ohne Weiteres möglich die komplexe Zusammensetzung der Umgebung, die migrierende Zellen im Gehirn vorfinden, *in vitro* nach zu empfinden. Des Weiteren ähnelt das hier verwendete Matrigel einer bereits fertig vernetzten ECM und kann die sich ständig im Umbau befindlichen Bedingungen *in vivo* nicht ersetzen.

In den *in vivo* Versuchen mit BAPN ist hingegen eine deutliche Verringerung der Migration nach Behandlung mit BAPN zu erkennen. Während die unbehandelten Tumoren der Kontrollgruppe die typische Infiltrationszone im Außenbereich des Tumors erkennen lassen, sind die mit BAPN behandelten Tumoren deutlicher vom umliegenden Gewebe abgegrenzt. Die durchschnittlich größere Gesamtmasse des soliden Tumoranteils bei den BAPN behandelten Tumoren lässt sich durch die unveränderte Proliferation erklären. Die BAPN behandelten Tumoren zeigen eine mit den unbehandelten Tumoren vergleichbare Proliferation, aber eine geringere Migration. Dies muss zwangsläufig zu der hier beobachteten Vergrößerung des soliden Tumoranteils bei den BAPN behandelten Tumoren, im Vergleich zu der mit PBS behandelten Kontrolle, führen.

Während in Zellen des *oral squamous cell carcinoma* nach LOX Überexpression eine Steigerung der Proliferation und nach Inhibition eine Verringerung der Proliferation beobachtet wird (Shih, Chang et al. 2012), konnte in den hier durchgeführten Versuchen weder *in vitro* noch *in vivo* ein Einfluss von BAPN auf die Proliferation beobachtet werden.

Im *Drosophila*-Modell ist die Festigkeit der ECM nach LOX Knock-down signifikant verringert (SuNa Kim, persönliche Kommunikation). Über die Festigkeit der ECM in den hier durchgeführten *in vivo* Versuchen kann keine Aussage getroffen werden, da die im *Drosophila*-Modell verwendeten Methoden zur Festigkeitsbestimmung (*atomic force microscopy*, AFM) in diesem Versuchsaufbau nicht durchgeführt werden können.

Dennoch weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die LOX-Proteine einen Ansatzpunkt für neue Therapien in der Behandlung von Glioblastomen liefern können, da sie eine essentielle Rolle bei der Migration von Glioblastomzellen zu spielen scheinen. Eine Inhibition der LOX-Proteine, wie sie mittels BAPN zu erzielen ist, könnte zu einer geringeren Ausdehnung der Infiltrationszone führen

und somit die Resektion der Tumoren verbessern. Dadurch und durch eine weiterführende Behandlung mit einem solchen LOX-Inhibitor könnte die Prognose von Glioblastompatienten verbessert werden.

4.3 CD9

4.3.1 Expression von CD9 in Glioblastomen und Glioblastomzelllinien

CD9 gehört zur Familie der Tetraspanine (Hemler 2008) und wird in unterschiedlicher Stärke in fast allen menschlichen Geweben exprimiert (Sincock, Mayrhofer et al. 1997; Yubero, Jimenez-Marin et al. 2010). Seine Rolle in Tumorerkrankungen ist ambivalent. In einigen Tumoren führt eine niedrige Expression von CD9 zur Verringerung der Lebensdauer (Miyake, Nakano et al. 1995; Huang, Kohno et al. 1998; Sho, Adachi et al. 1998; Saito, Tachibana et al. 2006; Ovalle, Gutiérrez-López et al. 2007). Während in anderen Tumorerkrankungen eine erhöhte CD9-Expression mit der Verschlechterung der Prognose assoziiert ist (Erovcic, Pammer et al. 2003; Nakamoto, Murayama et al. 2009; Kohmo, Kijima et al. 2010). In astrozytären Tumoren korreliert die CD9-Expression mit der Malignität (Kawashima, Doh-ura et al. 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit kann eine erhöhte Expression von CD9 auf RNA- und Proteinebene in Glioblastomen und Glioblastomzelllinien bestätigt werden. In den getesteten Glioblastombiopsaten ist auf RNA-Ebene eine Hochregulation von CD9 im Vergleich zu unauffälligem humanem Kortex zu sehen. Die Expression von CD9 im Marklager ist hingegen deutlich höher als im Kortex und den getesteten Glioblastomen. Dies beruht auf der hohen Expression von CD9 in Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen (Terada, BaracsKay et al. 2002). Auch auf Proteinebene ist CD9 in einem Großteil der getesteten Glioblastome nachweisbar.

In fünf von sechs (83%) der untersuchten humanen Glioblastomzelllinien kann ebenfalls eine Hochregulation von CD9 auf RNA-Ebene im Vergleich zum Kortex beobachtet werden. Auch auf Proteinebene kann CD9, mittels Western Blot, in Glioblastombiopsaten und Glioblastomzelllinien nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse bestätigen somit die bereits beschriebene Expression von CD9 in Glioblastomen (Kawashima, Doh-ura et al. 2002; Kolesnikova, Kazarov et al. 2009).

4.3.2 Rolle von CD9 bei der Migration von Glioblastomzelllinien

Tetraspanine sind Membranproteine. Sie bilden auf der Zelloberfläche sogenannte *tetraspanin enriched microdomains* (TEMs) in denen sie untereinander und mit anderen Oberflächenproteinen Interaktionen eingehen (Berditchevski 2001; Sridhar und Miranti 2006; Murayama, Shinomura et al. 2008). Auf diesem Weg dienen sie als eine Art Vermittler zwischen unterschiedlichen Proteinen und Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Somit sind sie an einer Reihe von Prozessen wie Adhäsion, Migration und Signalweiterleitung beteiligt (Maecker, Todd et al. 1997; Baudoux, Castanares-Zapatero et al. 2000; Shi, Fan et al. 2000; Berditchevski 2001).

CD9 wird, in *in vitro* Versuchen, bereits seit mehreren Jahren immer wieder mit der Migration von unterschiedlichen Zelltypen in Verbindung gebracht (Heagy, Duca et al. 1995; Sincock, Fitter et al. 1999; Baudoux, Castanares-Zapatero et al. 2000; Klein-Soyer, Azorsa et al. 2000; Penas, Garcia-Diez et al. 2000). So führt z.B. in humanen Gefäßendothelzellen die Inhibition von CD9 zu einer Verringerung der Migration (Klein-Soyer, Azorsa et al. 2000).

In einigen Tumoren führt eine erhöhte Expression von CD9 zu einer Verringerung der Metastasenbildung und Verlängerung der Lebensdauer (Mhawech, Dulguerov et al. 2004; Murayama, Shinomura et al. 2008; Woegerbauer, Thurnher et al. 2010). Auf der anderen Seite wird eine gesteigerte Expression von CD9 in Tumoren mit verstärkter Migration, Tumorigenität und Chemoresistenz in Verbindung gebracht (Kohmo, Kijima et al. 2010; Yamazaki, Xu et al. 2011; Hwang, Jo et al. 2012). Der Einfluss von CD9 auf die Proliferation scheint vom Zelltyp abhängig zu sein. Während die Inhibition von CD9 in Tumorzellen des Gastrointestinaltraktes zu verstärkter Proliferation führt (Murayama, Shinomura et al. 2008), ist in humanen Gefäßendothelzellen nach CD9 Knock-down keine Veränderung der Proliferation zu erkennen (Klein-Soyer, Azorsa et al. 2000). Die Ergebnisse der hier durchgeführten CD9 Knock-down Versuche zeigen

ebenfalls keinen Einfluss auf die Proliferation der verwendeten humanen Glioblastomzelllinien und entsprechen somit den Ergebnissen von Klein-Soyer.

Im Wundheilungs-Assay hingegen kann, zumindest in einer der verwendeten Zelllinien, ein deutlicher Einfluss von CD9 auf die Migration gezeigt werden. Nach Knock-down von CD9 ist die Migration in U343 MG Zellen deutlich reduziert. Obwohl in beiden verwendeten humanen Glioblastomzelllinien ein ähnlich starker, signifikanter Knock-down von CD9 auf RNA-Ebene zu beobachten ist, kann im Falle der A172 keine eindeutige Reduktion der Migration beobachtet werden.

Grund für die Verringerung der Migration von U343 MG nach CD9 Knock-down könnte die bereits in mehreren Zelllinien beschriebene Interaktion von CD9 mit verschiedenen Integrinen sein (Rubinstein, Le Naour et al. 1994; Nakamura, Iwamoto et al. 1995; Pellinen, Rantala et al. 2011). Integrine sind, wie CD9 auch, Oberflächenproteine und spielen eine entscheidende Rolle bei der Interaktion von Zellen mit ihrer Umgebung (Gahmberg, Fagerholm et al. 2009). Gerät die Aktivierung der Integrine aus dem Gleichgewicht kann es zu einer Begünstigung des Tumorwachstums und der Migration kommen (Desgrosellier und Cheresh 2010). Die Interaktion von CD9 mit Integrinen führt zu deren Aktivierung und verstärkter Migration (Pellinen, Rantala et al. 2011).

4.3.3 Einfluss von CD9 auf die PDGF-Rezeptoren

Eine weitere Möglichkeit wie CD9 die Migration von Zellen begünstigen kann, ist die Interaktion von CD9 mit Membranrezeptoren. Es wurde bereits eine Interaktion von CD9 mit FcγR auf Makrophagen in der Maus nachgewiesen (Kaji, Takeshita et al. 2001) und eine Interaktion von CD9 mit dem Vorläufer des *heparin-binding EGF-like growth factors*, die zu dessen Aktivierung führt (Higashiyama, Iwamoto et al. 1995).

