

Untersuchungen zur Expression und Funktion der
Rezeptor-artigen Protein-Tyrosinphosphatase β / Protein-
Tyrosinphosphatase ζ (RPTP β /PTP ζ) und ihres Liganden
Pleiotrophin in humanen Glioblastomen

Dissertation

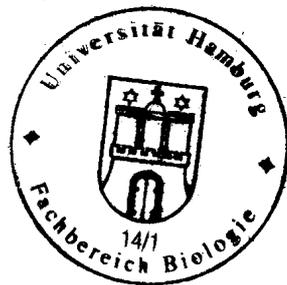
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Ulrike Ulbricht
aus Schwäbisch Hall

Hamburg 2005

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. M. WESTPHAL
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. L. RENWRANTZ
Tag der Disputation: 01. Juli 2005

Hamburg, den 17. Juni 2005



Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Für Arne und Lasse

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Klassisches Modell der Tumorentstehung.....	1
1.2	Gliome/Astrozytome.....	1
1.2.1	Das Glioblastom	3
1.2.2	Das Glioblastom unter molekulargenetischen Aspekten.....	3
1.2.3	Zellmigration und Angiogenese bei Gliomen.....	6
1.3	Protein-Tyrosinphosphatasen.....	7
1.3.1	Protein-Tyrosinphosphatase ζ (PTP ζ): Domänenstruktur und Spleißvarianten.....	9
1.3.2	Spezies-Homologe	12
1.3.3	Expressionsmuster und subzelluläre Lokalisation von PTP ζ	12
1.3.4	Modifikationen von PTP ζ	13
1.4	Ein wichtiger Ligand für PTP ζ : Pleiotrophin.....	15
1.4.1	Pleiotrophin: Struktur.....	15
1.4.2	Expression von Pleiotrophin.....	15
1.4.3	Pleiotrophin als Wachstums- und Angiogenesefaktor.....	16
1.4.4	Antagonisierung von Pleiotrophin.....	17
1.4.5	Rezeptoren von Pleiotrophin	17
1.5	Weitere Bindungspartner und Funktionen von PTP ζ	19
1.5.1	Zelladhäsion und bidirektionale Signalübertragung zwischen glialen und neuronalen Zellen	19
1.5.2	Intrazelluläre Bindungspartner und potenzielle Signalübertragungswege	21
1.5.2.1	PSD-95/SAP90	21
1.5.2.2	MAGI-3.....	21
1.5.2.3	β -Catenin.....	22
1.5.2.4	Git1/Cat-1.....	22
1.5.2.5	PTP ζ und Ionenkanäle.....	23
1.5.3	„Knock-out“-Mäuse	23
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	25
2	MATERIAL UND METHODEN.....	26
2.1	Material.....	26
2.1.1	Zelllinien.....	26
2.1.2	Tumor- und Normalhirnproben	26
2.1.3	Antikörper	27
2.1.4	Chemikalien.....	28
2.1.5	Geräte.....	29

2.2	Zellkulturtechniken	29
2.2.1	Auftauen von Zellen.....	29
2.2.2	Kultivierung von Zellen.....	30
2.2.3	Einfrieren von Zellen.....	30
2.3	Zellbiologische Methoden	31
2.3.1	Migrationsassay (modifizierter Boydenkammer-Assay).....	31
2.3.2	Proliferationsassay.....	32
2.4	Proteinchemische Methoden	32
2.4.1	Proteinlyse.....	32
2.4.1.1	Lysat aus Zellen.....	32
2.4.1.2	Lysat aus Tumorgewebe.....	33
2.4.1.3	Proteinextraktion für ELISA.....	33
2.4.2	Proteinbestimmung mit der Bicinchoninsäure-Methode (BCA-Methode).....	33
2.4.3	Proteinfällung nach Wessel & Flügge.....	34
2.4.4	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	34
2.4.5	Western Blotting.....	35
2.4.6	Proteindetektion mit Antikörpern.....	35
2.4.7	Entfernen von Antikörpern von der Membran (Stripping).....	36
2.4.8	Enzymatischer Verdau mit Chondroitinase ABC.....	36
2.4.9	Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA für Pleiotrophin.....	36
2.4.10	Immuncytochemie/Immunfluoreszenzfärbung.....	37
2.4.11	Immunhistochemie.....	37
2.5	Molekularbiologische Methoden	38
2.5.1	Herstellung von RNase-freiem Wasser.....	38
2.5.2	RNA-Isolation aus Tumorgewebe.....	38
2.5.3	RNA-Isolation aus Zellen.....	39
2.5.4	RT-PCR.....	39
2.5.5	PCR-Klonierung, Transformation und Plasmidisolierung.....	41
2.5.6	Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden durch <i>in vitro</i> -Transkription.....	42
2.5.7	Northern Blotting.....	43
2.5.8	Sondenhybridisierung.....	44
2.5.9	RNAi-Technologie.....	44
2.5.9.1	Transfektion synthetischer siRNA.....	45
2.5.9.2	Klonierung eines siRNA exprimierenden Vektors und stabile Transfektion.....	46
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Differenzielle Expression der Spleißvarianten von PTPζ in Astrozytomen und Normalhirn	48
3.1.1	cDNA-Array: Methodik und Ergebnisse.....	48
3.1.2	Expression von PTP ζ in astrozytärem Tumor- und Normalhirngewebe.....	49
3.1.3	Die Expression von PTP ζ ist in Glioblastomen hochreguliert.....	51
3.1.4	Hochregulation der kurzen PTP ζ -Rezeptorform.....	53
3.1.5	PTP ζ wird sowohl in Neuronen als auch in astrozytären Tumorzellen exprimiert.....	54

3.2	Expressionsmuster von PTPζ in humanen Glioblastomzelllinien.....	56
3.2.1	Nur wenige humane Glioblastomzelllinien exprimieren PTP ζ	56
3.2.2	Die kurze Rezeptorform PTP ζ -B wird auch auf Proteinebene nur in wenigen humanen Glioblastomzelllinien exprimiert.....	59
3.3	Expression von Pleiotrophin in humanen Astrozytomen und Normalhirn	60
3.3.1	Die Expression von Pleiotrophin ist in Glioblastomen hochreguliert.....	60
3.3.2	Hohe Expression von Pleiotrophin in niedriggradigen Astrozytomen.....	61
3.3.3	Lokalisation der Pleiotrophin-Expression auf astrozytären Tumorzellen und tumoreigenen Blutgefäßen.....	62
3.3.4	Expressionsmuster von Pleiotrophin und PTP ζ in primären und sekundären Glioblastomen	64
3.4	Überexpression von PTPζ in der humanen Glioblastomzelllinie G55T2.....	65
3.5	Nachweis von PTPζ in Rattengliomzellen C6.....	67
3.5.1	Spezifische Antikörper erkennen die kurze Rezeptorform PTP ζ -B aus Ratte.....	67
3.5.2	Posttranslationale Modifikation der kurzen Spleißvariante von PTP ζ	70
3.6	Die Effekte von Pleiotrophin auf die Migration von Glioblastomzellen	71
3.6.1	Die Gliomzellmigration wird chemotaktisch kaum von Pleiotrophin stimuliert.....	72
3.6.2	Starke haptotaktische Stimulation der Gliomzellmigration durch Pleiotrophin.....	73
3.6.3	Ein monoklonaler Antikörper gegen PTP ζ hemmt die haptotaktische durch Pleiotrophin stimulierte Migration von Rattengliomzellen C6.....	74
3.7	„Knockdown“ der PTPζ-Expression in humanen Glioblastomzellen durch RNA-Interferenz	76
3.7.1	Mehrere siRNAs hemmen die Expression von PTP ζ	77
3.7.2	Hemmung der Migration PTP ζ -defizienter Glioblastomzellen.....	79
3.7.3	Stabile Unterdrückung der Expression von PTP ζ in humanen Glioblastomzellen.....	80
3.7.4	Migrationsverhalten wenig PTP ζ exprimierender Glioblastomzellen.....	82
3.7.5	PTP ζ ist für die Zellproliferation wichtig.....	83
3.7.6	PTP ζ wird für das <i>in vivo</i> -Wachstum von Gliomzellen benötigt.....	84
3.7.7	Proliferative Aktivität PTP ζ -herabregulierter Gliomzellen <i>in vivo</i>	86
3.7.8	Apoptoserate <i>in vivo</i> gewachsener PTP ζ -reduzierter Gliomzellen.....	87
4	DISKUSSION	88
4.1	Expressionsanalysen von PTPζ und Pleiotrophin.....	88
4.1.1	Expression von PTP ζ	88
4.1.2	Expression von PTN.....	93
4.2	Die Rolle von Pleiotrophin und PTPζ bei der Gliomzellmigration	95
4.3	Pleiotrophin als Angiogenesefaktor in Glioblastomen	99
4.4	Versuch einer Überexpression der langen Rezeptorform von PTPζ in der humanen Glioblastomzelllinie G55T2.....	100

4.5	Knockdown des RNA-Transkripts von PTP ζ durch RNA-Interferenz	101
4.6	PTP ζ und Gliomzellproliferation.....	102
4.7	Ausblick.....	103
5	ZUSAMMENFASSUNG	105
6	LITERATUR	107
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	120

1 Einleitung

1.1 *Klassisches Modell der Tumorentstehung*

Gesunde Körperzellen stehen in ihrem Wachstum normalerweise unter einer strengen Kontrolle, die durch Kontaktinhibition reguliert wird. Eine wichtige Eigenschaft von Tumoren ist der Verlust dieses Merkmals: Tumorzellen zeigen unkontrollierte Proliferation. Sie sind häufig dedifferenziert, d. h. sie haben viele Eigenschaften embryonaler Zellen wieder angenommen, die Zelloberflächenproteine sind verändert und oft ist das Zytoskelett umgebaut oder reduziert. Die Zellkerne können in Form, Zahl und Größe atypisch sein. Der Übergang einer normalen Zelle in eine Tumorzelle wird als Transformation bezeichnet und ist ein Mehrstufenprozess, bei dem Tumorinitiation, Tumorpromotion und Tumorprogression fließend ineinander übergehen (Koolman & Röhm, 1998). Auslöser für den Prozess der Tumorentstehung ist die Schädigung des genetischen Zellmaterials, die z. B. durch kanzerogene Chemikalien, physikalische Einflüsse wie UV-Strahlung oder Viren hervorgerufen werden kann. DNA-Defekte wie Mutationen oder Deletionen der so genannten Proto-Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene sind daher oft der Ausgangspunkt der tumorigenen Entwicklung. Die Tumorpromotion stellt die bevorzugte Vermehrung einer durch Tumorinitiation geschädigten Zelle dar. Dieser Prozess läuft langsam ab und kann sich über viele Jahre hinziehen; er wird durch Faktoren wie Ernährung, Hormone und Alter beeinflusst (Schulte-Herrmann et al., 1994). Die Tumorprogression leitet schließlich in einem irreversiblen Vorgang durch Vermehrung der Population, Invasion und vielfach Metastasierung zu einem malignen Tumor über. Im Gegensatz zu den malignen infiltrierend wachsenden Tumoren weisen so genannte benigne Tumore noch langsam wachsende und besser differenzierte Zellen auf.

1.2 *Gliome/Astrozytome*

Gliome sind mit über 60% aller primären Hirntumore die am häufigsten auftretenden hirneigenen Tumore beim Menschen. Die Namensgebung basiert auf einer morphologischen Ähnlichkeit zu reifen Gliazelltypen. Als Hauptgruppen werden demnach Astrozytome, Oligodendrogliome und Ependymome unterschieden. Astrozytome sind die häufigsten Gliome. Sie weisen astrozytäre Differenzierungsmerkmale auf; ihre eigentliche zelluläre Herkunft ist jedoch ungeklärt. Möglicherweise stammen Astrozytome von differenzierten Gliazellen, oder

aber von Stamm- bzw. Progenitorzellen ab, die sich auch im adulten zentralen Nervensystem noch finden lassen. Eine Haupteigenschaft der Astrozytome ist die starke Infiltration benachbarter und weiter entfernt liegender Hirnregionen, weshalb sie auch als diffus infiltrierende Astrozytome bezeichnet werden.

Die Weltgesundheitsorganisation WHO (World Health Organization) teilt die Astrozytome in vier Malignitätsgrade ein, die in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 1) aufgeführt sind:

Tabelle 1. Einteilung der Astrozytome nach der WHO Klassifikation (nach Kleihues und Cavenee, 2000).

WHO Grad	WHO Klassifikation	Prognose*
I	Pilozytisches Astrozytom	meist heilbar
II	Diffuses Astrozytom	ca. 6-8 Jahre
III	Anaplastisches Astrozytom	ca. 3 Jahre
IV	Glioblastom	ca. 11 Monate

* Die Prognose bezeichnet die mittlere Überlebensdauer ab Stellung der Diagnose.

Die als pilozytische Astrozytome WHO Grad I eingestuft Tumore nehmen eine Sonderstellung unter der Astrozytomen ein. Sie treten vor allem bei Kindern auf und sind im Gegensatz zu den übrigen Astrozytomen oft gut begrenzt, vollständig resezierbar und damit heilbar.

Die nachfolgenden Gliome (WHO Grad II-IV) infiltrieren alle diffus das Hirnparenchym und sind bis auf extrem seltene Ausnahmen nicht heilbar.

Diffuse Astrozytome vom Grad II werden auch als niedriggradige Astrozytome bezeichnet. Sie bestehen aus relativ gut differenzierten, jedoch diffus infiltrierenden astrozytären Tumorzellen. Anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) werden bereits als hochgradige maligne Astrozytome eingestuft. Sie entstehen entweder *de novo* oder aus diffusen Astrozytomen durch Dedifferenzierung. Charakteristisch für anaplastische Astrozytome sind eine erhöhte Zelldichte und mitotische Aktivität, jedoch keine Nekrosen oder mikrovaskulären Proliferate.

Glioblastome (WHO Grad IV) sind die bösartigsten und zugleich die am häufigsten auftretenden Astrozytome. Sie können aus diffusen oder anaplastischen Astrozytomen hervorgehen oder *de novo* entstehen (Kleihues & Cavenee, 2000). Da molekulare Vorgänge in Glioblastomen das Hauptthema dieser Arbeit darstellen, wird im Folgenden näher auf diese Tumorform eingegangen.

1.2.1 Das Glioblastom

Trotz chirurgischer Entfernung eines Glioblastoms mit anschließender Bestrahlung und oft auch Chemotherapie beträgt die mittlere Überlebenszeit für Glioblastompatienten weniger als ein Jahr. Diffus infiltrierendes Wachstum und schnelle Migration der Tumorzellen verhindern die vollständige Entfernung des Tumors und führen unweigerlich zur Bildung von Rezidiven. Rezidive können an der gleichen Stelle oder in einem anderen Bereich des Gehirns auftreten und sind die Hauptursache für die schlechte Überlebensprognose (Kleihues & Cavenee, 2000). Mit 12-15% aller intrakraniellen Neoplasien und 50-60% aller astrozytären Tumore ist das Glioblastom außerdem der am häufigsten auftretende hirneigene Tumor überhaupt (Schlegel et al., 2003). An einem Glioblastom können Personen aller Altersgruppen erkranken, jedoch finden sich zwei Altersgipfel, nämlich etwa bei 40 und bei 60 Jahren. Männer sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Westphal & Herrmann, 1999).