Bei Tumoren des Gastrointestinaltrakts geht die Hochregulation von CD9 mit einer verbesserten Prognose einher. Dies beruht vermutlich teilweise auf der beobachteten Interaktion von CD9 mit dem EGF-Rezeptor. Durch diese Interaktion kommt es nach Bindung des Liganden (EGF) zu einer schnelleren Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes. Dadurch wird die

Aktivierungszeit des Rezeptors verkürzt und es kommt zu einer Verringerung der Proliferation und des Überlebens von Tumorzellen des Gastrointestinaltraktes (Murayama, Shinomura et al. 2008).

Zwar ist bis heute in der Literatur keine Interaktion von CD9 mit PDGF-Rezeptoren bekannt, sie kann bis jetzt aber auch nicht ausgeschlossen werden. Das dieser Arbeit zugrunde liegende *Drosophila*-Modell beruht auf Fliegen mit einem konstitutiv aktiven Fliegenhomolog der PDGF-Rezeptoren. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die in diesem Modell identifizierten Gene entweder direkt oder indirekt über verschiedene Signalwege in Verbindung mit den PDGF-Rezeptoren stehen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte, wie bereits unter 4.3 beschrieben, eine Steigerung der Migration von U343 MG Zellen durch Stimulation mit PDGF-BB gezeigt werden. Nach CD9 Knock-down kann hingegen keine Steigerung der Migration durch Stimulation mit PDGF-BB beobachtet werden. Dies könnte auf eine Interaktion von CD9 mit einem oder beiden der PDGF-Rezeptoren hinweisen.

Wie bereits oben beschrieben (Kapitel 4.3.2) ist auch ohne Stimulation der Zellen mit PDGF-BB ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden verwendeten Zelllinien zu erkennen. Während in U343 MG Zellen nach CD9 Knock-down eine signifikante Reduktion der Migration zu sehen ist, kann die Migration in A172 Zellen nur unwesentlich durch einen Knock-down von CD9 verringert werden. Eine Erklärung für die deutlich voneinander abweichenden Ergebnisse, könnte die unterschiedliche Ausstattung der verwendeten Zelllinien mit PDGF-Rezeptoren sein. Während die Zelllinie mit einem höheren Anteil an PDGFR α (U343 MG) einen sehr deutlichen Einfluss von CD9 auf die Migration zeigt ist dieser bei der Zelllinie mit einem höheren Anteil an PDGFR β (A172) nicht zu beobachten. Es ist möglich, dass die Migration von Glioblastomzelllinien hauptsächlich über PDGFR α und weniger oder gar nicht über PDGFR β vermittelte Signalwege gesteuert wird. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen wären noch weitere Versuche nötig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten. So könnte mittels siRNA Knock-downs jeweils eines der beiden Rezeptoren seine Beteiligung an der Migration der verwendeten Zelllinie nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden.

4.3.4 Untersuchung einer potentiellen Interaktion von CD9 mit PDGFR

Wie bereits unter 4.3.3 beschrieben sind Interaktionen von CD9 mit unterschiedlichen Rezeptoren bekannt. Unter anderem konnte bereits eine Interaktion mit dem humanen EGF-Rezeptor mittels Ko-Immunpräzipitation nachgewiesen werden (Murayama, Shinomura et al. 2008). Bei dieser Methode werden Zellysate hergestellt aus denen, mit einem an eine Säule gebundenen Antikörper, Proteine oder Proteinkomplexe präzipitiert werden können. Probleme bei dieser Methode sind unter anderem die potentielle Degradation der Proteine. Des Weiteren können nur Bindungen mit einer sehr hohen Affinität zwischen den Bindungspartnern nachgewiesen werden (Dwane und Kiely 2011).

Eine weitere Methode zum Nachweis von potentiellen Interaktionen zwischen Proteinen ist das *proximity ligation assay* (PLA). Mit diesem Assay ist es möglich sowohl Modifikationen an einzelnen Proteinen als auch Proteinkomplexe *in situ* nachzuweisen (Söderberg, Leuchowius et al. 2008). Dazu werden Primär- oder Sekundärantikörper gegen die zu untersuchenden Proteine verwendet. An diese, als *proximity probes* bezeichneten, Antikörpern ist eine kurze DNA-Sequenz gebunden. Liegen die verwendeten *proximity probes* in enger räumlicher Nähe, können die DNA-Sequenzen durch Ligation einen zirkulären DNA-Strang bilden. Dieser wird anschließend mittels *rolling circle amplifikation* (RCA) vervielfältigt und bildet dadurch einen langen DNA-Einzelstrang der sich zu einer Art Ball aufrollt. Die Detektion erfolgt im Anschluss durch die Zugabe von komplementären, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden (Söderberg, Gullberg et al. 2006; Söderberg, Leuchowius et al. 2008; OlinkBioscience www.olink.com).

Die Ergebnisse der hier durchgeführten PLAs zeigen sehr deutlich eine räumliche Nähe von CD9 zu PDGFR α und β in beiden verwendeten humanen Glioblastomzelllinien. Dieses Ergebnis wird von einer zweiten PLA mit einer anderen Antikörperkombination gegen CD9, PDGFR α und β bestätigt. Diese Indizien sprechen sehr stark für eine Interaktion von CD9 mit den PDGF-Rezeptoren. Allerdings sind noch weitere Versuche und eine zweite Methode nötig um dieses Ergebnis eindeutig zu bestätigen. Dazu könnte beispielsweise das Yeast Two-Hybrid System oder die Ko-Immunpräzipitation verwendet werden.

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für zwei der im *Drosophila*-Modell identifizierten Gene ein entsprechendes Protein im Menschen identifiziert. Durch die hier durchgeführten Versuche konnte eine Beteiligung an der Migration von humanen Glioblastomzelllinien der beiden Proteine bestätigt werden.

Zum Einen konnte nachgewiesen werden, dass der Knock-down von LOXL4 in humanen Glioblastomzelllinien zu einer Reduktion der Migration führt. Im Falle der U343 MG Zellen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der Knock-down von LOXL4 die über PDGFR vermittelte Migration reduziert. Des Weiteren war *in vivo* eine Verringerung der Infiltrationszone von C6-SP-GFP Tumoren in der Maus, nach Behandlung mit BAPN zu beobachten.

Aufgrund dieser Ergebnisse ergeben sich unterschiedliche Möglichkeiten wie die LOX-Proteine Einfluss auf die Migration von Glioblastomzellen nehmen, und ob und wie eine Interaktion mit den PDGF-Rezeptoren vorliegt. Eine Hypothese zum Einfluss von LOXL4 auf die durch PDGFR vermittelte Migration ist die Oxidation des PDGFR und die dadurch verbesserte Bindung des Liganden. Zur Untersuchung dieser Hypothese könnten weiterführend PLAs durchgeführt werden. Mit dieser Methode wäre es möglich Unterschiede in der Phosphorylierung, und damit in der Aktivierung, des PDGFR nach Knock-down von LOXL4 im Vergleich zur Kontrolle zu untersuchen.

Eine zweite Hypothese ist die Steigerung der ECM-Festigkeit durch Hochregulation der LOX-Proteine und eine dadurch vermittelte Begünstigung der Migration. Bis jetzt war es nicht möglich in Zellkultur oder Gewebe aus den *in vivo* Versuchen einen Einfluss des LOX-Inhibitors auf die Festigkeit des Gewebes zu messen. Zurzeit werden neue Methoden beschrieben die eine genauere Betrachtung von Geweben *in vivo* ermöglichen (Sarvazyan, Hall et al. 2011; Hollender, Wolf et al. 2012). Eventuell eröffnet sich so eine neue Möglichkeit um den Einfluss von BAPN bzw. eines Knock-downs der LOX-Proteine auf die Festigkeit der ECM in Geweben zu überprüfen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit CD9. Im Rahmen dieser Versuche konnte nur in einer der beiden verwendeten Zelllinien (U343 MG) ein Einfluss von CD9 auf die Migration nachgewiesen werden. Eine Hypothese zur Erklärung diese Beobachtungen beruht auf der unterschiedlichen Ausstattung

der Zellen mit PDGF-Rezeptoren. So könnte die CD9-abhängige Migration in Glioblastomzelllinien hauptsächlich über PDGFR α und nicht über PDGFR β gesteuert werden. Durch Knock-down der unterschiedlichen PDGF-Rezeptoren könnte eine Beteiligung an der Migration bestätigt bzw. ausgeschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Bestimmung der Phosphorylierung bzw. der Aktivierung der Rezeptoren mittels PLA. Auf diesem Weg könnte nachgewiesen werden, ob die Anwesenheit oder der Knock-down von CD9 Einfluss auf die Aktivierbarkeit eines oder beider Rezeptoren hat.

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit Hinweise für eine Interaktion von CD9 mit den PDGF-Rezeptoren gesammelt. Diese Ergebnisse sollten durch eine zweite Methode, wie z.B. mit dem Yeast Two-Hybrid System oder einer Ko-Immunpräzipitation bestätigt werden.

Weitere Möglichkeiten zur genaueren Untersuchung der Rolle beider Proteine in den mit der Migration verbundenen Signalwegen sind sogenannte Reporter-Assays. Mit diesen teilweise auf Luciferase-Aktivierung basierenden Assays ist es möglich die Aktivität einzelner Signalwege zu ermitteln. So könnte beispielsweise der Einfluss eines LOXL4 oder CD9 Knock-downs auf die durch PDGF-Rezeptoren vermittelten Signalwege untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Glioblastome sind die häufigsten malignen Hirntumoren bei Erwachsenen. Sie zeichnen sich durch eine starke Migration und einer hohen Proliferations- und Angiogeneserate aus. Aufgrund dieser Merkmale kommt es zu einer sehr schlechten Überlebensprognose. Die starke Heterogenität der Tumoren und die Vielfalt an fehlregulierten Signalwegen erschweren die Suche nach einer lebensverlängernden Therapie. Eine zusätzliche Erschwernis stellen dabei die häufig auftretende Chemo- und Radiotherapieresistenz dar. Aufgrund dieser Eigenschaften der Glioblastome ist ein genaues Verständnis der zugrunde liegenden Signalwege und der daran beteiligten Proteine von essentieller Bedeutung für die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten.