Glioblastome entstehen meistens als primäre Glioblastome *de novo* oder seltener durch progressives Wachstum aus diffusen Astrozytomen (WHO Grad II) oder anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III); letztere werden dann sekundäre Glioblastome genannt. Primäre Glioblastome entstehen eher bei älteren Menschen - der Durchschnitt liegt bei etwa 55 Jahren - und bilden sich sehr rasch. Sekundäre Glioblastome entstehen meist viel langsamer - in Zeitabständen zwischen 1 und 10 Jahren - und treten häufiger bei jüngeren Patienten (unter 45 Jahren) auf.

1.2.2 Das Glioblastom unter molekulargenetischen Aspekten

Glioblastome sind zellreich, bestehen aus pleomorphen, d. h. mehrgestaltigen Tumorzellen mit astrozytären Differenzierungsmerkmalen und werden über Nekrosen und/oder mikrovaskuläre Gefäßproliferate diagnostiziert. Trotz ihres gleichartigen Phänotyps unterscheiden sich primäre Glioblastome durch eine Reihe molekulargenetischer Charakteristika von sekundären Glioblastomen (Abb. 1).

Das Gen für den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR ist in mehr als einem Drittel der primären Glioblastome amplifiziert und wird bei etwa 60% auch überexprimiert (Libermann et al., 1985). Der Rezeptor spielt in der Kontrolle der Zellproliferation eine wichtige Rolle. Durch Überexpression und Amplifikation, manchmal auch durch Trunkierung, also der Expression nur eines Teils des Rezeptors, bleibt das Signal, das vom Liganden EGF ausgeht, konstitutiv aktiviert und führt zu unkontrollierter Proliferation (Wong et al., 1992).

Die für Tumore typische Mutation des Tumorsuppressorgens p53 wird dagegen vorwiegend in sekundären Glioblastomen gefunden. EGFR-Überexpression und Mutation von p53 schließen sich dabei tendenziell - wenngleich nicht zu 100 Prozent - gegenseitig aus (Watanabe et al., 1996). Über 65% der sekundären Glioblastome weisen eine p53-Mutation auf (Watanabe et al., 1997). Die regulative Funktion, die das Genprodukt von p53 als Transkriptionsfaktor über den Zellzyklus und die Apoptose ausübt, liegt in seiner DNA-bindenden Domäne. In dieser Sequenz treten die häufigsten Mutationen auf und bringen so die Zelle aus ihrem Wachstums- und Proliferationsgleichgewicht. Die nachfolgende Abbildung zeigt schematisch die genetischen Veränderungen in primären und sekundären Glioblastomen:

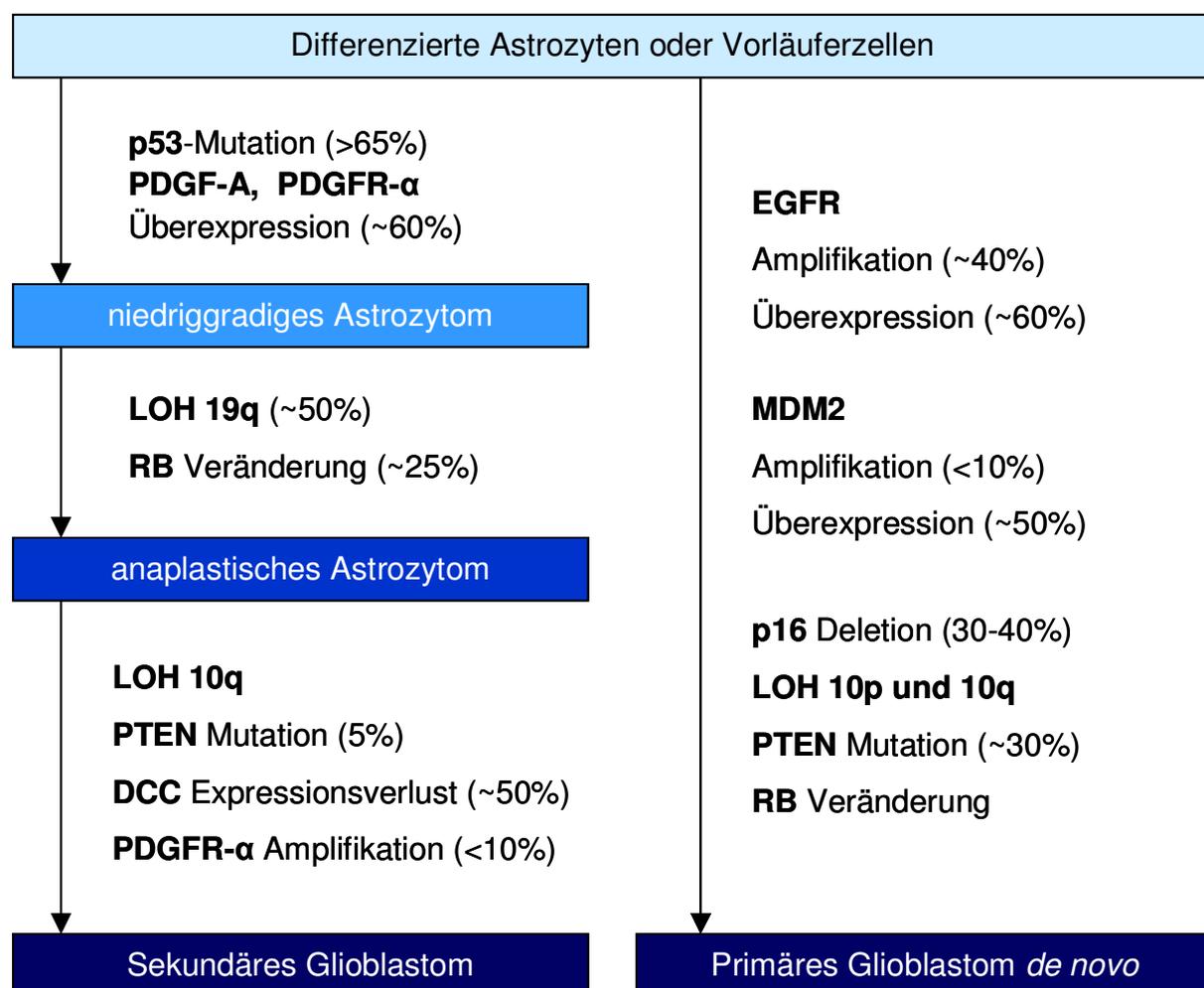


Abbildung 1. Genetische Veränderungen in primären und sekundären Glioblastome.

Abb. verändert nach Kleihues & Ohgaki, 1999.

Ein Gen, das durch p53 reguliert wird, ist MDM2 (mouse double minute 2). Wird es exprimiert, bildet das MDM2-Protein mit dem p53-Protein einen Komplex und verhindert so dessen Funktion als Transkriptionsfaktor. Auf diese Weise fungiert es seinerseits als negativer Regulator für die p53-Expression (Momand et al., 1992). Durch Amplifikation und Überexpression von MDM2 geht somit die Kontrolle von p53 über das Zellwachstum verloren. In sekundären Glioblastomen werden weder Amplifikation noch Überexpression von MDM2 gefunden, dafür weisen etwa 8% der primären Glioblastome eine Amplifikation des Gens auf, etwa 50% zeigen eine erhöhte Expression von MDM2 (Biernat et al., 1997a).

Schon im frühen Stadium der progredienten Entwicklung des sekundären Glioblastoms - in den Astrozytomen Grad II - wird eine Überexpression des Proto-Onkogens PDGFR- α (platelet-derived growth factor receptor) oder seines Liganden PDGF gefunden (Hermanson et al., 1996). Der Wachstumsfaktor ist ein Mitogen für Bindegewebs- und Gliazellen und wird von den Rezeptor-Tyrosinkinasen PDGFR- α und PDGFR- β erkannt (Claesson-Welsh, 1994).

Während des Übergangs zum Astrozytom Grad III treten dann auch chromosomale Veränderungen auf - wie der Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH) auf dem Chromosomenarm 19q (von Deimling et al., 1994). Diese Veränderung ist typisch für den fortschreitenden Verlauf bei der Bildung sekundärer Glioblastome.

Bei etwa 50% der sekundären Glioblastome kommt es zum Verlust des Tumorsuppressorgens DCC (deleted in colorectal cancer), einem Zelloberflächenrezeptor der Ig-Superfamilie, der während der Entwicklung des zentralen Nervensystems zusammen mit anderen Rezeptorkomponenten wichtige Funktionen bei der Axonleitung und Zellmigration übernimmt (Reyes-Mugica et al., 1997).

Mutationen des auf Chromosom 10q22 gelegenen Tumorsuppressorgens PTEN treten fast ausschließlich in primären Glioblastomen auf (>30%) und kaum in sekundären Glioblastomen (5%; Tohma et al., 1998). Das PTEN-Genprodukt (phosphatase and tensin homology, auch genannt MMAC1 mutated in multiple advanced cancers) ist eine kleine intrazelluläre Protein-Tyrosinphosphatase, die über die Dephosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) direkten Einfluss auf die Regulation von Zellmigration und -invasion nimmt (Tamura et al., 1998). Außerdem ist PTEN in der Lage, die phosphorylierten Substrate (PI(3,4)P₂ und PIP₃) der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) spezifisch zu dephosphorylieren und übt damit eine wichtige Regulationsfunktion auf Zellproliferation und Apoptosehemmung der Zelle aus (Maehama & Dixon, 1998).

P16 ist ein Protein, das während des Zellzyklus durch Hemmung der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 die G₁/S-Phasen-Transition gestattet (Serrano et al., 1993). In etwa einem Drittel der primären Glioblastome, jedoch nur in ca. 4% der sekundären Glioblastome, ist p16

deletiert, wodurch die Kontrolle über den Zellzyklus verloren geht und die Zelle unkontrolliert proliferieren kann (Biernat et al., 1997b).

1.2.3 Zellmigration und Angiogenese bei Gliomen

Körperzellen können sich durch zielgerichtete Wanderung (=Migration) bewegen. Auf der Oberfläche ihrer Zellmembranen befinden sich Rezeptoren für Signalmoleküle, die sich in löslicher oder unlöslicher Form in der extrazellulären Matrix befinden können. Lösliche Faktoren wie z. B. Zytokine oder Wachstumsfaktoren bilden in wässriger Umgebung einen Gradienten aus, in deren Richtung sich die Zellen, die mit den jeweiligen Rezeptormolekülen ausgestattet sind, bewegen. Diesen Vorgang nennt man positive Chemotaxis. Zellen, die entgegen eines Konzentrationsgradienten wandern, zeigen negative Chemotaxis (Van Haastert & Devreotes, 2004). Substratgebundene Signalmoleküle, die z. B. fest an der extrazellulären Matrix oder einer Zellmembran haften, können ebenfalls einen Gradienten ausbilden und dadurch die so genannte Haptotaxis induzieren. Eine Möglichkeit, die Chemotaxis bzw. Haptotaxis bei Zellen zu messen, besteht in der Verwendung des unter 2.3.1. beschriebenen Boydenkammer-Assays (Bock & Mrowitz, 2001; Camp et al., 1991).

In Gliomen stellt sich die Situation für die Zellen so dar, dass diese verschiedenen Gradienten löslicher und unlöslicher Moleküle ausgesetzt sind. Diese Substanzen vermitteln eine Vielzahl migrationsstimulierender Signale, worauf die Gliomzellen mit Invasion und Endothelzellen mit Angiogenese reagieren (siehe Abschnitt unten).

Wandernde Zellen bilden in Migrationsrichtung Filopodien aus, deren F-Aktin-Fasern sich bei Anheftung an die extrazelluläre Matrix zu Lamellipodien verbinden (Webb et al., 2002). Es bilden sich fokale Adhäsionsstellen aus, die an Zugfasern verankert werden. Durch Kontraktion dieser Zugfasern kann sich die ganze Zelle nach „vorne“ bewegen. Am „hinteren“ Ende der Zelle werden gleichzeitig anheftende Strukturen aufgelöst.

Migrierende Tumorzellen müssen die aus mehreren Basalmembranen und interstitiellem Gewebe aufgebaute extrazelluläre Matrix durchqueren. Diese besteht aus einem komplexen Netzwerk verschiedener Kombinationen von Kollagenen, Proteoglykanen, Hyaluronsäure, Fibronektin und Lamininen, die von den Tumorzellen durch Ausschüttung von Proteinasen (z. B. Metalloproteinasen) degradiert wird (Sternlicht & Werb, 2001).

Proliferierende Tumorzellen sind zur Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff auf die Nähe zu Blutgefäßen angewiesen. Dies erreicht der Tumor durch Angiogenese, d. h. durch die Bildung neuer Blutgefäße. Die Tumorzellen erhalten dadurch einen Kontakt zu Endothelzellen und

Leukozyten, die ihrerseits pro-invasive Metalloproteinasen und Chemokine ausschütten (Coussens & Werb, 2002). Um Angiogenese zu induzieren, produzieren und sezernieren Tumorzellen vermehrt pro-angiogene Peptide und Proteine, so genannte Angiogenesefaktoren. Auslöser für diesen „Schalter“ („angiogenic switch“) sind teilweise voneinander abhängige Faktoren wie Hypoxie, niedriger pH-Wert, Hypoglykämie, Entzündungsreaktionen oder genetische Mutationen (Folkman & Shing, 1992; Mentlein & Held-Feindt, 2003).

1.3 Protein-Tyrosinphosphatasen

Für viele physiologische Vorgänge in der Zelle ist die Tyrosinphosphorylierung, die durch koordiniertes Zusammenspiel von Protein-Tyrosinkinassen und Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPasen) kontrolliert wird, ein entscheidender Kontrollmechanismus. Darunter fallen wichtige Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Stoffwechsel, Zellzyklus und Migration. Lange Zeit wurde den Protein-Tyrosinkinassen die Hauptrolle bei der Regulation der Tyrosinphosphorylierung zugesprochen, die Protein-Tyrosinphosphatasen spielten dabei aufgrund ihrer geringen Zahl und angeblicher Unspezifität nur die Rolle unbedeutender Haushaltsgene („housekeeping“-Gene; Tonks & Neel, 1996). Jedoch bilden die Protein-Tyrosinphosphatasen (EC 3.1.3.48) eine große Familie von Phosphatasen mit einem unerwartet großen Spektrum hinsichtlich Struktur und Spezifität. Charakteristisch und namensgebend ist die in allen Protein-Tyrosinphosphatasen vorkommende PTPase-Domäne, die etwa 240 Aminosäuren umfasst, von denen 40 hochkonserviert sind (Krueger et al., 1990).

Wie die Protein-Tyrosinkinassen existieren die klassischen Protein-Tyrosinphosphatasen als transmembranäre Rezeptor-artige Protein-Tyrosinphosphatasen und als nicht-membranständige intrazelluläre Formen (Neel & Tonks, 1997). Etwa 75 solcher Phosphatasen sind bislang identifiziert worden, aber die Sequenzierung des menschlichen Genoms verspricht aufgrund von Homologievergleichen die Existenz von bis zu 500 humanen PTPasen. Die bis heute bekannten humanen Protein-Tyrosinphosphatasen wurden seit Ende der 80er Jahre bis heute entdeckt. Auf die Protein-Tyrosinphosphatasen, die keine Rezeptorfunktion ausüben, sowie auf die Phosphatasen dualer Spezifität („dual-specificity phosphatasen“) und die Phosphatasen niedrigen Molekulargewichtes („low molecular weight phosphatasen“, darunter z. B. PTEN) soll hier nicht weiter eingegangen werden, da die in der vorliegenden Arbeit untersuchte PTP ζ zur Gruppe der Rezeptor-artigen PTPasen gehört.

Die in der nachfolgenden Abbildung dargestellten extrazellulären Regionen der Rezeptor-artigen Protein-Tyrosinphosphatasen setzen sich aus vielfältigen Strukturmotiven zusammen:

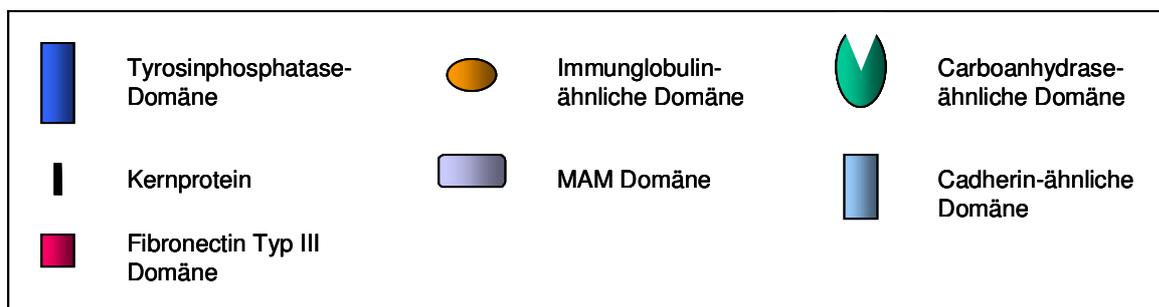
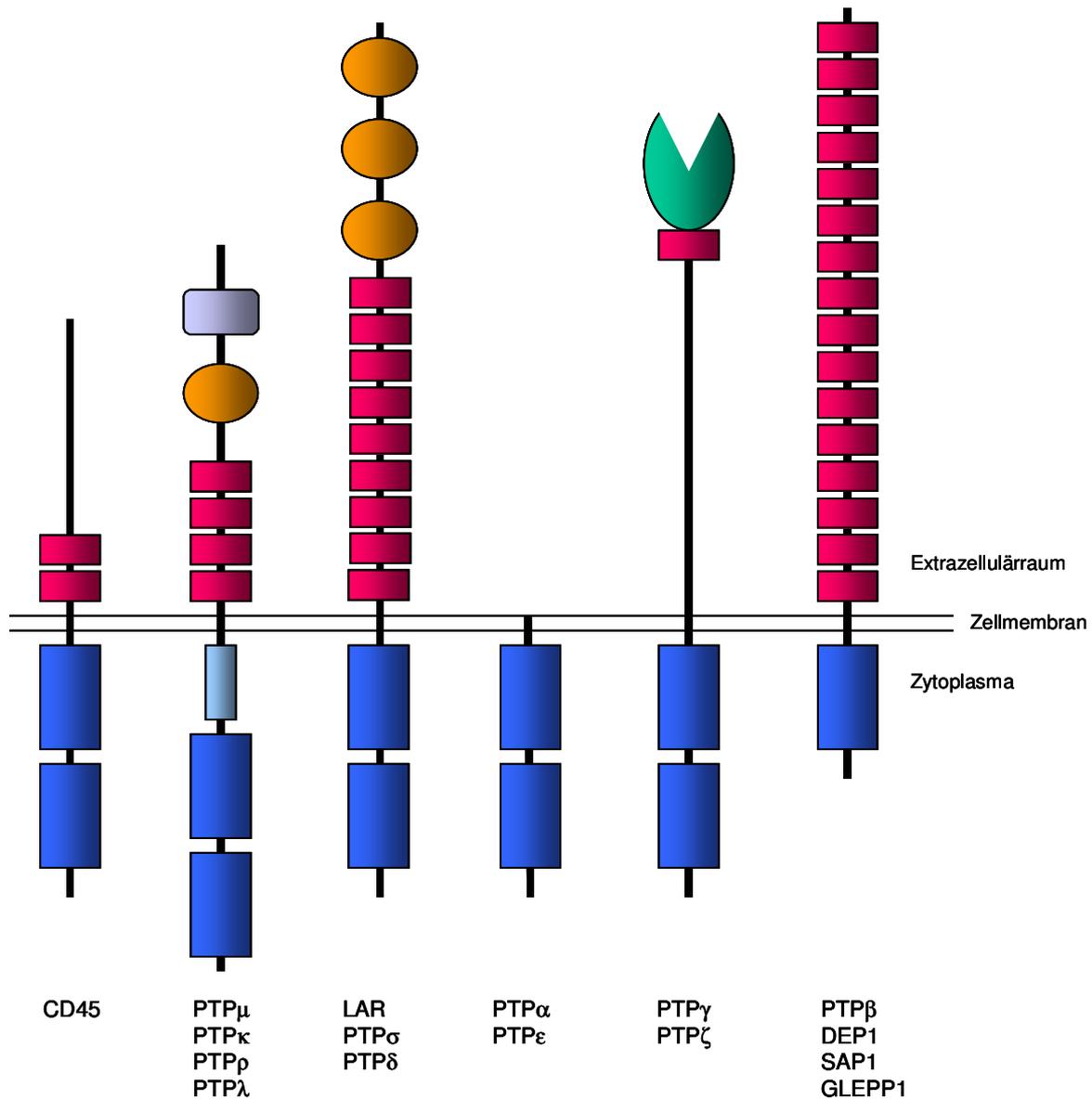


Abbildung 2. Familie der Rezeptor-Tyrosinphosphatasen.

Die zahlreichen Unterschiede in den Strukturen sind im Kasten aufgelistet. Abbildung verändert nach Tonks & Neel, 2001.

Wiederkehrende Motive sind vor allem Immunglobulin- (Ig-)ähnliche Domänen und Fibronectin Typ III-Domänen (FNIII), die in stark unterschiedlicher Zahl und Zusammensetzung vorkommen. Durch einzelne Strukturmodule werden bestimmte Bindungsarten impliziert. PTP μ und PTP κ beispielsweise nehmen durch ihre Ig-ähnlichen und FNIII-Domänen an homophilen Interaktionen teil (Tonks & Neel, 2001). Diese Domänen finden sich auch bei Zelladhäsionsmolekülen und Molekülen der extrazellulären Matrix und stellen damit einen Zusammenhang mit der Regulation von Zell-Zell-Kontakten und der Zellmigration her (Brady-Kalnay & Tonks, 1995). Die spezifischen Liganden der meisten RPTPasen sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Bis auf die Ausnahme von PTP β (Abb. 2) besitzen alle Protein-Tyrosinphosphatasen zwei intrazellulär liegende PTPase-Domänen (D1 und D2), von denen meist nur die näher an der Membran liegende (D1) funktionell ist.

Allen klassischen PTPasen ist das Signalmotiv HCSAGxGRxG gemeinsam (Tonks & Neel, 2001), das für den gemeinsamen katalytischen Mechanismus essenziell ist. Der konservierte Cysteinrest führt dabei einen nukleophilen Angriff auf den Phosphatrest des Substrats aus, was zur Bildung eines Thiophosphat-Intermediats führt. Ein Asparaginsäurerest protoniert dabei die Phenolatgruppe des Substrats und aktiviert danach ein Wassermolekül, um das Thiophosphat-Intermediat zu hydrolysieren (Pannifer et al., 1998).

1.3.1 Protein-Tyrosinphosphatase ζ (PTP ζ): Domänenstruktur und Spleißvarianten

Die cDNA der Protein-Tyrosinphosphatase ζ wurde von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen in den USA kloniert. Die unterschiedliche Namensgebung hat dort ihren Ursprung: Die New Yorker Gruppe (Krueger & Saito, 1992) nannte ihre aus einer fetalen Hirn-cDNA-Bibliothek klonierte Sequenz Protein-Tyrosinphosphatase ζ (PTP ζ), während die Arbeitsgruppe aus Boston (Levy et al., 1993) der von ihnen klonierten Sequenz den Namen Rezeptor-artige („receptor-type“) Protein-Tyrosinphosphatase β (RPTP β) gab. Im Folgenden wird der kürzere und unmissverständlichere Name PTP ζ verwendet. RPTP β kann leicht mit der Abkürzung für die humane Protein-Tyrosinphosphatase β (HPTP β oder PTP β) verwechselt werden.

Das Gen von PTP ζ ist auf Chromosom 7q31.3 lokalisiert, wie durch somatische Zellhybridkartierung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bestätigt wurde (Ariyama et al., 1995). Auf dem gleichen Chromosomenarm – auf 7q33-34 – befindet sich auch das Gen für Pleiotrophin, einem Liganden von PTP ζ (Li et al., 1992a).

Die Größe und primäre Struktur der Protein-Tyrosinphosphatase ζ wurde von beiden Gruppen gleich beschrieben. Die humane PTP ζ hat einen offenen Leserahmen, der 2307 Aminosäuren umfasst. Dies entspricht einem Protein von etwa 250 kDa. PTP ζ ist ein Transmembranprotein vom Typ I, d. h. der Amino-Terminus befindet sich außerhalb der Zelle, der Carboxy-Terminus im Zellinneren. Als neue und für die beiden Rezeptor-PTPasen PTP γ und PTP ζ charakteristische Sequenz wurde eine dem Enzym Carboanhydrase ähnliche Domäne („CAH-like domain“) beschrieben (Abb. 3, grün). 280 Aminosäuren am N-Terminus konnten mit mehreren Isoformen der Carboanhydrase (EC 4.2.1.1) in Homologie gebracht werden (Barnea et al., 1993).

Funktionelle Carboanhydrasen enthalten in ihrem aktiven Zentrum ein von drei Histidinresten komplex gebundenes Zinkion. In der CAH-Domäne von PTP ζ sind zwei der drei Histidinreste jedoch durch Threonin und Glutamin ersetzt, so dass Zink nicht binden kann; die CAH-Domäne ist also enzymatisch nicht funktionell und wurde deshalb CAH-ähnliche Domäne genannt. Interessant jedoch ist die durch Röntgenstrukturvergleiche beschriebene hydrophobe Tasche, in die bei enzymatisch aktiven Carboanhydrasen kleine hydrophobe Moleküle binden können (z. B. CO₂). Diese ist auch in der CAH-Region von PTP ζ noch vorhanden und könnte als neue mögliche Bindungsstelle für kleine ebenfalls hydrophobe Peptidstücke, z. B. Teile eines Liganden dienen.

Im Anschluss an die CAH-Domäne folgt eine Fibronectin Typ III ähnliche Sequenzwiederholung (FNIII; Abb. 3, rot), die durch eine lange cysteinfreie Spacerregion (Abb. 3, grau) mit der Transmembranregion und dem zytoplasmatischen Bereich verbunden ist. Das charakteristische Merkmal von Fibronectin Typ III-Homologiedomänen ist die aus etwa 90 Aminosäuren bestehende Sequenz mit konservierten Tryptophanresten im N-terminalen und konservierten Tyrosinresten im C-terminalen Bereich, jedoch ohne konservierte Cysteinreste.

Die beiden namensgebenden Phosphatasedomänen D1 und D2 befinden sich im zytoplasmatischen Bereich, am C-terminalen Ende des Moleküls (Abb. 3, blau).

Durch alternatives Spleißen entstehen mehrere Isoformen des Moleküls (vgl. Schema Abb. 3).

Die lange Variante von PTP ζ (PTP ζ -A, „long form“ oder „full length form“) besteht aus allen oben genannten Domänen und ist extrazellulär stark mit Chondroitinsulfat-Seitenketten modifiziert. Auf die posttranslationalen Modifikationen wird in Kapitel 1.3.4 näher eingegangen.

Der in die extrazelluläre Matrix sezernierten Form von PTP ζ , die als PTP ζ -S, Phosphacan oder 6B4-Proteoglykan bezeichnet wird, fehlt der gesamte intrazelluläre Bereich. Die extrazelluläre Domäne von PTP ζ ist mit Phosphacan identisch. Phosphacan war unabhängig von PTP ζ gefunden worden, die Identität wurde erst nach Klonierung von PTP ζ festgestellt (Maurel et al., 1994).

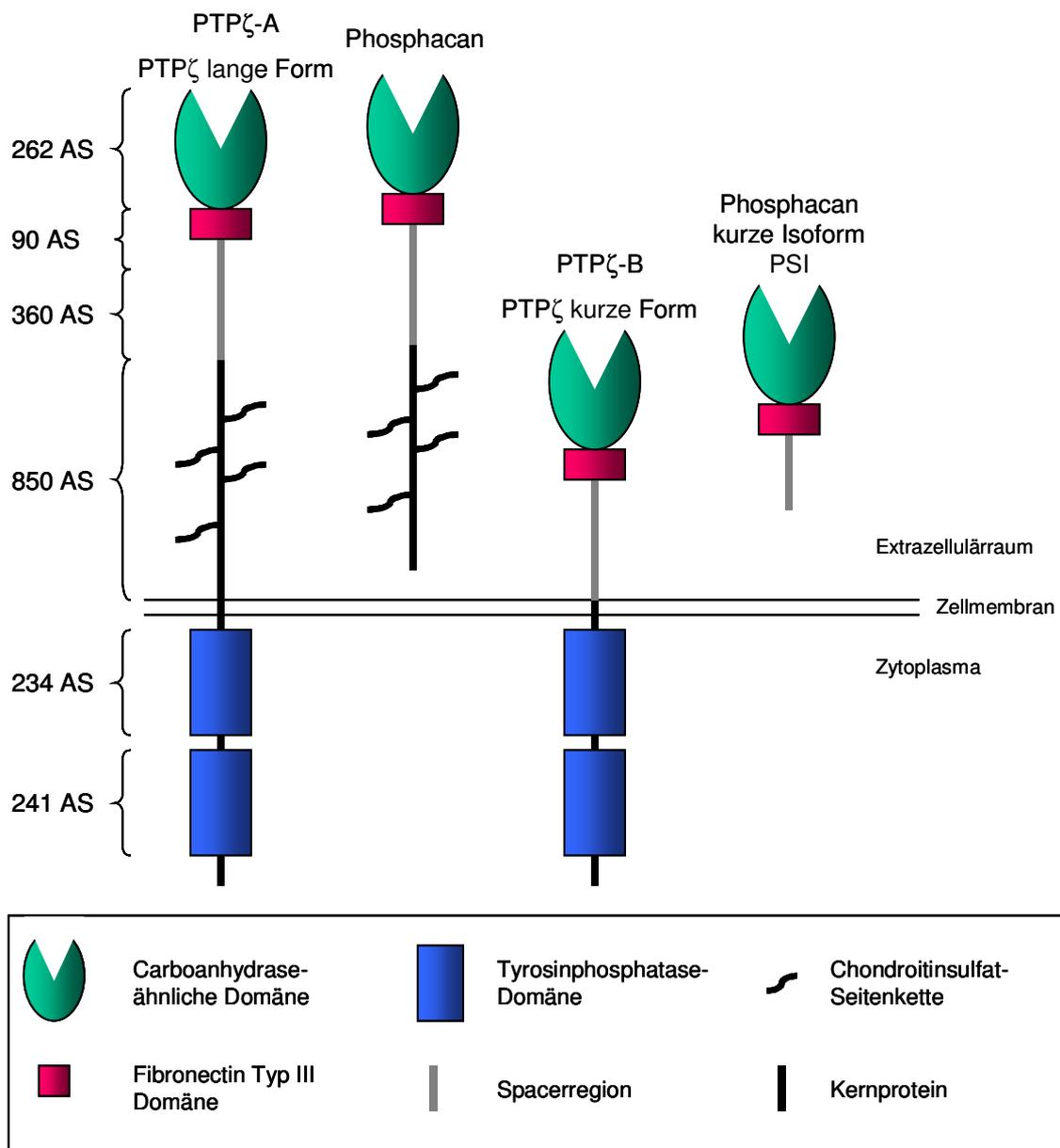


Abbildung 3. Schematische Darstellung der bekannten Spleißvarianten von PTPζ.