In dem dieser Arbeit zugrunde liegende *Drosophila melanogaster* Glioblastom-Modell wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Klämbt (Institut für Neurobiologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster) diverse Gene identifiziert, die wahrscheinlich eine Rolle bei der Pvr- bzw. PDGFR-vermittelten Migration spielen. Die den Fliegenegenen entsprechenden humanen Proteine bzw. ein vergleichbares humanes Protein wurden im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert. Sowohl die LOX-Proteine (LOX, LOXL1 und LOXL4) als auch das Tetraspanin CD9 waren in Glioblastomen und humanen Glioblastomzelllinien, im Vergleich zu unauffälligen humanen Kortex, hochreguliert. In den funktionellen Analysen konnte durch den Knock-down von LOXL4 bzw. die Inhibition der LOX-Proteine eine Reduktion der Migration *in vitro* und *in vivo* erreicht werden. Ein Einfluss auf die Proliferation konnte hingegen in keinem der Systeme beobachtet werden. Auch der Knock-down von CD9 führte, zu mindestens in einer der beiden Zelllinien (U343 MG), zu einer Reduktion der Migration und zu einer Aufhebung der migrationsfördernden Wirkung von PDGF-BB. Zusätzlich konnten Hinweise auf eine potentielle Interaktion von CD9 mit den PDGF-Rezeptoren mittels PLA gefunden werden. Im Falle beider Proteine weisen die Ergebnisse auf einen Zusammenhang mit den PDGF-Rezeptoren bzw. den von ihnen gesteuerten Signalwegen hin.

Insgesamt liefern die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Zusammenhänge neue Einsichten in die Migration von Glioblastomen und bieten Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapieansätze.

6. Anhang: Materialien

6.1 Zellkultur

6.1.1 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Bezugsquelle
A172	Humane Glioblastomzelllinie (Giard, Aaronson et al. 1973)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn A. Temme, Dresden
C6-SP-GFP	Stabil mit hrGFP transfizierte Ratten Glioblastomzelllinie (Tatenhorst, Püttmann et al. 2005)	Hergestellt von Frau Silvia Püttmann im Institut für Neuropathologie, Münster
U343 MG	Humane Glioblastomzelllinie (Pontén und Macintyre 1968)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Inge Baur, Institut für Neuropathologie, Münster

6.1.2 Medien und Zusätze

Medium	Zusammensetzung
Standard Kultivierungsmedium für A172 und U343 MG	500 ml DMEM 50 ml FCS Gold 5 ml Penicillin/Streptomycin (je 10 mg/ml)
Selektionsmedium für C6-SP-GFP	500 ml DMEM 50 ml FCS Gold 5 ml Penicillin/Streptomycin (je 10 mg/ml) 5 ml G418 Sulfat Stocklösung (100 mg/ml)

6.2 Mäuse

Für das Xenotransplantations-Modell wurden weibliche, neun Wochen alte NMRI nu/nu Mäuse verwendet (Rygaard 1969). Diese Mäuse zeichnen sich durch das Fehlen des Thymus und der Körperbehaarung aus. Verglichen mit gewöhnlichen NMRI Mäusen zeigen NMRI nu/nu Mäuse eine verringerte Zahl an T-Zellen und eine leicht erhöhte Zahl an Natürlichen Killerzellen.

Die Mäuse wurden im Alter von vier Wochen vom Centre d'élevage René Janvier (Le Genest-St-Isle, Frankreich) bezogen.

6.3 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
5 × Laemmli-Auftragspuffer 10% (w/v) SDS für Western-Blot	0,3125 M Tris ·HCl, pH 6,8 10% (w/v) SDS 50% (w/v) Glycerin 25% (v/v) β-Mercaptoethanol 0,01% (w/v) Bromphenolblau
10 x TST	100 ml 1 M Tris HCl, pH 7,6 300 ml 5 M NaCl 5 g Tween 20 ad. 1 l Aqua bidest
10 x TBST	200 mM Tris HCL (pH 7,5) 500 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween 20 0,2% (v/v) Triton X-100
2,5% Blockierungspuffer für Western Blot	2,5% (w/v) Magermilchpulver in 1 × TST
5% Blockierungspuffer für Western Blot	5% (w/v) Magermilchpulver in 1 x TST

Puffer	Zusammensetzung
BAPN Stocklösung für Zellkultur (10 mM)	128,13 mg BAPN 10 ml PBS steril filtrieren
BAPN Stocklösung für Injektion (50 mg/ml)	500 mg BAPN 10 ml PBS steril filtrieren
Blotpuffer (1x)	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 200 ml Methanol ad. 1 l Aqua bidest pH 8,3 einstellen
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) in Aqua bidest 24 h inkubieren (rühren) und anschließend autoklavieren
G418 Sulfat Stocklösung (100 mg/ml)	100 mg G418 Sulfat ad. 1 ml 0,1 M HEPES (pH 7,4) steril filtrieren
Lower-Tris	1,5 mM Tris · HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS

Puffer	Zusammensetzung
PBS	80 g NaCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 2 g KCl 2 g KH ₂ PO ₄ ad. 1 l Aqua bidest pH 7,4 einstellen
Ponceau-S-Lösung (10×)	2% (w/v) Ponceau-S 30% (w/v) Trichloressigsäure 30% (w/v) Sulfosalicylsäure
Puffer A (1 x) für PLA	8,8 g NaCl 1,2 g Tris 0,5 ml Tween 20 800 ml Aqua bidest pH 7,4 einstellen ad. 1 l Aqua bidest steril filtrieren
Puffer B (1 x) für PLA	5,84 g NaCl 4,24 g Tris 26,0 g Tris-HCl 500 ml Aqua bidest pH 7,5 einstellen ad. 1 l Aqua bidest steril filtrieren

Puffer	Zusammensetzung
Tris-HCl (1 M)	121,1 g Tris Base ad. 1 l Aqua bidest mit HCl pH 7,6 einstellen
MTT-Stocklösung (12 mM)	5 mg 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ad. 1 ml PBS steril filtrieren
RIPA (Lysepuffer für Proteinbestimmungen)	0,1% SDS 1% NP40 50 mM Tris, pH 8 150 mM NaCl 5% Sodium Deoxycholat Vor Gebrauch frisch dazu geben: Protease-Inhibitor 1:1000 1 mM PMSF (in Isopropanol)
Upper-Tris	0,5 M Tris ·HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS

6.4 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Ausgießstation Leica EG 1150H	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Autoklav HIClave HV-85	HMC Tüssling
Autostainer Link 48	DaKo, Glostrup, Dänemark
Blot-Apparatur Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Digitalkamera für BX50 Colorview II	Soft Imaging, Münster
Einbettautomat Tissue Tek VIP	Sakura Finetek, Alphen an den Rijn, Niederlande
Feinwaage ED 124S-OCE	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskope (BX50 und IX50)	Olympus, Tokyo, Japan
Geldokumentationsanlage Dual Intensity UV Transiluminator	UVP, Cambridge UK
Hamilton Spritze	Roth, Karlsruhe
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Inverse Mikroskope CK30 und BX51	Olympus, Tokyo, Japan
Konfokalmikroskop 510 Meta Laser Scanning Mikroskop	Zeiss, Jena
LabelGuard-Küvette LabelGuard Microliter Cell	Implen, München
Magnetrührer mit Heizplatte RET basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System	Bio-Rad, München
Mini Trans-Blot Cell-Apparatur	Bio-Rad, München
MRT, 3 Telsa Philips Achieva System	Philips, Hamburg
Nanophotometer	Implen, München
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik, Friedrichsdorf

Bezeichnung	Hersteller
pH-mV Meter pH526	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Plattenphotometer Multiscan Ex	MTX Lab Systems Inc., Vienna, USA
Reagenzglasschüttler, Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Reinstwasseranlage MilliQ	Millipore, Billerica, USA
Research Pipetten (2,5, 10, 20, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
qRT-PCR Gerät Gene Amp 5700 Sequence Detector	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
qRT-PCR Gerät Step One Plus	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Schüttler Unitwist	Uni Equip, Martinsried
Spannungsquelle Power Pac 200	Bio-Rad, München
Spannungsquelle Model 200/2.0 Power Supply	Bio-Rad, München
Stereotaktischer Rahmen	Narashige, Tokyo, Japan
Steril Bank Hera Safe	Thermo Scientific, Waltham, USA
Thermocycler PTC 200	Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf
Tischzentrifuge Sprout	Kisker Biotech, Steinfurt
Trockenschrank Heraeus Funktion Line	Thermo Scientific, Waltham, USA
UV/Vis-Spektrophotometer NanoPhotometer	Implen, München
Wasserbad	Fisherbrand, Schwerte
Zellkulturinkubator Hera Cell	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zellzählapparatur CASY® 1 DT	Innovatis AG, Reutlingen

Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0 Rotor SS34	Heraeus, Hanau

6.5 Kits und gebrauchsfertige Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
BioRad DC Protein Assay	Bio-Rad, München
Vybrant DiO cell-labeling solution	Invitrogen, Eugene, USA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) high Glucose 4,5 g/L + L-Glutamin	PAA, Paschin, Österreich
Dulbecco's PBS without Ca & Mg (Zellkultur)	PAA, Paschin, Österreich
Duolink II <i>in situ</i> PLA Kit Orange	Olink Bioscience, Uppsala, Schweden
FCS Gold	PAA, Paschin Österreich
Gene Elute Mammalian total RNA Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, München
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
HiPerfect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Luminata Forte Western HRP Substrat	Millipore, Billerica, USA
Penicillin/Streptomycin	PAA, Paschin, Österreich
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
TagMan Gene Expression Assay	Applied Biosystems, Carlsbad, USA