Bei allen Spleißvarianten sind die Carboanhydrase-ähnliche Domäne, die Fibronectin Typ III Domäne und die Spacerregion vorhanden. Die lange Form von PTPζ (PTPζ-A) und die sezernierte Form Phosphacan sind stark posttranslational modifiziert. Durch Verlust einer extrazellulären membrannahen Domäne entsteht die kurze Spleißvariante PTPζ-B. Bei der kürzlich entdeckten kurzen Isoform von Phosphacan PSI endet die Sequenz bereits 196 Aminosäurereste nach der FNIII-Domäne, d.h. die Spacerregion ist nicht vollständig vorhanden. Aus den Primärstrukturen lassen sich ohne posttranslationale Modifikationen folgende Molekulargewichte der einzelnen Spleißvarianten errechnen: PTPζ lange Form: 254,5 kDa, Phosphacan: 175 kDa, PTPζ kurze Form: 164,4 kDa, Phosphacan kurze Isoform: 67,1 kDa. AS: Aminosäuren. Abb. verändert nach Garwood et al., 2003.

Der kurzen Spleißvariante von PTPζ (PTPζ-B oder „short form“) fehlen 860 Aminosäuren der extrazellulären Region. Das Kernprotein ist daher etwa 160 kDa groß. Die kleinste Spleißvariante

ist eine verkürzte Phosphacanvariante („phosphacan short isoform“; PSI), bei der die CAH- und die FNIII-Domäne, sowie die Hälfte der Spacerregion vorhanden sind. PSI ist nur etwa 90 kDa groß und wird wie Phosphacan in die extrazelluläre Matrix sezerniert (Garwood et al., 2003).

1.3.2 Spezies-Homologe

Das Maus-Homolog von Phosphacan heißt DSD-1-PG und gleicht sowohl in Expression als auch in Regulation dem Ratten-Phosphacan (Garwood et al., 1999). Im Rattenhirn existieren die gleichen Spleißformen wie in humanem Gewebe: Phosphacan und PTP ζ in langer sowie kurzer Variante.

In *Drosophila melanogaster* und *Xenopus* gibt es ebenfalls transmembranäre Protein-Tyrosinphosphatasen. In *Xenopus* wurden 13 mRNA Spleißvarianten gefunden, die alle hohe Strukturähnlichkeit zu den charakteristischen Domänen wie CAH-Region, FNIII-Region und den Phosphatasedomänen aufweisen (Nagata et al., 2001). Zwei Spleißvarianten können als Homologe von Phosphacan, der extrazellulären Domäne der humanen PTP ζ , angesehen werden, da sie keinen transmembranären oder intrazellulären Teil enthalten. Die Expression wurde sowohl im Northern als auch Western Blot als spezifisch für das zentrale Nervensystem erkannt und ist entwicklungsabhängig und gewebespezifisch reguliert. Außerdem sind einige Varianten Chondroitinsulfat-Proteoglykane, was die enge Verwandtschaft mit der langen Form der humanen PTP ζ erkennen lässt.

1.3.3 Expressionsmuster und subzelluläre Lokalisation von PTP ζ

PTP ζ wurde bei der Klonierung nur im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert gefunden (Krueger & Saito, 1992; Levy et al., 1993). Dort erfüllt PTP ζ auch seine bislang nachgewiesenen wichtigsten Funktionen. Im peripheren Nervensystem (PNS) konnte PTP ζ in Schwann-Zellen nachgewiesen werden (Thomaidou et al., 2001). Zwei Arbeitsgruppen konnten PTP ζ darüber hinaus in humanen Melanomen bzw. in kolorektalen Tumorzellen nachweisen (Goldmann et al., 2000; Yamakawa et al., 1999).

Sowohl immunhistochemisch als auch durch in situ-Hybridisierungen wurde gefunden, dass PTP ζ in embryonalen Neuronen im zentralen Nervensystem vorkommt (Canoll et al., 1996), und zwar in Dendriten von pyramidalen Neuronen des Hippocampus und des Cortex (Kawachi et al., 1999). Im Embryonalstadium wird PTP ζ außerdem in radialen Gliazellen und postnatal weiterhin

von Astrozyten im Hippocampus exprimiert (Sakurai et al., 1996; Shintani et al., 1998). Auch in Progenitorzellen von Oligodendrozyten konnte PTP ζ nachgewiesen werden (Ranjan & Hudson, 1996; Canoll et al., 1996).

In Mäusen, in denen das PTP ζ -Gen durch das lacZ-Gen ersetzt worden war, wurde die Expression von LacZ (β -Galactosidase) im zentralen Nervensystem schon ab dem Embryonaltag E8,5 detektiert. (Shintani et al., 1998). Während der Embryonalentwicklung von Tag E12 bis E16 steigt die Expression von Phosphacan in sich entwickelnden Faserbündeln in einem radialen Muster ausgehend von der Ventrikelzone stark an. Die Rezeptor-Spleißvarianten von PTP ζ sind dabei in radialen Gliazellen lokalisiert (Sakurai et al., 1996). Nur die Expression der kurzen Rezeptorform von PTP ζ bleibt von Embryonaltag E13 an bis zur adulten Reife konstant. Die lange Rezeptorform und Phosphacan werden im Embryonalstadium sehr stark exprimiert, und während die Expression der langen Form postnatal sehr schnell abnimmt, verringert sich die Expression von Phosphacan nur sehr langsam. Im adulten Hirn besteht dann weiterhin eine hohe Expression von Phosphacan (Nishiwaki et al., 1998).

Durch Überexpressionsstudien in neuronalen Ratten-L-Zellen konnte die subzelluläre Lokalisation der kurzen und langen Spleißvariante von PTP ζ genauer untersucht werden. Die kurze Form wurde hauptsächlich in Membranen („ruffling membranes“) und Zellfortsätzen zusammen mit F-Aktin am Zellrand gefunden, nicht dagegen auf Zugfasern. Die lange Form konnte ebenfalls in Membranen, den Wachstumskegeln, filopodienartigen Zellfortsätzen und der Zellperipherie entdeckt werden (Nishiwaki et al., 1998). Diese Beobachtungen sowie die Hochregulation der Expression von PTP ζ im Embryonalstadium geben Hinweise auf eine mögliche Rolle von PTP ζ bei der Zellmigration.

1.3.4 Modifikationen von PTP ζ

PTP ζ wurde als transmembranäres Chondroitinsulfat-Proteoglykan (CSPG) mit einem 380 kDa großen Kernprotein identifiziert (Barnea et al., 1994). Bei Proteoglykanen handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die sulfatierte Glykosaminoglykane (GAGs) tragen und damit die extrazelluläre Matrix und viele Wachstumsfaktoren binden können. Im frühen postnatalen Rattenhirn wurden durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation, wodurch Proteoglykane von anderen Proteinen getrennt werden, mehrere Proteoglykan-haltige Protein-Tyrosinphosphatasen gefunden, darunter auch PTP ζ (Maeda et al., 1994). Phosphacan wurde ebenso als Chondroitinsulfat-Proteoglykan identifiziert (Shitara et al., 1994). Für die vier Chondroitinsulfat-

Seitenketten wurden entsprechende potenzielle Modifikationspositionen identifiziert. CS-Seitenketten heften sich über O-Glykosylierungen bevorzugt an die Serinreste in den Sequenzfolgen Ser-Gly oder Gly-Ser mit direktem Anschluss an eine saure Aminosäure (Asp, Glu; Maurel et al., 1994). Offenbar gibt es in den Chondroitinsulfat-Seitenketten sogar unterschiedliche Kombinationen von Strukturmotiven, die bei Phosphacan bzw. PTP ζ ebenfalls entwicklungsabhängig reguliert werden und die dazu führen, dass die Affinität zum Bindungspartner ab- oder zunimmt (Maeda et al., 2003).

Die lange Spleißvariante von PTP ζ sowie Phosphacan konnten bisher immer als Chondroitinsulfat-Proteoglykane nachgewiesen werden (Barnea et al., 1994; Nishiwaki et al., 1998). Die kurze Form wurde in Rattenhirn zwischen Tag E13 und E15 sowie in Rattengliomzellen C6 auch als Variante ohne Chondroitinsulfat-Seitenketten gefunden (Sakurai et al., 1996). Die potenziellen Bindungsstellen für die CS-Seitenketten befinden sich daher sehr wahrscheinlich in dem bei der kurzen Form deletierten membrannahen extrazellulären Bereich. Am N-terminalen Ende – im Bereich der CAH- und FNIII-Domänen – sind alle Spleißvarianten mit Oligosacchariden modifiziert, die für die Ligandenerkennung wichtig sind (Milev et al., 1995). Die verkürzte Phosphacan-Variante PSI ist kein Proteoglykan, jedoch posttranslational mit Oligosacchariden modifiziert (Garwood et al., 2003).

1.4 Ein wichtiger Ligand für PTP ζ : Pleiotrophin

1.4.1 Pleiotrophin: Struktur

Pleiotrophin (PTN) ist ein 15 kDa kleiner Heparin-bindender Wachstumsfaktor, der von Zellen sezerniert wird. Zusammen mit dem ebenfalls Heparin-bindenden Midkine bildet Pleiotrophin eine eigene Zytokinfamilie, die der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs) zwar funktionell, nicht aber strukturell ähnelt (Zhang et al., 1999). Pleiotrophin wurde etwa zeitgleich als Mitogen für Fibroblasten aus Rinderuterus (Milner et al., 1989) und als Faktor, der das Auswachsen von Neuriten fördert, aus neonatalem Rattenhirn isoliert (Rauvala, 1989).

Eine Besonderheit von Pleiotrophin tritt vor allem in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zutage: Das Molekül hat ein apparentes Molekulargewicht von etwa 18 kDa, obwohl die 168 Aminosäuren der Peptidkette nicht modifiziert vorliegen, was auf ein Molekulargewicht von 15 kDa schließen lässt (Hampton et al., 1992). Der Grund für diese Abweichung liegt vermutlich im hohen Anteil basischer Aminosäuren: 21% der Aminosäuren sind Lysinreste (Li et al., 1990), die sich vor allem am Carboxy- und Amino-Terminus befinden. Damit lässt sich auch der hohe pI-Wert (etwa 10,1) und die extrem gute Bindung an Heparin und die extrazelluläre Matrix erklären (Kinnunen et al., 1996). Eine weitere Besonderheit bei Pleiotrophin sind zehn konservierte Cysteinreste, die dem Protein durch ihre Disulfidbrücken eine feste Struktur und Faltung geben (Wellstein et al., 1992). Deshalb ist es schwierig, die biologische Aktivität zu erhalten, wenn Pleiotrophin rekombinant durch prokaryotische oder Insektenzellen-Expressionssysteme gewonnen werden soll (Raulo et al., 1992; Kuo et al., 1992; Seddon et al., 1994).

1.4.2 Expression von Pleiotrophin

Die Expression von Pleiotrophin ist streng zeitlich und zelltypabhängig reguliert (Li et al., 1990). Während der Entwicklung wird Pleiotrophin im Neuroektoderm und Mesoderm, nicht aber im Endoderm oder Ektoderm exprimiert. Das höchste Expressionsniveau findet sich im Gehirn im frühen postnatalen Stadium, was einen Hinweis auf seine Bedeutung für das Wachstum und die Differenzierung glialer und neuronaler Zellen gibt (Vanderwinden et al., 1992). Pleiotrophin ist auf einem zwar detektierbaren, jedoch niedrigen Level auch im adulten Tier exprimiert. Hochreguliert findet man es dann in endothelialen Zellen, Makrophagen und aktivierten Astrozyten nach ischämischer Hirnverletzung (Yeh et al., 1998).

Die Expression von Pleiotrophin kann über den Wachstumsfaktor PDGF (platelet-derived growth factor) reguliert werden. In der 5'-Promotorregion des Pleiotrophin-Gens befindet sich eine Region (serum response element), die nach Stimulation mit PDGF die Expression von Pleiotrophin hochreguliert. Möglicherweise geht einer Hochregulation von Pleiotrophin eine Hochregulation des PDGF-Gens voraus (Li et al., 1992b; Yeh et al., 1998).

Die mRNA von Pleiotrophin ist in vielen humanen Tumorzelllinien und Tumoren hoch exprimiert, dazu gehören unter anderen Ovarial- und Prostatakarzinome (Nakanishi et al., 1997), Bronchialkarzinome, Wilms' Tumor (Tsutsui et al., 1993), Chorionkarzinome (Schulte et al., 1996) und Melanome (Czubayko et al., 1996), Mammakarzinome (Wellstein et al., 1992), Neuroblastome (Nakagawara et al., 1995), und nicht zuletzt Glioblastome und Glioblastomzelllinien, wie auch in dieser Arbeit gezeigt. Dafür wird in vielen Zelllinien wie Endothelzellen, Melanozyten, einigen Epithelzellen und Fibroblasten, Pleiotrophin überhaupt nicht exprimiert (Fang et al., 1992).

1.4.3 Pleiotrophin als Wachstums- und Angiogenesefaktor

Pleiotrophin ist ein Mitogen für Fibroblasten, endotheliale und epitheliale Zellen (Fang et al., 1992; Delbei et al., 1995). *In vitro* fördert es das Auswachsen von Neuriten, was an Kulturen embryonaler und perinataler kortikaler Neuronen, sowie in Neuroblastom- und PC12-Zellen gezeigt werden konnte (Rauvala, 1989; Hampton et al., 1992; Kuo et al., 1990).

Dass Pleiotrophin Einfluss auf das Zellwachstum nimmt, wurde am deutlichsten mit einem Versuch gezeigt, in welchem die cDNA von Pleiotrophin in 3T3-Fibroblasten stabil transfiziert und damit konstitutiv exprimiert wurde (Chauhan et al., 1993). Einzelzellklone, die Pleiotrophin exprimierten, wuchsen in Weichagar („soft agar“) und bildeten - in die Flanken von Nacktmäusen injiziert - hoch vaskularisierte Tumoren. Die Transfektion und Expression der Pleiotrophin-cDNA in die kaum tumorogene Nebennierenkarzinomzelllinie SW13 führte zum gleichen Ergebnis. Einzelzellklone – injiziert in Nacktmäuse – bildeten vaskularisierte primäre Tumore mit hohem metastatischem Potenzial (Fang et al., 1992; Czubayko et al., 1994). Pleiotrophin ist also offenbar ein Proto-Onkogen und bei der Entstehung von Tumoren als Wachstumsfaktor mit transformierender Aktivität beteiligt.

Die hohe Dichte von Gefäßen in den Tumoren deutete außerdem darauf hin, dass Pleiotrophin auch ein Angiogenesefaktor ist. Der direkte Einfluss von Pleiotrophin auf Endothelzellen wurde in mehreren Angiogenese-Assays bestätigt. Pleiotrophin erwies sich in einem *in vivo* Kaninchen Cornea-Assay als stark angiogen und *in vitro* bildeten sich als Reaktion auf Pleiotrophingabe aus

Kapillarendothelzellen spontan röhrenartige Strukturen (Choudhuri et al., 1997; Laaroubi et al., 1994). Nach einer ischämischen Hirnverletzung kam es in Ratten zu einer stark erhöhten Pleiotrophinexpression in Endothelzellen, aktivierten Makrophagen und Astrozyten, die lokal auf die Stelle der Neovaskularisation begrenzt war (Yeh et al., 1998). Durch Versuche mit verkürzten Pleiotrophin-Varianten konnten die Aminosäurereste 69-136 von Pleiotrophin für die angiogene Aktivität verantwortlich gemacht werden, diese Region wird auch als „Angiogenese“-Domäne bezeichnet. Essenziell für die Transformation hingegen sind offensichtlich die Regionen der Aminosäuren 41-64 und eine der beiden C- und N-terminal gelegenen Lysin-reichen Domänen der Pleiotrophin-Sequenz (Zhang & Deuel, 1999).

1.4.4 Antagonisierung von Pleiotrophin

Dass Pleiotrophin zum Wachstum maligner Zellen benötigt wird, konnte in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 gezeigt werden (Zhang et al., 1997). Diese Linie exprimiert endogenes Pleiotrophin auf einem hohen Niveau. Stabile Transfektion und Expression einer verkürzten Pleiotrophin-Mutante (PTN 1-40) führte den malignen Phänotyp der Zelllinie in ihren ursprünglichen Zustand zurück und wirkte so als dominant negativer Effektor von Pleiotrophin. Die transfizierten Mammakarzinomzellen bildeten deutlich weniger Kolonien in Weichagar sowie weniger und kleinere Tumore in Nacktmäusen.

Ribozyme, die gegen die mRNA von Pleiotrophin gerichtet sind, konnten humane Melanomzellen 12005L in einen nicht-tumorigenen Zustand zurückführen (Czubayko et al., 1994). Die sonst hohe Produktion und Sekretion von Pleiotrophin konnte durch stabile Transfektion mit Ribozymen gegen Pleiotrophin inhibiert werden und führte zum gleichen Ergebnis wie die dominant negative Mutante: es bildeten sich weniger Kolonien in Weichagar und in Nacktmäuse injizierte Zellklone bildeten keine Tumoren. In den mit Ribozymen gegen Pleiotrophin transfizierten Melanomzellen war auch die Tumorangio-genese stark reduziert (Czubayko et al., 1994).

1.4.5 Rezeptoren von Pleiotrophin

Ein wichtiger Rezeptor von Pleiotrophin ist Phosphacan bzw. PTP ζ (Maeda et al., 1996; Milev et al., 1998). PTP ζ bindet mit hoher Affinität an Pleiotrophin ($K_D \approx 0,25 - 3$ nM). Diese Bindung ist von der Chondroitinsulfat-Modifikation von PTP ζ so stark abhängig, dass die Bindungsaffinität durch die enzymatische Entfernung der Chondroitinsulfat-Seitenketten drastisch reduziert wird

(Maeda & Noda, 1998 und Qi et al., 2001). Das Pleiotrophin-stimulierte Neuritenwachstum primärer Rattenhirnneuronen kann durch einen Antikörper gegen Phosphacan (α -6B4) blockiert werden. Es ist also davon auszugehen, dass der Signalweg PTN - PTP ζ am Auswachsen von Neuriten beteiligt ist. Der PTN - PTP ζ -Signalweg kann außerdem auch durch Hemmung der Protein-Tyrosinphosphatase-Aktivität und durch Zugabe bestimmter CS-Seitenketten oder exogenes Pleiotrophin unterbrochen werden (Maeda & Noda, 1998). Im sich entwickelnden Zerebellum von Ratten konnte gezeigt werden, dass von Bergmann-Gliazellen sezerniertes Pleiotrophin an PTP ζ auf den gleichen Gliazellen und auf Purkinjezell-Dendriten binden kann. Möglicherweise wird durch diesen Signalweg die komplexe Morphogenese von Purkinjezell-Dendriten entscheidend reguliert (Tanaka et al., 2003).

Neben PTP ζ existieren weitere Bindungspartner von Pleiotrophin: Syndecan-3, ein transmembranäres Heparansulfat-Proteoglykan, bindet Pleiotrophin mit einer Dissoziationskonstante von $K_D \approx 0,5$ nM (Raulo et al., 1994). Syndecan-3 fungiert außerdem als Ko-Rezeptor des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors bFGF (s. a. Kap. 4.2 und 4.3; Chernousov & Carey, 1993). Das Expressionsmuster von Syndecan-3 deckt sich während der Entwicklung des ZNS mit dem von Pleiotrophin (Nolo et al., 1995). Wenn Syndecan-3 auf Neurone in Kultur gegeben wird, wird das Pleiotrophin-abhängige Auswachsen von Neuriten blockiert. Allerdings wurde bisher keine direkte Signaltransduktion in die Zelle beobachtet.

Pleiotrophin bindet mit einer Dissoziationskonstante von $K_D \approx 32$ pM an die extrazelluläre Domäne der anaplastischen Lymphomkinase ALK. Die Expressionsprofile von ALK und Pleiotrophin überlappen ebenfalls und geben Anlass zu der Vermutung, dass dieser Wachstumsfaktor mit seinem Rezeptor eine wichtige Rolle bei der normalen Entwicklung des Nervensystems spielt. Der PTN – ALK-Signaltransduktionsweg führt zur Phosphorylierung der PI3-Kinase und von PLC- γ (Stoica et al., 2001; vgl. 4.2).

1.5 Weitere Bindungspartner und Funktionen von PTP ζ

1.5.1 Zelladhäsion und bidirektionale Signalübertragung zwischen glialen und neuronalen Zellen

Wie in Abschnitt 1.2.3. bereits einleitend erwähnt, setzt sich die extrazelluläre Matrix aus verschiedenen adhäsiven Glykoproteinen wie Kollagen, Laminin, Fibronectin und Proteoglykanen zusammen. Die extrazelluläre Matrix hat nicht nur die Aufgabe, den „Leerraum“ zwischen den Zellen zu füllen. Moleküle der extrazellulären Matrix binden an Zelloberflächenrezeptoren und regulieren dadurch Proliferation, Migration und Differenzierung der umgebenden Zellen (Katoh-Semba & Oohira, 1993).

Die Rezeptor-artigen Protein-Tyrosinphosphatasen zeigen strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu Zelladhäsionsmolekülen (Brady-Kalnay & Tonks, 1995). Genau wie diese können sie homophile Interaktionen eingehen, mit Signalmolekülen interagieren oder sind mit Proteinen des Zytoskeletts verknüpft (Peles et al., 1998). Ebenfalls ähnlich vielen Zelladhäsionsmolekülen ist PTP ζ außerdem stark posttranslational modifiziert und setzt sich im Kernprotein aus Domänen zusammen, die an andere Moleküle und die extrazelluläre Matrix binden können.

Die meisten dieser Interaktionen wurden an der löslichen Spleißvariante Phosphacan (6B4 Proteoglykan) entdeckt. Da sich die Struktur jedoch mit dem extrazellulären Teil der langen Form von PTP ζ deckt, gelten die meisten Entdeckungen gleichzeitig für PTP ζ . Phosphacan bzw. PTP ζ bindet an Ng-CAM (neuron glia cell adhesion molecule), ein Molekül, das häufig an Neuronen-Glia-Zellgrenzen zu finden ist (Grumet et al., 1993; Milev et al., 1994). Gliale Zellen, die PTP ζ exprimieren, haften an mit Ng-CAM beschichteten Oberflächen und verlängern ihre Auswüchse in die Richtung des Substrates, allerdings verlieren sie nach einem Kulturtag diese Haftung und lösen sich vollständig von der Matrix ab. Mit Phosphacan angereichertes konditioniertes Medium inhibiert die gliale Adhäsion an Ng-CAM, diese Wirkung kann durch Depletion von Phosphacan aus dem Medium durch vorherige Inkubation mit einem Antikörper gegen Phosphacan reduziert werden (Sakurai et al., 1996).

Tenascin C - ein weiteres Zelladhäsionsmolekül - ist ein großes oligomeres Glykoprotein der extrazellulären Matrix, das während der Embryonalentwicklung stark exprimiert wird. Die Lokalisation von Tenascin und Phosphacan überlappt stark in embryonalem und frühem postnatalen Zerebellum von Ratten (Grumet et al., 1994). Phosphacan bindet spezifisch und mit hoher Affinität ($K_D \approx 12$ nM) an Tenascin (Barnea et al., 1994). Diese Bindung kann sowohl durch

die Zugabe von Antikörpern gegen Phosphacan oder Tenascin sowie durch die löslichen Proteine Phosphacan und Tenascin selbst inhibiert werden (Grumet et al., 1994).

Tenascin C bindet Calcium-abhängig mit seiner C-terminalen Domäne, einer Fibrinogen-artigen globulären Domäne, an Phosphacan und die kurze Rezeptorform von PTP ζ (Milev et al., 1997). An der Bindung sind die Carboanhydrase- und Fibronectin III-Domänen von PTP ζ beteiligt, wobei die Oligosaccharid-Seitenketten dieser Domänen eine wichtige Rolle spielen (Milev et al., 1995; Adamsky et al., 2001). Über diese Bindung wird in glialen Tumoren vermutlich die Tumorzelladhäsion vermittelt.

Contactin, ein durch einen GPI-Anker mit der Membran verbundenes neuronal exprimiertes Rezeptormolekül bindet an die CAH-ähnliche Domäne von PTP ζ (Peles et al., 1995). Diese Bindung induziert das Auswachsen von Neuriten und die Differenzierung von Neuroblastomzellen. Dass diese Wirkungen spezifisch sind, zeigen Experimente, in denen mithilfe von Antikörpern gegen Contactin die Bindungen inhibiert werden konnten (Peles et al., 1995).

Bindungspartner von kolocalisiertem Contactin und Nr-CAM ist hauptsächlich die glial exprimierte kurze Spleißvariante von PTP ζ (Sakurai et al., 1997). Auf astrozytären C6-Zellen exprimierte PTP ζ kolocalisiert wiederum mit Tenascin C. Diese Moleküle sind vermutlich nicht die einzigen Komponenten eines größeren Komplexes, der die bidirektionale Signalübertragung zwischen neuronalen und glialen Zellen steuert.

Wie einleitend erwähnt, kann glial exprimierte PTP ζ ein Signal in Richtung Neuronen aussenden, das in einer Stimulation des Auswachsens von Neuriten resultiert (Sakurai et al., 1997). Dieses Signal kann durch Antikörper gegen Contactin oder gegen PTP ζ blockiert werden (Revest et al., 1999). Von neuronalem Contactin können ebenfalls Signale in Richtung glialer Zellen ausgehen. Dies wird durch eine veränderte Phosphataseaktivität und die Reduktion der Tyrosinphosphorylierung in glialen Zellen nach Stimulation mit neuronalen Contactinkomplexen demonstriert (Revest et al., 1999). Die kurze Form von Phosphacan PSI bindet ebenso wie Phosphacan an Contactin; und ebenso wie Phosphacan stimuliert PSI das Auswachsen von kortikalen Neuronen (Garwood et al., 2003).

Im peripheren Nervensystem dient in Schwann-Zellen exprimierte PTP ζ möglicherweise als Rezeptor für axonal exprimiertes N-CAM und Contactin (Thomaidou et al., 2001). Dies könnte für die Migration von Schwann-Zellen nach einer Verletzung und bei der Entwicklung des PNS eine Rolle spielen.

1.5.2 Intrazelluläre Bindungspartner und potenzielle Signalübertragungswege

Die Suche nach intrazellulär an PTP ζ bindenden Molekülen und Substraten für die Phosphatasefunktion gestaltete sich bislang schwierig. Einige Arbeitsgruppen führten Hefe-Zwei-Hybrid-Screenings durch, wobei mehrere potenzielle Substrate für PTP ζ gefunden wurden. Allerdings fehlen weiter führende Arbeiten, so dass momentan davon ausgegangen werden muss, dass möglicherweise die Hauptsubstrate noch nicht entdeckt wurden. Mehrere Substrate kommen für eine bedeutende Rolle bei der Signalübertragung in Frage.

1.5.2.1 PSD-95/SAP90

Eine Untersuchung mit der Hefe-Zwei-Hybrid-Methode konnte Proteine der PSD-95/SAP90-Familie als potenzielle Substrate von PTP ζ isolieren. Proteine dieser Familie enthalten drei PDZ-Domänen, eine SH3- und eine Guanylatkinase-ähnliche Domäne. In Rattenhirn binden die Proteine der PSD-95/SAP90-Familie mit ihrer zweiten PDZ-Domäne an das C-terminale Ende von PTP ζ . In Übereinstimmung damit enthält PTP ζ am C-Terminus das PDZ-Bindungsmotiv – (T/S)XV, in diesem konkreten Fall das Motiv –SLV, welches für die Bindung an die PDZ-Domäne essenziell ist. Durch das gemeinsame Auftreten von PTP ζ und den Proteinen der PSD-95/SAP90-Familie in der postsynaptischen Dichtefraktion (PSD-Fraktion) wird für PTP ζ eine mögliche Funktion bei der Regulation der Synapsenbildung und der Ausbildung der Synapsenplastizität angenommen (Kawachi et al., 1999).

1.5.2.2 MAGI-3

MAGI-3 ist eine Membran-assoziierte Guanylatkinase (membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation), die mit einer von sechs PDZ-Domänen an den Carboxy-Terminus von PTP ζ bindet. MAGI-3 enthält ähnliche Strukturen wie PSD-95-Proteine (z. B. eine Guanylatkinasedomäne), die die Bindung an verschiedene Zelladhäsionsmoleküle, Rezeptorkinasen und G-Protein gekoppelte Rezeptoren erlaubt. Das MAGI-3-Protein fungiert in erster Linie als Gerüstprotein - in Astrozyten lokalisiert es an Zellmembranvorwölbungen und fokalen Adhäsionsstellen. Da MAGI-3 selbst nicht an Tyrosinresten phosphoryliert wird, aber mit unbekanntem phosphorylierten Proteinen und β -Catenin kolokalisiert, dient MAGI-3 vermutlich der Rekrutierung von Substraten an PTP ζ (Adamsky et al., 2003).