Bezeichnung	Hersteller
TagMan Universal PCR MasterMix, No AmpErase UNG	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Trypsin EDTA	PAA, Paschin, Österreich
UptiLight HRP Blot Substrat	Uptima (Interchim), Montluçon, Frankreich

6.6 Verwendete siRNA

Bezeichnung	Hersteller
AllStar Negative Control siRNA	Qiagen, Hilden
Hs_CD9_1 FlexiTube siRNA	Qiagen, Hilden
Hs_CD9_7 FlexiTube siRNA	Qiagen, Hilden
Hs_LOXL4_1Hp siRNA	Qiagen, Hilden
Hs_LOXL4_4Hp siRNA	Qiagen, Hilden
Lamin A/C siRNA	Qiagen, Hilden

6.7 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	Roth GmbH, Karlsruhe
Beta-Aminopropionitril (BAPN)	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA

Bezeichnung	Hersteller
CasyTon-Lösung	Innovatis AG, Reutlingen
DMSO (Dimethylsulfoxid), 99,5%	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
Eukitt Eindeckmedium	O.Kindler GmbH, Freiburg
Extravidin Peroxidase (POX)	Sigma-Aldrich, München
Fluoromount Eindeckmedium	DaKo, Glostrup, Dänemark
Formaldehyd 37%	Roth GmbH, Karlsruhe
G418 Sulfat	PAA, Paschin, Österreich
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Goatserum	PAA, Paschin, Österreich
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Hoechst-Farbstoff	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Isopropanol/2-Propanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, München
Matrigel	Beckton Dickinson, Heidelberg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ ·xH ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, München
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München

Bezeichnung	Hersteller
SDS Ultra pure	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl), 1M	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Biorad, München
Tris(hydromethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X 100 (4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl- polyethylene glycolsolution)	Sigma-Aldrich, München
Tween 20 (Poly(oxy-1,2-ethandiyl)- monododekansäure-sorbitylester)	SERVA, Heidelberg
Rekombinantes PDGF-BB	PeproTech, Hamburg

6.8 Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Hersteller
8 well Nunc® Lab-Tek™ Chamber Slides, Permax®	Nunc, Rochester, USA
24 well Platten für Zellkultur	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
96 well Platten für Zellkultur	Nunc, Rochester, USA
MicroAmp® Fast Optical 96-well Reaction Plate with Barcode, 0.1 ml	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Deckgläschen rund ø 12 mm	R.Langenbrinck, Emmendingen
Einbettungskassetten	Engelbrecht, Edermünde
Kryoröhrchen	Nunc, Rochester, USA
Kunststoffreaktionsgefäß 15 ml, 50 ml	Corning, Corning, USA

Bezeichnung	Hersteller
Nitrocellulosemembran	Whatman, Dassel
Objektträger Super Frost®	R.Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR Tubes 0,2 ml PCR Clean	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Costar Stridette (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning, Corning, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF Membran	Roche, Indianapolis, USA
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße Rnase free 1,5 ml	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Zellkulturflaschen Cellstar	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich

6.9 Antikörper

6.9.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller
anti-CD9 [EPR2949], Kaninchen monoklonal Fluoreszenz 1:50, PLA 1:100	Abcam, Cambridge, Großbritannien
anti-CD9 [72F6], Maus monoklonal Fluoreszenz 1:50, PLA 1:100	Abcam, Cambridge, Großbritannien
anti-LOX Kaninchen polyklonal 1:1500	Abnova, Taipei City, Taiwan
anti-LOXL4, Kaninchen polyklonal 1:200	Enzo Life Sciences, Lörrach
anti-LOXL1, Kaninchen polyklonal 1:400	Deciphergen Biotechnology, Cheshire, USA
anti-Ki-67, Kaninchen monoklonal 1:100	Acris Antibodies, Herford
anti-PDGFR α [#3164], Kaninchen monoklonal Fluoreszenz 1:50, PLA 1:100	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-PDGFR α [BM028], Maus monoklonal Fluoreszenz 1:50, PLA 1:100	Acris Antibodies, Herford
anti-PDGFR β [28E1], Kaninchen monoklonal Fluoreszenz 1:50, PLA 1:100	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-PDGFR β [PDGFR-B2], Maus monoklonal Fluoreszenz 1:50, PLA 1:100	Abcam, Cambridge, Großbritannien

Bezeichnung	Hersteller
β-Catenin [AP00511PU-N], Kaninchen polyklonal PLA 1:100	Acris Antibodies, Herford
CDH11 [C0107-07], Maus monoklonal PLA 1:100	US Biological, Swampscott, USA
β-Aktin [A5441], Maus monoklonal Western Blot 1:15000	Sigma-Aldrich, München

6.9.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller
Fluoreszenz gekoppelt	
Alexa Fluor 488 (AF488) goat anti-mouse IgG	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
F0382 goat anti-rabbit IgG	Sigma-Aldrich, München
Cy3-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG	Dianova, Hamburg
Peroxidase gekoppelt	
A2074 mouse anti-rabbit IgG	Sigma-Aldrich, München
A3682 goat anti-mouse IgG	Sigma-Aldrich, München

Biotin gekoppelt	
BA1000 goat anti-rabbit IgG	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
BA2001 horse anti-mouse IgG	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

6.10 Primer

Bezeichnung	Sequenz
TaqMan Gene Expression Assay CD9 (Human)	Hs00233521_m1*
TaqMan Gene Expression Assay LOX (Human)	Hs00942480_m1
TaqMan Gene Expression Assay LOXL1 (Human)	Hs00173746_m1
TaqMan Gene Expression Assay LOXL4 (Human)	Hs00260059_m1
TaqMan Gene Expression Assay LOX (Ratte)	Rn00566984_m1
TaqMan Gene Expression Assay LOXL1 (Ratte)	Rn01418038_m1
TaqMan Gene Expression Assay LOXL4 (Ratte)	Rn01410863_m1
GAPDH forward (Human)	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC
GAPDH reverse (Human)	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA
GAPDH Sonde (Human)	CTGGCATTGCCCTCAACGACCA
GAPDH forward (Ratte)	CAAGAAGGTGGTGAAGCAG
GAPDH reverse (Ratte)	CAAAGGTGGAAGAATGGGAG
GAPDH Sonde (Ratte)	ACTAAAGGGCATCCTGGGCTACACTGAGGAC

7. Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J., L. Rönnbäck, et al. (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." Nat Rev Neurosci **7**(1): 41-53.
- Baker, A. M., T. R. Cox, et al. (2010). "The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer." J Natl Cancer Inst **103**(5): 407-24.
- Bao, S., Q. Wu, et al. (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." Nature **444**(7120): 756-60.
- Bar, E. E., A. Lin, et al. (2010). "Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres." Am J Pathol **177**(3): 1491-502.
- Barnes, J. L. and K. A. Hevey (1990). "Glomerular mesangial cell migration in response to platelet-derived growth factor." Lab Invest **62**(3): 379-82.
- Baudoux, B., D. Castanares-Zapatero, et al. (2000). "The tetraspanin CD9 associates with the integrin alpha6beta4 in cultured human epidermal keratinocytes and is involved in cell motility." Eur J Cell Biol **79**(1): 41-51.
- Beckmann, M. P., C. Betsholtz, et al. (1988). "Comparison of biological properties and transforming potential of human PDGF-A and PDGF-B chains." Science **241**(4871): 1346-9.
- Bellail, A. C., S. B. Hunter, et al. (2004). "Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion." Int J Biochem Cell Biol **36**(6): 1046-69.
- Bellon, G., T. Caulet, et al. (1985). "Immunohistochemical localisation of macromolecules of the basement membrane and extracellular matrix of human gliomas and meningiomas." Acta Neuropathol **66**(3): 245-52.
- Belot, N., S. Rorive, et al. (2001). "Molecular characterization of cell substratum attachments in human glial tumors relates to prognostic features." Glia **36**(3): 375-90.
- Benton, G., H. K. Kleinman, et al. (2011). "Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells." Int J Cancer **128**(8): 1751-7.
- Berditchevski, F. (2001). "Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye." J Cell Sci **114**(Pt 23): 4143-51.
- Bergsten, E., M. Uutela, et al. (2001). "PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor." Nat Cell Biol **3**(5): 512-6.

- Betsholtz, C., L. Karlsson, et al. (2001). "Developmental roles of platelet-derived growth factors." Bioessays **23**(6): 494-507.
- Bier, E. (2005). "Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics." Nat Rev Genet **6**(1): 9-23.
- Bleau, A. M., J. T. Huse, et al. (2009). "The ABCG2 resistance network of glioblastoma." Cell Cycle **8**(18): 2936-44.
- Bondareva, A., C. M. Downey, et al. (2009). "The lysyl oxidase inhibitor, beta-aminopropionitrile, diminishes the metastatic colonization potential of circulating breast cancer cells." PLoS One **4**(5): e5620.
- Boucheix, C. and P. Benoit (1988). "CD9 antigen: will platelet physiology help to explain the function of a surface molecule during hemopoietic differentiation?" Nouv Rev Fr Hematol **30**(4): 201-2.
- Boucheix, C. and E. Rubinstein (2001). "Tetraspanins." Cell Mol Life Sci **58**(9): 1189-205.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." Development **118**(2): 401-15.
- Bredel, M., I. F. Pollack, et al. (1999). "Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in high-grade non-brainstem gliomas of childhood." Clin Cancer Res **5**(7): 1786-92.
- Brennan, C., H. Momota, et al. (2009). "Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations." PLoS One **4**(11): e7752.
- Brumby, A. M. and H. E. Richardson (2005). "Using Drosophila melanogaster to map human cancer pathways." Nat Rev Cancer **5**(8): 626-39.
- Burger, P. C., P. J. Dubois, et al. (1983). "Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme." J Neurosurg **58**(2): 159-69.
- CBTRUS (2011). "CBTRUS statistical report: Primary Brain and Central Nervous System. Tumors diagnosed in the United States in 2004-2007." <http://www.cbtrus.org>.
- Cho, N. K., L. Keyes, et al. (2002). "Developmental control of blood cell migration by the Drosophila VEGF pathway." Cell **108**(6): 865-76.
- Claes, A., A. J. Idema, et al. (2007). "Diffuse glioma growth: a guerilla war." Acta Neuropathol **114**(5): 443-58.
- Clarke, I. D. and P. B. Dirks (2003). "A human brain tumor-derived PDGFR-alpha deletion mutant is transforming." Oncogene **22**(5): 722-33.