1.5.2.3 β -Catenin

β -Catenin ist ein wichtiges Signalmolekül, das bei der Entwicklung des Gehirns eine bedeutende Rolle spielt. Außerdem wird es bei Fehlfunktionen mit der Progression von Tumoren und verschiedenen anderen Krankheiten wie z. B. Alzheimer in Verbindung gebracht (Moon et al., 2004). Seine zentrale physiologische Aufgabe im Zellkern besteht darin, als Ko-Faktor von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren im WNT-Signaltransduktionsweg die Transkription von Zielgenen zu aktivieren. Diese Funktion wird durch die Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten reguliert (Kikuchi, 2003).

β -Catenin assoziiert außerdem auch mit Rezeptor-artigen Protein-Tyrosinphosphatasen und wird anders als im WNT-Weg an Tyrosinresten phosphoryliert bzw. dephosphoryliert. Auch für PTP ζ ist phosphoryliertes β -Catenin ein potenzielles Substrat. Es interagiert mit der zur Membran proximalen Phosphatasedomäne D1 von PTP ζ und wird von dieser konstitutiv dephosphoryliert. Nach Stimulierung der Phosphatase mit ihrem Liganden Pleiotrophin dimerisiert die Rezeptor-Phosphatase und wird inaktiviert, wodurch die Anlagerung von β -Catenin verhindert wird. Dadurch steigt das Niveau an Tyrosin-phosphoryliertem β -Catenin in der Zelle (Meng et al., 2000; vgl. Kap. 4.6).

1.5.2.4 *Git1/Cat-1*

Ein weiteres intrazelluläres Substrat für die Signaltransduktion von PTP ζ ist Git1/Cat-1 (G protein-coupled receptor kinase-interactor 1/Cool-associated, tyrosin-phosphorylated 1; Premont et al., 1998). PTP ζ kolokalisiert in pyramidalen Neuronen aus Rattenhippocampus und -cortex mit Git1 und kann dieses in Neuroblastomzellen dephosphorylieren (Kawachi et al., 2001). Die Dephosphorylierung von Git1 durch PTP ζ folgt dem Modell der liganden-induzierten Dimerisierung wie bei der oben beschriebenen Dephosphorylierung von β -Catenin. PTP ζ ist demnach konstitutiv aktiviert und wird durch Stimulation durch Pleiotrophin inaktiviert.

Git1 kommt in einem großen zytoplasmatischen Komplex vor, welcher innerhalb der Zelle beweglich ist und im Bereich von fokalen Adhäsionsstellen und Membranvorwölbungen gefunden wird (Manabe et al., 2002). Vermutlich liefern die Git1-enthaltenden zytoplasmatischen Komplexe Komponenten für den Auf- und Abbau von Zelladhäsionsstellen, die für die aktive Fortbewegung von Zellen essenziell sind (Zhao et al., 2000). Es wird angenommen, dass durch die Phosphorylierung von Git1 die Zellmigration bedeutend reguliert werden kann. Für Neuronen des Hippocampus wurde *in vitro* außerdem gezeigt, dass Git1 in der Nähe der prä- und

postsynaptischen Membranen angereichert vorliegt und so regulative Funktionen bei der Synapsenbildung übernehmen kann (Zhang et al., 2003).

1.5.2.5 *PTP ζ und Ionenkanäle*

Eine weitere Funktion von PTP ζ ist die Regulation und Modulation von Ionenkanälen. In frühen Entwicklungsstadien bis Tag P1 bindet die kurze Rezeptorform von PTP ζ mit der CAH-Domäne extrazellulär und mit der ersten Phosphatasedomäne D1 intrazellulär an bestimmte Untereinheiten von spannungsabhängigen Natriumkanälen in Neuronen (Ratcliffe et al., 2000). In späteren Entwicklungsphasen bindet nur noch Phosphacan an die Natriumkanäle. Phosphacan wiederum ist durch Bindung an Tenascin R an die Ranvier'schen Schnürringe lokalisiert und bindet darüber an eine Untereinheit der Natriumkanäle. Möglicherweise spielt Phosphacan bzw. PTP ζ hier eine Rolle bei der Lokalisierung von Natriumkanälen an einzelne Axonsegmente bzw. an die Ranvier'schen Schnürringe (Salter & Wang, 2000).

PTP ζ wurde auch in einem weiteren Proteinkomplex gefunden, dem P2X₇-Rezeptor in Ratte, der einen ATP-abhängigen Ionenkanal in der Plasmamembran darstellt (Kim et al., 2001). Die Aktivierung des Rezeptorkomplexes hat eine erhöhte Dephosphorylierung zur Folge, welche hier in verringertem Ionenstrom resultiert. Morphologisch bedingt diese Aktivierung eine rasche Änderung der Zellstruktur und -form durch eine Beteiligung der Zytoskelettproteine.

1.5.3 „Knock-out“-Mäuse

Um der Funktion eines neuen Gens auf die Spur zu kommen, werden oft Knock-out Mäuse hergestellt. Durch Defekte, die das Fehlen des Gens hervorrufen kann, kann vielfach auf eine Funktion im Organismus geschlossen werden. Auch für PTP ζ wurden solche gendefizienten Mäuse untersucht (Harroch et al., 2000). Diese waren lebensfähig und fertil, hatten ein normales Körpergewicht und eine unveränderte Lebenserwartung. Sie zeigten keine größeren anatomischen Abweichungen im Nervensystem oder anderen Organen. Für das Neuritenwachstum in Mäusen ist PTP ζ also nicht essenziell. Lediglich die Ultrastruktur von Nerven ist, wie durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt, geringfügig verändert: die Myelinstruktur ist geschwächt, dabei ist die Leitungsgeschwindigkeit der Nervenbahnen allerdings nicht beeinträchtigt. Aufgrund dieser eher geringen Defekte ist anzunehmen, dass die Funktion von PTP ζ für die normale Entwicklung und Lebenserhaltung nicht essenziell ist.

Unter pathologischen Bedingungen ist die Hochregulation von PTP ζ jedoch wichtig. Dies konnte in einem Mausmodell für Multiple Sklerose (MS) - der experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis - und in humanen MS-Läsionen gezeigt werden. Dabei wurde die Expression von PTP ζ in den demyelinisierten Läsionen hochreguliert gefunden und ließ sich spezifisch den remyelinisierenden Oligodendrozyten zuordnen (Harroch et al., 2002).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Durch subtraktive Klonierung in Verbindung mit cDNA-Array-Analysen wurden in einem Ansatz, in welchem humanes Glioblastomgewebe mit Normalhirngewebe verglichen wurde, die Gene für PTP ζ und deren Liganden Pleiotrophin in Glioblastomen als überexprimiert identifiziert (Müller et al., 2003).

Beide Moleküle sind - wie in der Einleitung dieser Arbeit dargestellt - an der neuronalen Migration während der Entwicklung des zentralen Nervensystems beteiligt, und beide Moleküle werden dabei nicht nur von neuronalen, sondern auch von glialen Zelltypen exprimiert. Pleiotrophin spielt außerdem eine Rolle bei Tumorwachstum und Angiogenese. Daher ist zu vermuten, dass beiden Molekülen im Zusammenspiel wichtige Funktionen im Hinblick auf die Entstehung und Ausbreitung von astrozytären Tumoren zukommen könnten.

Ziel dieser Arbeit ist zunächst eine Validierung der Daten der cDNA-Arrays, d. h. eine Überprüfung der Überexpression von PTP ζ in Glioblastomen verglichen mit normalem Hirngewebe. Eine detaillierte Untersuchung der Expression von PTP ζ und Pleiotrophin in Gliomen verschiedener Malignitätsgrade schließt daran an. Die Quantifizierung der verschiedenen Spleißvarianten von PTP ζ und von Pleiotrophin erfolgt auf mRNA-Ebene durch RT-PCR und Northern Blot sowie auf Proteinebene durch ELISA und Western Blot. Die gewebespezifische Verteilung von PTP ζ und Pleiotrophin wird mithilfe von Immunhistochemie und Western Blot aufgeklärt.

Weitere Zielsetzungen der Arbeit sind Untersuchungen zur Funktion von PTP ζ bei der Zelladhäsion, Migration und Proliferation von Gliomzellen in Abhängigkeit von Pleiotrophin und anderen Liganden. Dazu soll durch Transfektion der cDNA von PTP ζ ein Modell für die Überexpression in Tumorzelllinien entwickelt werden. Darüber hinaus wird unter Verwendung der RNAi-Technologie die Expression von PTP ζ in Glioblastomzellen möglichst vollständig unterdrückt. In letzterem System werden funktionelle Assays in Bezug auf Migration und Proliferation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Alle verwendeten Glioblastomzelllinien mit einer NCE-G-Nomenklatur (Neurochirurgie Eppendorf-Gliome: NCE-G-55, NCE-G-62, NCE-G-112, NCE-G-120, NCE-G-168) wurden aus primären humanen Glioblastomen im Labor für Hirntumorbiologie unter der Anleitung von Prof. Dr. M. Westphal am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), in der Neurochirurgischen Klinik als Zelllinien etabliert (Westphal et al., 1990 und Westphal et al., 1994). Diese Zelllinien werden im Folgenden zur Vereinfachung immer als G-Zelllinien bezeichnet. Die humanen Glioblastomzelllinien U-118 MG, U-373 MG, U-251 MG und U-87 MG entstammten ebenfalls primären humanen Glioblastomen und waren kommerziell erworben worden (ATCC). Sie werden im Folgenden als U-Zelllinien bezeichnet. Bei der Zelllinie C6 handelte es sich um eine aus einem Rattengliom stammende Zelllinie.

Die humanen cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen CMECs (cerebral microvascular endothelial cells) und die humanen Nabelschnurendothelzellen HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) wurden im Labor für Hirntumorbiologie wie beschrieben isoliert (Lamszus et al., 1999; Schmidt et al., 1999).

Die Zellkulturmedien wurden von ICN und Invitrogen (beide USA) bezogen. Sterile Zellkulturutensilien waren von Nunc (USA), Falcon (USA), Eppendorf (Hamburg) und Greiner (Österreich).

2.1.2 Tumor- und Normalhirnproben

Die verwendeten Tumorproben sind Resektionsmaterial der Neurochirurgischen Klinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Sie wurden mit Einverständnis der Patienten zu Forschungszwecken genutzt. Die Proben wurden rasch in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. In der Neuropathologischen Klinik des UKE wurden Schnitte der Tumoren histologisch untersucht und nach der WHO Klassifikation eingeteilt (vgl. Tab.1). Normalhirnproben stammten aus Autopsien des Instituts für Rechtsmedizin des UKE und lagerten ebenfalls bei -80°C .

2.1.3 Antikörper

Tabelle 2. Verwendete primäre Antikörper.

Bezeichnung	Spezifität	Verdünnung/ Anwendung	Spezies	Quelle
α -Caspase-3	Mensch	1:200, IHC	Kaninchen	Cell Sign. Tech., USA
α -EGFR (H11)	Mensch	1:200, IHC	Maus, IgG1	DAKO, Dänemark
α -MIB-1 (Ki-67)	Mensch	1:50, IHC	Maus, IgG1	DAKO
α -Phosphacan	Ratte	1:250, WB	Maus, IgM	Chemicon, USA
α -Phosphacan	Mensch	1:500, WB	Kaninchen	Margolis, R.*
α -PTP ζ	Mensch, Ratte/Maus	1:250, WB	Maus, IgG1	BD Trans. Labs, USA
α -PTP ζ	Mensch, Ratte/Maus	1:250, WB	Ziege	Santa Cruz, USA
α -Pleiotrophin	Mensch	1:250, WB 1:20, IHC	Ziege	R&D Systems, USA
α -Pleiotrophin 4B7	Mensch	ELISA	Maus	Raulais, R.*
α -Pleiotrophin biotinyliert	Mensch	ELISA	Ziege	R&D Systems
α -SAF-A	Mensch	1:1000, WB	Kaninchen	Fackelmayer, F.*
α -Phosphacan 2B49	Ratte	1:250, WB	Maus, IgG1	Margolis, R.*
α -Phosphacan 3F8	Ratte	1:250, WB	Maus, IgG1	Margolis, R.*
α -TP53 (DO-7)	Mensch	1:40, IHC	Maus, IgG2b	DAKO
α -vWF	Mensch	1:200, IHC	Kaninchen	DAKO

* Die Antikörper wurden freundlicherweise von Dr. R. Margolis (Maurel et al., 1994), Dr. F. O. Fackelmayer (Fackelmayer et al., 1994) und Dr. R. Raulais (Souttou et al., 1998) zur Verfügung gestellt. Abkürzungen: siehe Verzeichnis Kap. 7.

Tabelle 3. Verwendete sekundäre Antikörper.

Spezifität/ Bezeichnung	gekoppelte Substanz	Spezies	Verdünnung/ Anwendung	Nachweis	Quelle
α -Kaninchen-IgG	-	Schwein	1:30, IHC	PAP/Novared	DAKO
α -Kaninchen-IgG	HRP	Ziege	1:10000, WB	Chemilumineszenz	Dianova
α -Ziege-IgG	HRP	Maus	1:10000, WB	Chemilumineszenz	Dianova
α -Maus-IgG	HRP	Ratte	1:10000, WB	Chemilumineszenz	Dianova
α -Maus-IgG	FITC	Ziege	1:20, IF	Fluoreszenz	DAKO
α -Maus-IgG	FITC	Kaninchen	1:40, IF	Fluoreszenz	DAKO
α -Maus-IgG	Biotin	Ziege	1:200, IHC	ABC	Vector
α -Ziege-IgG	Biotin	Kaninchen	1:200, IHC	ABC	Vector
α -Digoxigenin	AP	F _c -Fragment	1:20000, NB	Chemilumineszenz	Roche

Dianova, Hamburg; Roche, Mannheim; Vector Labs, USA.; Abkürzungen: siehe Verzeichnis Kap. 7.

2.1.4 Chemikalien

Die unten aufgeführten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham, BioRad, BMA Rockland, Difco, ICN, Invitrogen, Perkin Elmer, Pharmacia, Promega und Sigma (alle USA); Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) und Serva (Heidelberg).

Aceton	Kaliumchlorid
Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1)	Kristallviolett
Agar, Bacto-Agar	N-Lauroylsarcosin
Agarose, DNA typing grade	Leupeptin
Agarose, SeaKem LE	Lithiumchlorid
Ammoniumacetat	Magermilchpulver
Ammoniumbicarbonat	Magnesiumchlorid
Ammoniumchlorid	Magnesiumsulfat
Ammoniumpersulfat (APS)	Maleinsäure
Ampicillin	β -Mercaptoethanol
Amphotericin	Methanol
Aprotinin	Methylenblau
Bromphenolblau	MOPS
BSA (Rinderserumalbumin)	Natriumacetat
Calciumchlorid	Natriumchlorid
Chloroform	(tri-)Natriumcitrat
Citronensäure	Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat
Coomassie, Brilliant Blue, R-250	Natriumfluorid
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Natriumhydroxid
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Natriumlaurylsulfat (SDS)
Dithiothreitol (DTT)	Natriumorthovanadat
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Natriumphosphat
EDTA	Natriumpyrophosphat
EGTA	Natriumpyruvat
Eosin 1%	NZY ⁺ -Broth
Essigsäure 100%	Paraformaldehyd
Ethanol abs	PBS
Ethidiumbromid 1%	Penicillin/Streptomycin
Fetales Kälberserum (FCS)	Phenol/Chloroform/Isoamyl
Formaldehyd 37%	PMSF
Formaldehyd 4% (Formalin)	Ponceau S
Formamid	Salzsäure
Gelatine	Schwefelsäure
Geneticin (G-418)	SSC 20x
β -D-Glucose	TAE 10x
Glycerin	TBE 10x
L-Glutamin	TEMED
Glutaraldehyd	Tris
Glycin	Tristar
Harnstoff	Triton X-100
Hefeextrakt	Trypton
HEPES	Tween-20
Isopropanol (2-Propanol)	Wasserstoffperoxid
Kaliumacetat	

2.1.5 Geräte

Blotapparatur, Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, USA
Brutschränke, begasbar, Hera cell	Heraeus, Hanau
ELISA-Reader, ELx808	Bio-Tek instruments, VT, USA
Filmentwicklungsmaschine Curix 60	Agfa, Köln
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss, Göttingen
Gelkammer DNA, Mupid-2	Cosmo Bio Co., Japan
Gelkammer Proteine, Mighty Small II SE250	Hoefler, San Francisco, USA
Gelkammer RNA, Sub-Cell GT	Bio-Rad, USA
Hybridisierofen, OV 3	Biometra, Göttingen
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA, Staufen i. Br.
Mikroskop DMIRB	Leica, Wetzlar
Mixer (Vortex) Reax top	Heidolph, Schwabach
PCR-Maschine UNO II	Biometra, Göttingen
pH-Meter CG 820	Schott Geräte, Hofheim
Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Spannungsgerät Power Pac 200	Bio-Rad, USA
Sterilwerkbank, Sicherheitsstufe 2, Herasafe	Heraeus, Hanau
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühltruhen -20°C	Liebherr, Biberach a.d. Riß
Tiefkühltruhen -80°C	Kryotec, Hamburg
Vakuumzentrifuge speed vac svc 100	Savant, NY, USA
UV-Photometer Gene Quant pro	Amersham pharmacia, Cambridge, UK
Waagen	Kern, Albstadt
Wasserbad	Hübscher, Hamburg
Zentrifugen Biofuge fresco Heraeus	Kendro, Osterode
Zentrifuge 5415c	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotanta/P	Hettich, Tuttlingen

2.2 Zellkulturtechniken

2.2.1 Auftauen von Zellen

Zellen, die in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C gelagert waren, wurden vorsichtig bei RT angetaut. Das geöffnete Röhrchen wurde zur Sterilhaltung kurz abgeflammt, der Inhalt in 20 ml erwärmtes Medium gegeben. Zur Entfernung von DMSO-Resten wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Zellen konnten resuspendiert und auf eine Zellkulturflasche (25 oder 75 cm^2) in frisches Medium ausgesät werden.

2.2.2 Kultivierung von Zellen

Kulturmedium für Glioblastomzelllinien		Kulturmedium für CMECs	
90% (v/v)	DMEM	80% (v/v)	M 199
10% (v/v)	FCS	20% (v/v)	FCS
1 mM	Natriumpyruvat	25 µg/ml	Supplement für Endothelzellen (Sigma)
2 mM	L-Glutamin		
0,25 µg/ml	Amphotericin	0,25 µg/ml	Amphotericin
100 U/ml	Penicillin	100 U/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin	100 µg/ml	Streptomycin

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ bei einer rel. Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Zur optimalen Versorgung der Zellen wurden diese stets subkonfluent gehalten und in einer Ratio von etwa 1:10 bis 1:20 gesplittet. Dazu wurden Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin vom Schalenboden abgelöst und in Medium resuspendiert. Wenn die genaue Zellzahl bestimmt werden sollte, wurden 10 µl der Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Der zu passagierende Anteil der Zellen wurde auf eine neue Flasche oder Schale gegeben und in Medium ausgesät.

2.2.3 Einfrieren von Zellen

Einfriermedium	
10%	DMSO
90%	FCS

Zellen wurden grundsätzlich in der optimalen subkonfluenten Wachstumsphase eingefroren. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen, mit Trypsin vom Schalenboden abgelöst und in Medium resuspendiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 1000 rpm wurde das Medium abgenommen und die Zellen in 1,8 ml Einfriermedium sorgfältig und schonend resuspendiert. In einem Einfrierröhrchen wurden die Zellen zunächst langsam auf –80°C gefroren, später zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Migrationsassay (modifizierter Boydenkammer-Assay)

Das Prinzip des ursprünglichen modifizierten Boydenkammer-Assays beruht auf chemotaktischer Zellstimulation, bei der Zellen in Richtung eines positiven Gradienten eines löslichen Liganden wandern. Bei der haptotaktischen Stimulation migrieren die Zellen dagegen in Richtung eines immobilisierten membrangebundenen Substrats (vgl. 1.2.3).

Für **Chemotaxis-Assays** wurden verschiedene Konzentrationen der zu testenden Substanz in die unteren Vertiefungen einer modifizierten 96-Well-Boydenkammer (Neuro Probe, USA) pipettiert. Die Verdünnungen wurden in serumfreiem DMEM mit 0,1% BSA (Assay-Medium) angesetzt. Die Vertiefungen wurden mit einem mit Kollagen (Vitrogen 100, Cohesion Technologies, USA) beschichteten Polycarbonatfilter (Nucleopore, USA) mit der Porengröße 8 μm bedeckt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 15000 Zellen je 50 μl in die oberen Wells ausgesät. Die Migrationsdauer betrug 5 Stunden bei 37°C. Danach wurden nicht migrierte Zellen von der Oberseite des Filters entfernt und der Filter mit Diff Quik (Dade, Unterschleißheim) nach Anweisung des Herstellers gefärbt. Für jede experimentelle Bedingung wurde ein dreifacher Ansatz durchgeführt. Die angefärbten Kerne wurden mit dem Lichtmikroskop unter Zuhilfenahme eines Zählrasters in einer 40x Vergrößerung gezählt, wobei mindestens 10 Felder pro Vertiefung ausgezählt wurden. In einem Fall (Abb. 28) wurde die Auswertung über Computer-Software durchgeführt. Dazu wurde der Filter eingescannt und die Färbeintensität, die proportional zur Anzahl der migrierten Zellen war, mittels der Funktion *Histogramm* (Photoshop 7.0, Adobe, USA) densitometrisch ausgemessen. Für alle Auswertungen wurden Mittelwerte \pm Standardabweichung berechnet. Für die statistische Signifikanz wurde der Student'sche t-Test durchgeführt ($p < 0,05$).

Der **Haptotaxis-Assay** funktionierte nach einem ähnlichen Prinzip und wurde in der gleichen 96-Well-Kammer durchgeführt. Jedoch wurde die Unterseite des Polycarbonatfilters zuvor für 2 Stunden mit der haptotaktischen Substanz bzw. mit BSA oder Kollagen als Kontrollsubstanz beschichtet. Pro Vertiefung wurden 15000 Zellen in je 50 μl Assay-Medium in die oberen Wells, reines Assay-Medium in die unteren Wells pipettiert. Nach 5 Stunden Inkubation bei 37°C wurden wiederum die migrierten Zellen fixiert und gefärbt und nach der oben beschriebenen Methode ausgewertet.

2.3.2 Proliferationsassay

In eine sterile 96-Well-Mikrotiterplatte (Corning, USA) wurden 2000 Zellen/Well in 200 μ l Medium ausgesät. Diese Platte wurde acht Tage bei 37°C inkubiert. Jeden Tag wurden 12 Wells mit Zellen fixiert (12-fach-Bestimmung). Dazu wurden pro Well 100 μ l Glutaraldehydlösung (3% in PBS) auf die Zellen gegeben, für 15 min inkubiert und danach zweimal mit PBS gespült. Bis zum Ende des Versuchs wurden die bereits fixierten Wells mit PBS inkubiert.

Die Zellkerne wurden nach Fixierung aller Zellen eine Stunde lang mit 0,1%iger Kristallviolett-Lösung gefärbt und danach mit Wasser gespült. Zur Lyse der Zellen wurden pro Well 100 μ l 10%ige SDS-Lösung dazugegeben und 2-3 h bei RT entfärbt. Gemessen wurde die Absorption von Kristallviolett bei 540 nm in einem ELISA-Plattenlesegerät.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Proteinlyse

Lysepuffer für Proteine

50 mM	HEPES
1%	Triton X-100
10%	Glycerin
150 mM	NaCl
1,5 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA

supplementiert mit Proteinaseinhibitoren („Complete“, Roche)

2.4.1.1 Lysat aus Zellen

Zellen wurden auf 10 mm-Petrischalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Ernte wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in wenig PBS mit einem Zellschaber von der Schale gekratzt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das überschüssige PBS wurde nach einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm und 4°C abgesaugt. Die geernteten Zellen konnten in einem geeigneten Volumen Zellysepuffer aufgenommen werden, z. B. 150 μ l. Durch Triturieren und Ultraschallbehandlung wurden die Zellmembranen zerstört. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden Zelldebris und andere unlösliche Reste durch 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C entfernt. Der Überstand enthielt das Gesamtprotein der Zelle und wurde weiter zur Proteinbestimmung und für Western Blot-Versuche genutzt oder bis zur späteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.4.1.2 Lysat aus Tumorgewebe

Um Gesamtproteinlysat aus Tumor- oder Normalgewebe zu gewinnen, musste dieses in flüssigem Stickstoff mit einem Hammer oder Stößel zerkleinert werden. Ein Stück von 3-5 mm Kantenlänge wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und in 400 µl eiskaltem Proteinlysepuffer aufgetaut. Die Zerstörung der Zellmembranen erfolgte durch mechanisches Scheren mit einer Spritze (18 G, Stericon) und Ultraschallbehandlung, dabei wurde die Proteinlösung stets auf 4°C gehalten. Wie oben wurde das Proteinlysat nach Zentrifugation sofort weiter verwendet oder bei -80°C gelagert.

2.4.1.3 Proteinextraktion für ELISA

Extraktionspuffer		TBS	
20 mM	Tris-HCl, pH 7,5	20 mM	Tris-HCl, pH 7,5
0,5 M	NaCl	150 mM	NaCl
0,1 mM	PMSF		
10 µg/ml	Leupeptin		

Für die Bestimmung der Pleiotrophin-Konzentration in Gewebeproben mussten spezielle Proteinextrakte hergestellt werden. Dazu wurden etwa 1 cm³ große Gewebestücke in 3 ml/mg Gewebe Extraktionspuffer homogenisiert und für 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Zellpräzipitate wurden in Extraktionspuffer mit 1 M NaCl nochmals extrahiert (3 ml/mg Gewebe). Dieser Hochsalzpuffer extrahierte vor allem an die Zellmembran und an Heparansulfat-Proteoglykane der extrazellulären Matrix gebundene Proteine. Die Überstände aus beiden Extraktionen wurden vereinigt und gegen TBS dialysiert.

2.4.2 Proteinbestimmung mit der Bicinchoninsäure-Methode (BCA-Methode)

BCA Reagenz A (Pierce)	BCA Reagenz B (Pierce)
Natriumcarbonat	4% Kupfersulfat
Natriumbicarbonat	
Bicinchoninsäure (BCA)	
Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid	

Diese Bestimmung der Proteinkonzentration folgt der Biuretreaktion: Cu²⁺-Ionen werden im alkalischen Milieu durch bestimmte Aminosäurerest und die Peptidbindung zu Cu⁺-Ionen reduziert. Das einwertige Kupferion Cu⁺ wird durch Chelatbildung mit zwei Molekülen der Bicinchoninsäure nachgewiesen, da der entstandene violettfarbene Komplex eine charakteristische Absorption bei 562 nm zeigt. Die Absorption ist in weiten Bereichen linear mit steigender Proteinkonzentration (20-2000 µg/ml). Die Durchführung der Proteinbestimmung

erfolgte nach Angaben des Herstellers (Pierce, USA) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Zu jeder Proteinbestimmung wurde eine Standardkurve mit definierten BSA-Proteinkonzentrationen aufgenommen.

2.4.3 Proteinfällung nach Wessel & Flügge

Um verdünnte Proteinlösungen zu konzentrieren und dadurch das Auftragsprobenvolumen für die Gelelektrophorese zu verringern, wurde eine Proteinfällung nach Wessel & Flügge durchgeführt (Wessel & Flügge, 1984). Dazu wurde zu einer wässrigen Proteinlösung das gleiche Volumen Methanol gegeben und gut gemischt; darauf wurde $\frac{1}{4}$ Volumen Chloroform gegeben und ebenfalls gut gemischt. Durch fünfminütige Zentrifugation (14000 rpm) bei RT präzipitierten die Proteine und sammelten sich in der Interphase zwischen der sich unten sammelnden organischen und der oben liegenden wässrigen Phase. DNA und RNA wurden nicht mitgefällt. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, ohne die proteinhaltige Interphase zu berühren. Der Rest der organischen Phase wurde mit $\frac{3}{4}$ Volumen Methanol ausgeschüttelt und nochmals 5 min bei RT zentrifugiert. Die Proteinphase sammelte sich als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes und konnte nach Absaugen der organischen Phase unter dem Abzug getrocknet werden. Getrocknete Proteinpellets wurden bei -20°C aufbewahrt oder für Western Blot-Versuche weiterverwendet.

2.4.4 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

1x Laemmli-Puffer		Laufpuffer	
5% (v/v)	β -Mercaptoethanol	192 mM	Glycin
10 mM	Tris-HCl, pH 7,4	25 mM	Tris
2,5% (w/v)	SDS	0,1% (w/v)	SDS
Trenngelpuffer		Sammelgelpuffer	
375 mM	Tris-HCl, pH 8,8	125 mM	Tris-HCl, pH 6,8
0,1% (w/v)	SDS	0,1% (w/v)	SDS
		(0,001% (w/v)	Bromphenolblau)
Proteinmarker			
Rainbow full range RPN 800 (Amersham)		10-250 kDa	
All Blue (BioRad)		10-250 kDa	

Zur Auftrennung von denaturierten Proteinen nach ihrer Größe im sogenannten denaturierenden Laemmlisystem (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS-PAGE; Laemmli, 1970) wurden Proteinproben entweder in Lysepuffer oder als gefällte Proteinpellets in Laemmli-Auftragspuffer

gelöst und mindestens 5 min bei 95°C erhitzt, um durch β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken zu zerstören und mit SDS die Proteine vollständig zu denaturieren und sie auf eine einheitliche Ladung zu bringen. Verwendet wurden für den Nachweis von Pleiotrophin 15%ige, für den Nachweis von PTP ζ 5%ige Polyacrylamidgele. Bis zu 40 μ l konnten in eine Geltasche geladen werden. Die Proteine wurden bei 60 V ca. 3-4 Stunden lang aufgetrennt, bis die blaue Lauffront das Gelende erreicht hatte.