- Csiszar, K. (2001). "Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **70**: 1-32.
- Dai, C., J. C. Celestino, et al. (2001). "PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo." Genes Dev **15**(15): 1913-25.
- Desgrosellier, J. S. and D. A. Cheresh (2010). "Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities." Nat Rev Cancer **10**(1): 9-22.
- Di Rocco, F., R. S. Carroll, et al. (1998). "Platelet-derived growth factor and its receptor expression in human oligodendrogliomas." Neurosurgery **42**(2): 341-6.
- Dietzl, G., D. Chen, et al. (2007). "A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila." Nature **448**(7150): 151-6.
- Doh-ura, K., E. Mekada, et al. (2000). "Enhanced CD9 expression in the mouse and human brains infected with transmissible spongiform encephalopathies." J Neuropathol Exp Neurol **59**(9): 774-85.
- Duchek, P., K. Somogyi, et al. (2001). "Guidance of cell migration by the Drosophila PDGF/VEGF receptor." Cell **107**(1): 17-26.
- Dwane, S. and P. A. Kiely (2011). "Tools used to study how protein complexes are assembled in signaling cascades." Bioeng Bugs **2**(5): 247-59.
- El Rouby, D. H., M. H. Bashir, et al. (2008). "Ultrastructural and histomorphometric alterations of rat jaw bones after experimental induction of lathyrism." Arch Oral Biol **53**(10): 916-23.
- Erler, J. T., K. L. Bennewith, et al. (2006). "Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis." Nature **440**(7088): 1222-6.
- Erler, J. T. and V. M. Weaver (2009). "Three-dimensional context regulation of metastasis." Clin Exp Metastasis **26**(1): 35-49.
- Erovic, B. M., J. Pammer, et al. (2003). "Motility-related protein-1/CD9 expression in head and neck squamous cell carcinoma." Head Neck **25**(10): 848-57.
- Fan, J., G. Z. Zhu, et al. (2010). "Expression and function of CD9 in melanoma cells." Mol Carcinog **49**(1): 85-93.
- Fredriksson, L., H. Li, et al. (2004). "The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms." Cytokine Growth Factor Rev **15**(4): 197-204.
- Fretto, L. J., A. J. Snape, et al. (1993). "Mechanism of platelet-derived growth factor (PDGF) AA, AB, and BB binding to alpha and beta PDGF receptor." J Biol Chem **268**(5): 3625-31.
- Friedl, P., K. Wolf, et al. (2011). "Nuclear mechanics during cell migration." Curr Opin Cell Biol **23**(1): 55-64.

- Fulga, T. A. and P. Rorth (2002). "Invasive cell migration is initiated by guided growth of long cellular extensions." Nat Cell Biol **4**(9): 715-9.
- Furnari, F. B., T. Fenton, et al. (2007). "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment." Genes Dev **21**(21): 2683-710.
- Gahmberg, C. G., S. C. Fagerholm, et al. (2009). "Regulation of integrin activity and signalling." Biochim Biophys Acta **1790**(6): 431-44.
- Gaspar, L. E., B. J. Fisher, et al. (1992). "Supratentorial malignant glioma: patterns of recurrence and implications for external beam local treatment." Int J Radiat Oncol Biol Phys **24**(1): 55-7.
- Gee, J. R. and J. N. Keller (2005). "Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E." Int J Biochem Cell Biol **37**(6): 1145-50.
- Giard, D. J., S. A. Aaronson, et al. (1973). "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors." J Natl Cancer Inst **51**(5): 1417-23.
- Giese, A., R. Bjerkvig, et al. (2003). "Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment." J Clin Oncol **21**(8): 1624-36.
- Giese, A., M. D. Rief, et al. (1994). "Determinants of human astrocytoma migration." Cancer Res **54**(14): 3897-904.
- Gilbert, M. R. (2011). "Recurrent glioblastoma: a fresh look at current therapies and emerging novel approaches." Semin Oncol **38 Suppl 4**: S21-33.
- Gladson, C. L. (1999). "The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function." J Neuropathol Exp Neurol **58**(10): 1029-40.
- Görögh, T., J. B. Weise, et al. (2007). "Selective upregulation and amplification of the lysyl oxidase like-4 (LOXL4) gene in head and neck squamous cell carcinoma." J Pathol **212**(1): 74-82.
- Grimsby, J. L., H. A. Lucero, et al. (2010). "Role of lysyl oxidase propeptide in secretion and enzyme activity." J Cell Biochem **111**(5): 1231-43.
- Grondahl-Hansen, J., I. J. Christensen, et al. (1993). "High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis." Cancer Res **53**(11): 2513-21.
- Halter, D. A., J. Urban, et al. (1995). "The homeobox gene repo is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*." Development **121**(2): 317-32.
- Hanisch, U. K. and H. Kettenmann (2007). "Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain." Nat Neurosci **10**(11): 1387-94.

- Hashida, H., A. Takabayashi, et al. (2003). "Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer." Br J Cancer **89**(1): 158-67.
- Heagy, W., K. Duca, et al. (1995). "Enkephalins stimulate leukemia cell migration and surface expression of CD9." J Clin Invest **96**(3): 1366-74.
- Heino, T. I., T. Kärpänen, et al. (2001). "The Drosophila VEGF receptor homolog is expressed in hemocytes." Mech Dev **109**(1): 69-77.
- Hemler, M. E. (2003). "Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 397-422.
- Hemler, M. E. (2008). "Targeting of tetraspanin proteins--potential benefits and strategies." Nat Rev Drug Discov **7**(9): 747-58.
- Hermanson, M., K. Funa, et al. (1992). "Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops." Cancer Res **52**(11): 3213-9.
- Hermanson, M., K. Funa, et al. (1996). "Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas." Cancer Res **56**(1): 164-71.
- Higashiyama, S., R. Iwamoto, et al. (1995). "The membrane protein CD9/DRAP 27 potentiates the juxtacrine growth factor activity of the membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor." J Cell Biol **128**(5): 929-38.
- Hoch, R. V. and P. Soriano (2003). "Roles of PDGF in animal development." Development **130**(20): 4769-84.
- Hohenester, E., T. Sasaki, et al. (1999). "Crystal structure of a scavenger receptor cysteine-rich domain sheds light on an ancient superfamily." Nat Struct Biol **6**(3): 228-32.
- Holland, E. C. (2001). "Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models." Nat Rev Genet **2**(2): 120-9.
- Hollender, P. J., P. D. Wolf, et al. (2012). "Intracardiac echocardiography measurement of dynamic myocardial stiffness with shear wave velocimetry." Ultrasound Med Biol **38**(7): 1271-83.
- Hornstra, I. K., S. Birge, et al. (2003). "Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice." J Biol Chem **278**(16): 14387-93.
- Howe, A., A. E. Aplin, et al. (1998). "Integrin signaling and cell growth control." Curr Opin Cell Biol **10**(2): 220-31.

- Huang, C. I., N. Kohno, et al. (1998). "Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients." Am J Pathol **153**(3): 973-83.
- Huse, J. T. and E. C. Holland (2010). "Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma." Nat Rev Cancer **10**(5): 319-31.
- Hwang, J. R., K. Jo, et al. (2012). "Upregulation of CD9 in ovarian cancer is related to the induction of TNF-alpha gene expression and constitutive NF-kappaB activation." Carcinogenesis **33**(1): 77-83.
- Ichimura, K., H. Ohgaki, et al. (2004). "Molecular pathogenesis of astrocytic tumours." J Neurooncol **70**(2): 137-60.
- Ilic, D., Y. Furuta, et al. (1995). "Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice." Nature **377**(6549): 539-44.
- Imhof, I., W. J. Gasper, et al. (2008). "Association of tetraspanin CD9 with transmembrane TGF{alpha} confers alterations in cell-surface presentation of TGF{alpha} and cytoskeletal organization." J Cell Sci **121**(Pt 13): 2265-74.
- Janssens, K., H. H. Sung, et al. (2010). "Direct detection of guidance receptor activity during border cell migration." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(16): 7323-8.
- Janzer, R. C. and M. C. Raff (1987). "Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells." Nature **325**(6101): 253-7.
- Jones, A. V. and N. C. Cross (2004). "Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors." Cell Mol Life Sci **61**(23): 2912-23.
- Jones, T. R., E. Ruoslahti, et al. (1982). "Fibronectin and glial fibrillary acidic protein expression in normal human brain and anaplastic human gliomas." Cancer Res **42**(1): 168-77.
- Joukov, V., A. Kaipainen, et al. (1997). "Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C." J Cell Physiol **173**(2): 211-5.
- Kaewmala, K., M. J. Uddin, et al. (2011). "Association study and expression analysis of CD9 as candidate gene for boar sperm quality and fertility traits." Anim Reprod Sci **125**(1-4): 170-9.
- Kagan, H. M. and W. Li (2003). "Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell." J Cell Biochem **88**(4): 660-72.
- Kagan, H. M. and P. C. Trackman (1991). "Properties and function of lysyl oxidase." Am J Respir Cell Mol Biol **5**(3): 206-10.

- Kaji, K., S. Takeshita, et al. (2001). "Functional association of CD9 with the Fc gamma receptors in macrophages." J Immunol **166**(5): 3256-65.
- Kawashima, M., K. Doh-ura, et al. (2002). "CD9 expression in solid non-neuroepithelial tumors and infiltrative astrocytic tumors." J Histochem Cytochem **50**(9): 1195-203.
- Kazlauskas, A. and J. A. Cooper (1989). "Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins." Cell **58**(6): 1121-33.
- Kelly, J. D., B. A. Haldeman, et al. (1991). "Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit transphosphorylation." J Biol Chem **266**(14): 8987-92.
- Kenyon, K., W. S. Modi, et al. (1993). "A novel human cDNA with a predicted protein similar to lysyl oxidase maps to chromosome 15q24-q25." J Biol Chem **268**(25): 18435-7.
- Kim, M. S., S. S. Kim, et al. (2003). "Expression and purification of enzymatically active forms of the human lysyl oxidase-like protein 4." J Biol Chem **278**(52): 52071-4.
- Kim, S. U. and J. de Vellis (2005). "Microglia in health and disease." J Neurosci Res **81**(3): 302-13.
- Kirschmann, D. A., E. A. Seftor, et al. (2002). "A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion." Cancer Res **62**(15): 4478-83.
- Kleihues, P., Burger, P.C., Aldape, K.D., Brat, D.J., Biernat, W., Binger, D.D., Nakazato, Y., Plate, K.H., Giangaspero, F., von Deimling, A., Ohgaki, H., Cavanee, W.K. (2007). Glioblastoma. World Health Organization Classification of Tumours the Central Nervous System. H. O. David N. Louis, Otmar D. Wiestler, Webster K. Cavanee. Lyon, Renouf Publishing Co. Ltd. **4th Edition**.
- Klein-Soyer, C., D. O. Azorsa, et al. (2000). "CD9 participates in endothelial cell migration during in vitro wound repair." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(2): 360-9.
- Kohler, N. and A. Lipton (1974). "Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity." Exp Cell Res **87**(2): 297-301.
- Kohmo, S., T. Kijima, et al. (2010). "Cell surface tetraspanin CD9 mediates chemoresistance in small cell lung cancer." Cancer Res **70**(20): 8025-35.
- Kolesnikova, T. V., A. R. Kazarov, et al. (2009). "Glioblastoma inhibition by cell surface immunoglobulin protein EWI-2, in vitro and in vivo." Neoplasia **11**(1): 77-86, 4p following 86.

- Krndija, D., H. Schmid, et al. (2010). "Substrate stiffness and the receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha regulate spreading of colon cancer cells through cytoskeletal contractility." Oncogene **29**(18): 2724-38.
- Laczko, R., K. M. Szauter, et al. (2007). "Active lysyl oxidase (LOX) correlates with focal adhesion kinase (FAK)/paxillin activation and migration in invasive astrocytes." Neuropathol Appl Neurobiol **33**(6): 631-43.
- Lafleur, M. A., D. Xu, et al. (2009). "Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis." Mol Biol Cell **20**(7): 2030-40.
- LaRoche, W. J., M. Jeffers, et al. (2001). "PDGF-D, a new protease-activated growth factor." Nat Cell Biol **3**(5): 517-21.
- Le Naour, F., M. Andre, et al. (2006). "Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells." Mol Cell Proteomics **5**(5): 845-57.
- Learte, A. R., M. G. Forero, et al. (2008). "Gliatrophic and gliatropic roles of PVF/PVR signaling during axon guidance." Glia **56**(2): 164-76.
- Lefranc, F., J. Brotchi, et al. (2005). "Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis." J Clin Oncol **23**(10): 2411-22.
- Leveen, P., M. Pekny, et al. (1994). "Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities." Genes Dev **8**(16): 1875-87.
- Levental, K. R., H. Yu, et al. (2009). "Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling." Cell **139**(5): 891-906.
- Li, X., A. Pontén, et al. (2000). "PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor." Nat Cell Biol **2**(5): 302-9.
- Liu, G., X. Yuan, et al. (2006). "Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma." Mol Cancer **5**: 67.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Lokker, N. A., C. M. Sullivan, et al. (2002). "Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors." Cancer Res **62**(13): 3729-35.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.

- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Lucero, H. A. and H. M. Kagan (2006). "Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function." Cell Mol Life Sci **63**(19-20): 2304-16.
- Lucero, H. A., J. M. Mäki, et al. (2011). "Activation of cellular chemotactic responses to chemokines coupled with oxidation of plasma membrane proteins by lysyl oxidase." J Neural Transm **118**(7): 1091-9.
- Maddison, K. and A. R. Clarke (2005). "New approaches for modelling cancer mechanisms in the mouse." J Pathol **205**(2): 181-93.
- Maecker, H. T., S. C. Todd, et al. (1997). "The tetraspanin superfamily: molecular facilitators." FASEB J **11**(6): 428-42.
- Mäki, J. M. and K. I. Kivirikko (2001). "Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme." Biochem J **355**(Pt 2): 381-7.
- Mäki, J. M., R. Sormunen, et al. (2005). "Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues." Am J Pathol **167**(4): 927-36.
- Mäki, J. M., H. Tikkanen, et al. (2001). "Cloning and characterization of a fifth human lysyl oxidase isoenzyme: the third member of the lysyl oxidase-related subfamily with four scavenger receptor cysteine-rich domains." Matrix Biol **20**(7): 493-6.
- Mapstone, T. B. (1991). "Expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor and their correlation with cellular morphology in glial tumors." J Neurosurg **75**(3): 447-51.
- Martin, J. E., J. A. Sosa-Melgarejo, et al. (1991). "Purkinje cell toxicity of beta-aminopropionitrile in the rat." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **419**(5): 403-8.
- Matthews, K. A., T. C. Kaufman, et al. (2005). "Research resources for Drosophila: the expanding universe." Nat Rev Genet **6**(3): 179-93.
- McComb, R. D., J. M. Moul, et al. (1987). "Distribution of type VI collagen in human gliomas: comparison with fibronectin and glioma-mesenchymal matrix glycoprotein." J Neuropathol Exp Neurol **46**(6): 623-33.
- Mhaweck, P., P. Dulguerov, et al. (2004). "Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) expression can predict disease-free survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." Br J Cancer **90**(2): 471-5.
- Mhaweck, P., F. Herrmann, et al. (2003). "Motility-related protein 1 (MRP-1/CD9) expression in urothelial bladder carcinoma and its relation to tumor recurrence and progression." Cancer **98**(8): 1649-57.

- Miyake, M., K. Nakano, et al. (1995). "Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer." Cancer Res **55**(18): 4127-31.
- Molnar, J., Z. Ujfaludi, et al. (2005). "Drosophila lysyl oxidases Dmlox1-1 and Dmlox1-2 are differentially expressed and the active DmLOXL-1 influences gene expression and development." J Biol Chem **280**(24): 22977-85.
- Moore, S. W., P. Roca-Cusachs, et al. (2010). "Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing." Dev Cell **19**(2): 194-206.
- Munier, A. I., D. Doucet, et al. (2002). "PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor, induces hemocyte proliferation in Drosophila larvae." EMBO Rep **3**(12): 1195-200.
- Murayama, Y., Y. Shinomura, et al. (2008). "The tetraspanin CD9 modulates epidermal growth factor receptor signaling in cancer cells." J Cell Physiol **216**(1): 135-43.
- Nakamoto, T., Y. Murayama, et al. (2009). "A novel therapeutic strategy with anti-CD9 antibody in gastric cancers." J Gastroenterol **44**(9): 889-96.
- Nakamura, K., R. Iwamoto, et al. (1995). "Membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) and diphtheria toxin receptor-associated protein (DRAP27)/CD9 form a complex with integrin alpha 3 beta 1 at cell-cell contact sites." J Cell Biol **129**(6): 1691-705.
- Nakamura, Y., R. Iwamoto, et al. (1996). "Expression and distribution of CD9 in myelin of the central and peripheral nervous systems." Am J Pathol **149**(2): 575-83.
- Nedergaard, M., B. Ransom, et al. (2003). "New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain." Trends Neurosci **26**(10): 523-30.
- Ohgaki, H., P. Dessen, et al. (2004). "Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study." Cancer Res **64**(19): 6892-9.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2005). "Epidemiology and etiology of gliomas." Acta Neuropathol **109**(1): 93-108.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2009). "Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas." Cancer Sci **100**(12): 2235-41.
- OlinkBioscience. (www.olink.com). "Olink Bioscience."
- Ovalle, S., M. D. Gutiérrez-López, et al. (2007). "The tetraspanin CD9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells." Int J Cancer **121**(10): 2140-52.

- Ozawa, T., C. W. Brennan, et al. (2010). "PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas." Genes Dev **24**(19): 2205-18.
- Paschalis, E. P., D. N. Tatakis, et al. (2011). "Lathyrism-induced alterations in collagen cross-links influence the mechanical properties of bone material without affecting the mineral." Bone **49**(6): 1232-41.
- Paszek, M. J., N. Zahir, et al. (2005). "Tensional homeostasis and the malignant phenotype." Cancer Cell **8**(3): 241-54.
- Paulsson, J., M. B. Lindh, et al. (2011). "Prognostic but not predictive role of platelet-derived growth factor receptors in patients with recurrent glioblastoma." Int J Cancer **128**(8): 1981-8.
- Paulus, W., I. Baur, et al. (1996). "Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins." Lab Invest **75**(6): 819-26.
- Paulus, W. and J. C. Tonn (1995). "Interactions of glioma cells and extracellular matrix." J Neurooncol **24**(1): 87-91.
- Payne, S. L., M. J. Hendrix, et al. (2007). "Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer—a prospect." J Cell Biochem **101**(6): 1338-54.
- Pellinen, T., J. K. Rantala, et al. (2011). "A functional genetic screen reveals new regulators of beta1-integrin activity." J Cell Sci **125**(Pt 3): 649-61.
- Pelloski, C. E., K. V. Ballman, et al. (2007). "Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma." J Clin Oncol **25**(16): 2288-94.
- Penas, P. F., A. Garcia-Diez, et al. (2000). "Tetraspanins are localized at motility-related structures and involved in normal human keratinocyte wound healing migration." J Invest Dermatol **114**(6): 1126-35.
- Petit, V. and J. P. Thiery (2000). "Focal adhesions: structure and dynamics." Biol Cell **92**(7): 477-94.
- Pfister, S., C. Hartmann, et al. (2009). "Histology and molecular pathology of pediatric brain tumors." J Child Neurol **24**(11): 1375-86.
- Phillips, H. S., S. Kharbanda, et al. (2006). "Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis." Cancer Cell **9**(3): 157-73.
- Plate, K. H., G. Breier, et al. (1992). "Platelet-derived growth factor receptor-beta is induced during tumor development and upregulated during tumor progression in endothelial cells in human gliomas." Lab Invest **67**(4): 529-34.
- Pontén, J. and E. H. Macintyre (1968). "Long term culture of normal and neoplastic human glia." Acta Pathol Microbiol Scand **74**(4): 465-86.

- Powell, E. M. and H. M. Geller (1999). "Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension." Glia **26**(1): 73-83.
- Raff, M. C. (1989). "Glial cell diversification in the rat optic nerve." Science **243**(4897): 1450-5.
- Raghu, H., S. S. Lakka, et al. (2010). "Suppression of uPA and uPAR attenuates angiogenin mediated angiogenesis in endothelial and glioblastoma cell lines." PLoS One **5**(8): e12458.
- Rao, J. S. (2003). "Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases." Nat Rev Cancer **3**(7): 489-501.
- Read, R. D. (2011). "Drosophila melanogaster as a model system for human brain cancers." Glia **59**(9): 1364-76.
- Read, R. D., W. K. Cavenee, et al. (2009). "A drosophila model for EGFR-Ras and PI3K-dependent human glioma." PLoS Genet **5**(2): e1000374.
- Reilly, K. M., J. B. Rubin, et al. (2008). "Rethinking brain tumors: the fourth Mouse Models of Human Cancers Consortium nervous system tumors workshop." Cancer Res **68**(14): 5508-11.
- Reiter, L. T. and E. Bier (2002). "Using Drosophila melanogaster to uncover human disease gene function and potential drug target proteins." Expert Opin Ther Targets **6**(3): 387-99.
- Rembrandt. (<http://rembrandt.nci.nih.gov>). "REpository for Molecular BRAin Neoplasia DaTa (REMBRANDT)."
- Riemenschneider, M. J., J. W. Jeuken, et al. (2010). "Molecular diagnostics of gliomas: state of the art." Acta Neuropathol **120**(5): 567-84.
- Rodriguez, L. G., X. Wu, et al. (2005). "Wound-healing assay." Methods Mol Biol **294**: 23-9.
- Rosenkranz, S. and A. Kazlauskas (1999). "Evidence for distinct signaling properties and biological responses induced by the PDGF receptor alpha and beta subtypes." Growth Factors **16**(3): 201-16.
- Rosin, D., E. Schejter, et al. (2004). "Apical accumulation of the Drosophila PDGF/VEGF receptor ligands provides a mechanism for triggering localized actin polymerization." Development **131**(9): 1939-48.
- Ross, R., J. Glomset, et al. (1974). "A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(4): 1207-10.
- Rubin, G. M. and E. B. Lewis (2000). "A brief history of Drosophila's contributions to genome research." Science **287**(5461): 2216-8.

- Rubinstein, E., F. Le Naour, et al. (1994). "CD9 antigen is an accessory subunit of the VLA integrin complexes." Eur J Immunol **24**(12): 3005-13.
- Rutka, J. T., G. Apodaca, et al. (1988). "The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function." J Neurosurg **69**(2): 155-70.
- Rygaard, J. (1969). "Immunobiology of the mouse mutant "Nude". Preliminary investigations." Acta Pathol Microbiol Scand **77**(4): 761-2.
- Saito, H., J. Papaconstantinou, et al. (1997). "Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence." J Biol Chem **272**(13): 8157-60.
- Saito, Y., I. Tachibana, et al. (2006). "Absence of CD9 enhances adhesion-dependent morphologic differentiation, survival, and matrix metalloproteinase-2 production in small cell lung cancer cells." Cancer Res **66**(19): 9557-65.
- Sakai, M., H. Kato, et al. (2009). "Expression of lysyl oxidase is correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma." Ann Surg Oncol **16**(9): 2494-501.
- Sarkar, S., R. K. Nuttall, et al. (2006). "Tenascin-C stimulates glioma cell invasion through matrix metalloproteinase-12." Cancer Res **66**(24): 11771-80.
- Sarvazyan, A., T. J. Hall, et al. (2011). "An Overview of Elastography - an Emerging Branch of Medical Imaging." Curr Med Imaging Rev **7**(4): 255-282.
- Sasaki, T., C. Brakebusch, et al. (1998). "Mac-2 binding protein is a cell-adhesive protein of the extracellular matrix which self-assembles into ring-like structures and binds beta1 integrins, collagens and fibronectin." EMBO J **17**(6): 1606-13.
- Schafer, D. P. and M. N. Rasband (2006). "Glial regulation of the axonal membrane at nodes of Ranvier." Curr Opin Neurobiol **16**(5): 508-14.
- Sebban, S., B. Davidson, et al. (2009). "Lysyl oxidase-like 4 is alternatively spliced in an anatomic site-specific manner in tumors involving the serosal cavities." Virchows Arch **454**(1): 71-9.
- Senner, V., S. Ratzinger, et al. (2008). "Collagen XVI expression is upregulated in glioblastomas and promotes tumor cell adhesion." FEBS Lett **582**(23-24): 3293-300.
- Senner, V., A. Sturm, et al. (2000). "In vivo glioma model enabling regulated gene expression." Acta Neuropathol **99**(6): 603-8.
- Sheetz, M. P., D. P. Felsenfeld, et al. (1998). "Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes." Trends Cell Biol **8**(2): 51-4.

- Shi, W., H. Fan, et al. (2000). "The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF- α and regulates TGF- α -induced EGF receptor activation and cell proliferation." J Cell Biol **148**(3): 591-602.
- Shih, A. H. and E. C. Holland (2006). "Platelet-derived growth factor (PDGF) and glial tumorigenesis." Cancer Lett **232**(2): 139-47.
- Shih, Y. H., K. W. Chang, et al. (2012). "Lysyl oxidase and enhancement of cell proliferation and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma." Head Neck.
- Shim, A. H., H. Liu, et al. (2010). "Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(25): 11307-12.
- Sho, M., M. Adachi, et al. (1998). "Transmembrane 4 superfamily as a prognostic factor in pancreatic cancer." Int J Cancer **79**(5): 509-16.
- Siegbahn, A., A. Hammacher, et al. (1990). "Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes." J Clin Invest **85**(3): 916-20.
- Silies, M., Y. Yuva-Aydemir, et al. (2010). "The eye imaginal disc as a model to study the coordination of neuronal and glial development." Fly (Austin) **4**(1): 71-9.
- Sincock, P. M., S. Fitter, et al. (1999). "PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function." J Cell Sci **112 (Pt 6)**: 833-44.
- Sincock, P. M., G. Mayrhofer, et al. (1997). "Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63, and α 5 β 1 integrin." J Histochem Cytochem **45**(4): 515-25.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res **63**(18): 5821-8.
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.
- Smith-Mungo, L. I. and H. M. Kagan (1998). "Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology." Matrix Biol **16**(7): 387-98.
- Smith, J. S., X. Y. Wang, et al. (2000). "Amplification of the platelet-derived growth factor receptor-A (PDGFRA) gene occurs in oligodendrogliomas with grade IV anaplastic features." J Neuropathol Exp Neurol **59**(6): 495-503.

- Söderberg, O., M. Gullberg, et al. (2006). "Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation." Nat Methods **3**(12): 995-1000.
- Söderberg, O., K. J. Leuchowius, et al. (2008). "Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay." Methods **45**(3): 227-32.
- Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 7-35.
- Soyuer, S., I. Soyuer, et al. (2010). "Prognostic significance of CD9 expression in locally advanced gastric cancer treated with surgery and adjuvant chemoradiotherapy." Pathol Res Pract **206**(9): 607-10.
- Sridhar, S. C. and C. K. Miranti (2006). "Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases." Oncogene **25**(16): 2367-78.
- Stupp, R., W. P. Mason, et al. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 987-96.
- Sung, T., D. C. Miller, et al. (2000). "Preferential inactivation of the p53 tumor suppressor pathway and lack of EGFR amplification distinguish de novo high grade pediatric astrocytomas from de novo adult astrocytomas." Brain Pathol **10**(2): 249-59.
- Tatenhorst, L., S. Püttmann, et al. (2005). "Genes associated with fast glioma cell migration in vitro and in vivo." Brain Pathol **15**(1): 46-54.
- Tatenhorst, L., V. Senner, et al. (2004). "Regulators of G-protein signaling 3 and 4 (RGS3, RGS4) are associated with glioma cell motility." J Neuropathol Exp Neurol **63**(3): 210-22.
- TCGA, T. C. G. A. R. N. (2008). "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways." Nature **455**(7216): 1061-8.
- Terada, N., K. Baracska, et al. (2002). "The tetraspanin protein, CD9, is expressed by progenitor cells committed to oligodendrogenesis and is linked to beta1 integrin, CD81, and Tspan-2." Glia **40**(3): 350-9.
- Thomassin, L., C. C. Werneck, et al. (2005). "The Pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for deposition onto elastic fibers." J Biol Chem **280**(52): 42848-55.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1992). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979." Biotechnology **24**: 145-9.

- Trackman, P. C., D. Bedell-Hogan, et al. (1992). "Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor." J Biol Chem **267**(12): 8666-71.
- Trackman, P. C., A. M. Pratt, et al. (1990). "Cloning of rat aorta lysyl oxidase cDNA: complete codons and predicted amino acid sequence." Biochemistry **29**(20): 4863-70.
- Turecek, C., N. Fratzl-Zelman, et al. (2008). "Collagen cross-linking influences osteoblastic differentiation." Calcif Tissue Int **82**(5): 392-400.
- Tysnes, B. B., L. F. Larsen, et al. (1996). "Stimulation of glioma-cell migration by laminin and inhibition by anti-alpha3 and anti-beta1 integrin antibodies." Int J Cancer **67**(6): 777-84.
- Uhm, J. H., C. L. Gladson, et al. (1999). "The role of integrins in the malignant phenotype of gliomas." Front Biosci **4**: D188-99.
- Ullian, E. M., K. S. Christopherson, et al. (2004). "Role for glia in synaptogenesis." Glia **47**(3): 209-16.
- Veeravalli, K. K., C. Chetty, et al. (2010). "MMP-9, uPAR and cathepsin B silencing downregulate integrins in human glioma xenograft cells in vitro and in vivo in nude mice." PLoS One **5**(7): e11583.
- Venken, K. J. and H. J. Bellen (2005). "Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*." Nat Rev Genet **6**(3): 167-78.
- Verhaak, R. G., K. A. Hoadley, et al. (2010). "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1." Cancer Cell **17**(1): 98-110.
- Vidal, M. and R. L. Cagan (2006). "Drosophila models for cancer research." Curr Opin Genet Dev **16**(1): 10-6.
- Waddell, W. J., A. L. Wilk, et al. (1974). "Whole-body autoradiography of the distribution of beta-aminopropionitrile in pregnant mice and rat fetuses." Teratology **9**(2): 211-6.
- Wang, S. X., M. Mure, et al. (1996). "A crosslinked cofactor in lysyl oxidase: redox function for amino acid side chains." Science **273**(5278): 1078-84.
- Wang, X., J. Bo, et al. (2006). "Analysis of cell migration using whole-genome expression profiling of migratory cells in the *Drosophila* ovary." Dev Cell **10**(4): 483-95.
- Watson, K. L., R. W. Justice, et al. (1994). "Drosophila in cancer research: the first fifty tumor suppressor genes." J Cell Sci Suppl **18**: 19-33.
- Wen, P. Y. and S. Kesari (2008). "Malignant gliomas in adults." N Engl J Med **359**(5): 492-507.

- Westermarck, B., C. H. Heldin, et al. (1995). "Platelet-derived growth factor in human glioma." Glia **15**(3): 257-63.
- Westermarck, B. and A. Wasteson (1976). "A platelet factor stimulating human normal glial cells." Exp Cell Res **98**(1): 170-4.
- Witte, H. T., A. Jeibmann, et al. (2009). "Modeling glioma growth and invasion in *Drosophila melanogaster*." Neoplasia **11**(9): 882-8.
- Woegerbauer, M., D. Thurnher, et al. (2010). "Expression of the tetraspanins CD9, CD37, CD63, and CD151 in Merkel cell carcinoma: strong evidence for a posttranscriptional fine-tuning of CD9 gene expression." Mod Pathol **23**(5): 751-62.
- Wolburg, H. (1995). "Die Zellen des Nervensystems und ihre Verknüpfungen. In Pfeiffer, J., Schröder, J. und Paulus, W. (Hrsg.): Neuropathologie." Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **1. Auflage**: 5-11.
- Wood, W., C. Faria, et al. (2006). "Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*." J Cell Biol **173**(3): 405-16.
- Yamazaki, H., C. W. Xu, et al. (2011). "Regulation of cancer stem cell properties by CD9 in human B-acute lymphoblastic leukemia." Biochem Biophys Res Commun **409**(1): 14-21.
- Yan, H., D. W. Parsons, et al. (2009). "IDH1 and IDH2 mutations in gliomas." N Engl J Med **360**(8): 765-73.
- Yan, X., L. Ma, et al. (2010). "A CD133-related gene expression signature identifies an aggressive glioblastoma subtype with excessive mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(4): 1591-6.
- Yang, X. H., O. V. Kovalenko, et al. (2006). "Contrasting effects of EWI proteins, integrins, and protein palmitoylation on cell surface CD9 organization." J Biol Chem **281**(18): 12976-85.
- Yin, X., R. C. Baek, et al. (2006). "Evolution of a neuroprotective function of central nervous system myelin." J Cell Biol **172**(3): 469-78.
- Yu, J., T. F. Deuel, et al. (2000). "Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor-alpha activates c-Jun NH2-terminal kinase-1 and antagonizes PDGF receptor-beta -induced phenotypic transformation." J Biol Chem **275**(25): 19076-82.
- Yubero, N., A. Jimenez-Marin, et al. (2010). "Immunohistochemical distribution of the tetraspanin CD9 in normal porcine tissues." Mol Biol Rep **38**(2): 1021-8.
- Zöller, M. (2009). "Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis." Nat Rev Cancer **9**(1): 40-55.

8. Abkürzungsverzeichnis

µL	Mikrometer
A	Ampere
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAPN	β-Aminopropionitril
BRAF	<i>rat fibrosarcoma isoform B</i>
CD9	<i>cluster of differentiation 9</i>
CD133	<i>cluster of differentiation 133</i>
Cdk	cyclin dependent kinase
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
CRL	cytokine receptor-like domain
CTMP	<i>carboxyl-terminal modulator protein</i>
DAB	3,3',4,4'-Biphenyltetramine-tetrahydrochlorid
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DmLOXL1	<i>Drosophila melanogaster Lysyloxidase-like 1</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	extrazellulärer Loop
ECM	extracellular matrix (Extrazelluläre Matrix)

EDTA	Ethyl diamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERBB2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FBS	fetal calf serum
g	Gramm
G418 Sulfat	Neomycin
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HB-EGF	heparin-binding EGF-like Wachstumsfaktor
IDH	<i>isocitrate dehydrogenase</i>
kDa	Kilo-Dalton
L3	drittes Larvenstadium
LOX	Lysyloxidase
LOXL	Lysyloxidase-like
LTQ	Lysyl, Tyrosyl, Chinon
MDM	<i>mouse double minutes</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NF1	Neurofibromatose-Gen 1

p53	Tumorprotein 53
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	polymerase chain reaction
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PLA	<i>proximity ligation assay</i>
PI-3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PNS	Periphären Nervensystem
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pvr	PDGF- <i>and</i> VEGF receptor related
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
Ras	RAt Sarcoma
Rb	Retinoblastom-Protein
repo	reversed polarity
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptor Tyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase polymerase chain reaction
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Si	Signalpeptid
siRNA	small interfering RNA
SMCs	<i>smooth muscle cells</i>

SPARC	<i>secreted protein acidic and rich in cystein</i>
SrcR	scavenger receptor cysteinerich
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEMs	<i>tetraspanin enriched microdomains</i>
TM	Transmembrandomäne
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
TSP2A	Tetraspanin 2A
TGF β	transforming growth factor β
TSC	tuberous sclerosis complex
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren...

Herrn Prof. Paulus, für die Möglichkeit zur Erstellung meiner Dissertation im Institut für Neuropahtologie, die Bereitstellung eines spannenden Themas und die immer neuen Anregungen und Herausforderungen in den letzten drei Jahren.

Herrn Prof. Klämbt, für die erfolgreiche Kooperation mit Herrn Prof. Paulus bei der Stellung meines Dissertationsthemas und die immer freundliche externe Betreuung meiner Dissertation.

Herrn Prof. Gerke, für die spontane Bereitschaft, als Mitglied des Dissertationskomitees meiner Disputation beizuwohnen.

Den Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie, für die Beantwortungen vieler Fragen und die unermüdlichen Unterstützung im Laboralltag.

Frau Dr. Astrid Jeibmann, für die vielen Ratschläge und Aufmunterungen, die Pralinen, Schokokekse und diversen Kaltgetränke (natürlich spreche ich hier nur von Milch). Danke für deine unermüdliche Unterstützung beim Lösen von Problemen und Fragestellungen im Rahmen meiner Arbeit und darüber hinaus bei diversen Kneipenquizabenden.

Andrea Wagner, dafür dass sie mich praktisch adoptiert hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke für die vielen lustigen Tage im Labor, literweise Puffer und die schönen Gele! Deine direkte und positive Art hat mir so manchen nervigen Tag versüßt!

Astrid, Björn, Lars und Susan, für so manche Kaffee- oder Eispause in der nicht nur über weltbewegende Dinge diskutiert, sondern auch viel gelacht wurde!

Anja und Amke (natürlich beide mit Anhang), für viele schöne Stunden während der Arbeit (und auch danach). Mir fehlen unsere Abende in der WG am Hansaplatz mit rohem Fisch, leckerem Fleisch, Wein, Bier und Karaoke...und natürlich mit ein bis zwei angetrunkenen Wachtelhunden auf dem Sofa!

Amke und Verena, für das aufmerksame Durchlesen dieser Arbeit und die hilfreichen Ratschläge ☺

Alex, dafür dass du mir nicht nur ein guter Kollege und mein bester Freund warst, sondern vor allem dafür, dass du bescheuert genug bist dein Leben mit einer vollkommen verrückten, hartherzigen Hexe verbringen zu wollen!!!

Meinen Eltern, dafür dass sie immer hinter mir stehen egal was ich tue!

Lebenslauf