2.4.5 Western Blotting

Transferpuffer ohne Methanol		Coomassie-Färbelösung	
200 mM	Glycin	25% (v/v)	Isopropanol
50 mM	Tris	10% (v/v)	Essigsäure
		0,05% (w/v)	Coomassie-R250

Das fertig aufgetrennte Polyacrylamid-Gel (PA-Gel) wurde nach Anweisung des Herstellers des Systems „Mini Trans-Blot Cell“ (BioRad) auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen (Millipore, USA) geblottet. Dazu wurden Gel und Membran zwischen zwei Glasfasermatten und je zwei in Puffer getränkte Filter (3MM, Whatman, USA) geklemmt und in eisgekühltem Transferpuffer geblottet. Der Proteintransfer wurde 1 Stunde lang bei 100 V durchgeführt. Die Transfereffizienz konnte durch kurze Färbung der Membran mit Ponceau S-Lösung (Ponceau S in Essigsäure) überprüft werden. Ponceau S ließ sich mit bidest. Wasser entfernen. Die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen etwa 1 Stunde lang in 1x Roti-Block (Roth, Karlsruhe) als Blockierungslösung inkubiert und konnte schließlich mit Antikörperlösung dekoriert oder in TBS eingeschweißt bei 4°C gelagert werden. Zur zusätzlichen Kontrolle der Gelbeladung und des Membrantransfers gleicher Proteinmengen konnte die Membran für 15 min mit einer Coomassie-Färbelösung und anschließend für 10-15 min mit einer Entfärbelösung inkubiert werden.

2.4.6 Proteindetektion mit Antikörpern

TBST (Tris buffered saline with Tween)	
50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
150 mM	NaCl
0,1% (v/v)	Tween-20

Eine 6 x 8 cm große Membran wurde in 5-7 ml primärer Antikörperlösung (Antikörper verdünnt in 0,5% Magermilchpulverlösung) über Nacht bei 4°C leicht schüttelnd inkubiert. Der Antikörper

wurde durch Waschen mit TBST (3x für 10-15 min bei RT) abgelöst. Der sekundäre Antikörper wurde in entsprechender Verdünnung für 1 h bei RT auf der Membran inkubiert. Anschließend wurde nochmals 3-4-mal mit TBST gewaschen, bevor die Membran mit bidest. Wasser kurz gewaschen wurde und mit dem Entwicklungsreagenz für genau 1 min inkubiert wurde. Entwickelt wurde mit den Chemilumineszenz-Reagenzien Luminol/Enhancer und stabiler Wasserstoffperoxidlösung (SuperSignal West Pico, Pierce). Die Membran wurde luftblasenfrei zwischen zwei Folien inkubiert und Röntgenfilme in variablen Expositionszeiten aufgelegt und entwickelt (ca. 30 s – 2 h).

2.4.7 Entfernen von Antikörpern von der Membran (Stripping)

Um sekundäre sowie primäre Antikörper wieder von PVDF- und Nitrocellulose-Membranen zu entfernen, wurde die Membran 15 min in TBST gewaschen. Mit 5-10 ml eines speziellen Puffers (Restore Western Blot Stripping Buffer, Pierce) wurde die Membran 30 min lang bei 50°C langsam schüttelnd inkubiert. Vor einem erneuten Blockierungsschritt wurde die Membran nochmals 15 min mit TBST gewaschen.

2.4.8 Enzymatischer Verdau mit Chondroitinase ABC

Zur enzymatischen Entfernung von Chondroitinsulfat-Seitenketten bei PTP ζ wurden Proteinlysate in C-ABC-Puffer (100 mM Tris, pH 7,5; 30 mM Natriumacetat) zusammen mit 0,4 U/ml Chondroitinase ABC (Seikagaku, USA) für 30 min bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde durch Denaturierung der Proben in Laemmli-Puffer für 10 min bei 95°C gestoppt. Die Proteinproben konnten wie unter 2.4.4 beschrieben auf 5% SDS-Polyacrylamid-Gelen mit anschließendem Western Blot analysiert werden.

2.4.9 Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA für Pleiotrophin

96-Well-Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 4°C mit 1 μ g/ml monoklonalem α -PTN-Antikörper 4B7 (s. Tab. 2) in TBS inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit TBST-Puffer gewaschen und 2 h bei RT mit 1% BSA blockiert. Die Proteinextrakte (vgl. 2.4.1.3) wurden in TBST verdünnt und je 100 μ l pro Well für 1 h bei RT inkubiert. Ein biotinylierter Antikörper gegen Pleiotrophin (R&D Systems) wurde in einer Konzentration von 500 ng/ml hinzugefügt und 1 h bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte über Streptavidin-konjugierte alkalische

Phosphatase und pNPP (p-Nitrophenylphosphat; Pierce, USA). Die Absorption wurde nach 2 h mit einem ELISA-Plattenlesegerät bei 405 nm gemessen.

2.4.10 Immuncytochemie/Immunfluoreszenzfärbung

Zum Nachweis bestimmter Proteine in oder auf lebenden Zellen wurden am Vortag 10000-15000 Zellen auf Glasplättchen in 24-Well-Platten ausgesät. Die auf den Glasplättchen angewachsenen Zellen wurden nach 24 h in FCS-haltigem Medium mehrfach gewaschen. Bei Nachweis transmembranärer oder extrazellulärer Proteine wurde sofort der Antikörper in entsprechender Verdünnung aufgebracht. Dieser wurde eine Stunde bei RT inkubiert, mit Medium abgewaschen und mit einem fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper detektiert, der 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert wurde. Die Zellen wurden nach Waschen in Medium 15 min lang in einem Ethanol-Eisessig-Gemisch bei -20°C fixiert.

Zum Nachweis intrazellulärer Proteine mussten die Zellen vor Inkubation mit Antikörper auf dem Glasplättchen fixiert werden. Dies wurde 10 min bei 37°C mit 4% Formaldehyd oder 15 min bei -20°C mit dem Ethanol-Eisessig-Gemisch durchgeführt. Nach Waschen in Medium wurden die Zellen permeabilisiert, um den Zugang für den Antikörper zu ermöglichen. Dies konnte 5 min bei -20°C mit Methanol geschehen oder 10 min bei RT mit 3% Triton X-100. Erst danach konnten der primäre und sekundäre Antikörper wie oben beschrieben aufgebracht werden.

Fertig gefärbte Glasplättchen wurden mit einem Anti-Fading-Reagenz (Citifluor AF1, UK) auf Objektträgern eingedeckelt und mit ringsum aufgetragenem Nagellack vor Austrocknung geschützt.

2.4.11 Immunhistochemie

4 μm -dicke Paraffinschnitte wurden über Nacht bei 37°C getrocknet. Nach Entparaffinierung durch Xylol wurden die Schnitte jeweils 2 min in einer absteigenden Alkoholreihe inkubiert (100% abs. Ethanol, 96%, 90%, 80%, 70%, dest. H_2O). Die Aktivität der endogenen Peroxidasen wurde durch Inkubation mit Methanol und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 1:50 blockiert. Nach einem Waschschrift mit H_2O und PBS wurden die Schnitte für eine Stunde bei RT mit dem jeweiligen Serum des sekundären Antikörpers inkubiert und so blockiert. Primärer und sekundärer Antikörper wurden ebenfalls je 1 Stunde bei RT inkubiert.

Je nach Antikörper wurden folgende Systeme nach Anweisungen des Herstellers zur Detektion der Immunfärbungen verwendet: Envision System (DAKO, Dänemark) und Novared (Vector Labs, USA); Vectastain ABC Kit (Vector Labs) und DAB (Diaminobenzidin); PAP-Komplex (DAKO) oder Novared. Die Schnitte wurden zur Gegenfärbung für 30 s mit Hämalaun inkubiert und nach Auswaschen mit Glyceringelatine eingedeckelt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Herstellung von RNase-freiem Wasser

RNA ist besonders empfindlich gegen enzymatischen Abbau durch überall vorhandene RNasen. Alle Lösungen mussten deshalb in RNase-freiem Wasser angesetzt werden. Dazu wurde 1 l bidest. H₂O mit 1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) oder 1 ml Dimethylpyrocarbonat (DMPC) versetzt, geschüttelt und mindestens über Nacht bei RT inkubiert. Beide Reagenzien hemmen das Histidin im aktiven Zentrum der RNasen. Nach Inaktivierung der RNasen musste überschüssiges DEPC durch Autoklavieren zerstört werden, das dabei in Ethanol und CO₂ zerfällt.

2.5.2 RNA-Isolation aus Tumorgewebe

Bei -80°C eingefrorenes Gewebe musste zur RNA-Isolation unter flüssigem Stickstoff mit einem Hammer oder Stößel zerkleinert werden. 50-100 mg Gewebe wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml eines phenolhaltigen Fertigreagenzes (TRIzol Reagent, Gibco, USA) auf Eis aufgetaut. Frisches Material wurde direkt aus dem OP mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und sofort in 1 ml TRIzol gegeben. Die weitere mechanische Zerkleinerung des Gewebes und Homogenisierung erfolgte mithilfe von Ultraschall und einer 18 G Nadel und Spritze (Stericon, USA), durch die das Gewebe gedrückt wurde. Das Homogenisat wurde zur Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe 5 min bei RT inkubiert, mit 200 µl Chloroform 15 s ausgeschüttelt und zur Phasentrennung 15 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit 500 µl Isopropanol wurde die RNA durch Mischen und 10 min Inkubation bei RT präzipitiert, anschließend 10 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das RNA-Pellet mit 75% Ethanol gewaschen und kurz getrocknet. Die RNA wurde in einem geeigneten Volumen RNase-freiem Wasser aufgenommen und die Ausbeute im UV-Spektrometer gemessen. Das Absorptionsverhältnis $A_{260/280}$ sollte >1,8 betragen. Zur

Qualitätskontrolle wurden 0,3-0,5 µg RNA auf ein 1% Agarosegel aufgetragen, bei 100 V aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die charakteristischen Banden der ribosomalen 18S und 28S RNA sollten scharf bei 6300 und 2400 bp erscheinen.

2.5.3 RNA-Isolation aus Zellen

Zellen von Kulturflaschen oder Petrischalen wurden einmal mit PBS gewaschen und in 1 ml des phenolhaltigen Fertigreagenzes lysiert. Mit einem Sterilschaber wurden sie von der Platte gekratzt und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Zugabe von Chloroform wie oben beschrieben (2.5.2). Alternativ wurde Gesamt-RNA aus Zellen auch mithilfe der Kits RNeasy und QIAshredder (QIAGEN, Hilden) gewonnen. Diese wurden nach Herstellerangaben verwendet.

2.5.4 RT-PCR

Zur Amplifikation von RNA wurden Reverse Transkriptionen (RT) mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Zur Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA wurde zunächst ein Fertiggemisch aus Puffer, den vier Nukleotiden dATP, dCTP, dGTP, dTTP, RNAGuard, BSA und M-MuLV-Reverser Transkriptase verwendet (Ready To Go You-Prime First-Strand Beads, Pharmacia). 2-5 µg Gesamt-RNA wurden dafür in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst und für 10 min bei 65°C denaturiert. Nach Abkühlung auf Eis wurde die RNA zusammen mit 3 µl Random-Primern (30 pmol) (MWG Biotech, Ebersberg) auf dem Enzym-Puffer-Gemisch für 60 min bei 37°C inkubiert. Die gewonnene einzelsträngige cDNA konnte nun in der PCR eingesetzt werden.

In der PCR wird ein bestimmtes DNA-Fragment von einer DNA-Matrize (template) abgelesen und durch eine thermostabile Polymerase, z. B. aus *Thermus aquaticus*, vervielfältigt. Der Gesamtmix (Master-Mix) wurde unter DNA- und DNase-freien Bedingungen pipettiert und bestand aus den in der Beispieltabelle angegebenen Komponenten.

Komponente	Volumen	Endkonzentration im Gemisch
10x PCR-Puffer ohne MgCl ₂	2 µl	20 mM Tris, 50 mM KCl
50 mM MgCl ₂	1 µl	2,5 mM
10 mM dNTP-Gemisch	0,4 µl	200 µM
10 pmol/µl Primer forward	1 µl	0,5 pmol/µl
10 pmol/µl Primer reverse	1 µl	0,5 pmol/µl
Template DNA (cDNA)	1-5 µl	---
5 U/µl Taq DNA-Polymerase	0,1 µl	0,5 units/Ansatz
bidest. H ₂ O	ad 20 µl	---

Die DNA wurde durch einen Hitzeschritt bei 94°C denaturiert, damit sich die synthetischen DNA-Primer (18-22 bp; MWG Biotech) an die DNA-Matrize anlagern konnten („primer-annealing“). Die Annealingtemperatur für die verwendeten Primer werden in Tabelle 4 aufgeführt. Zur Elongation des Fragments wurde das Temperaturoptimum der Polymerase gewählt (72°C). Diese Zyklen wurden jeweils 30-35-mal wiederholt. Abschließend konnten die PCR-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt und analysiert werden.

Schritt	Temperatur	Zeit
DNA Denaturierung	94°C	5 min
Zyklus Schritt 1: Denaturierung	94°C	30 s
Zyklus Schritt 2: Annealing	55°C	30 s
Zyklus Schritt 3: Elongation	72°C	1 min
einige Elongation	72°C	10 min
Abkühlung	4°C	bis zur Entnahme

Tabelle 4. Verwendete DNA-Oligonucleotide (PCR-Primer).

Name	Sequenz 5' - 3'	Quelle	AT	Amp
long only forward*	CTG ATG GGA TCC TGG CAG CA	NCBI GenBank NM 002851: nt 4877-4896	58°C	485 bp
long & short reverse*	CGA TAT TTA TGT ATC GAT TCT TGT GCT TG	nt 5394-5422	58°C	485 bp
short only forward	GCC TAC TTC CCA ACT GAG GTA AC	nt 2296-2318	59°C	553 bp
long & short reverse	CGA TAT TTA TGT ATC GAT TCT TGT GCT TG	nt 5394-5422	59°C	553 bp
long only new forw.	GCT GAT GGG ATC CTG GCA GCA	nt 4876-4896	60°C	588 bp
long only new rev.	CAG CAA GCT GTG CTA GCT TAA CC	nt 5442-5464	60°C	588 bp
CAH forward*	ACT GCT TTG ATG CGG ACC GAT	nt 614-634	58°C	503 bp
CAH reverse	TCT CTG GGT CAG CCT GAA CAT	nt 1097-1117	58°C	503 bp
PTN forward	GTG GAT ACT GCT GAA GCA GGG	NCBI GenBank NM 002825: nt 442-462	60°C	329 bp
PTN reverse	GGT GAC AGT CTT CTG GCA TTC G	nt 750-771	60°C	329 bp
GAPDH forward*	ACC ACC ATG GAG AAG GCT GG	NCBI GenBank BT006893: nt 307-326	58°C	527 bp
GAPDH reverse	CTC AGT GTA GCC CAG GAT GC	nt 815-834	58°C	527 bp
β-Aktin forward	GGG ATG GTC GAA GAT C	NCBI GenBank NM001101 nt 208-228	58°C	434 bp
β-Aktin reverse	ATG AGG TAG TCA GTC AGG TCC	nt 622-642	58°C	434 bp

* Die Abkürzungen „long“ bzw. „short“ bezeichnen Sequenzen, die für PTPζ-A (lange Spleißvariante) bzw. PTPζ-B (kurze Spleißvariante) spezifisch sind. CAH bezeichnet eine Sequenz, die aus dem Bereich der Carboanhydrasedomäne von PTPζ gewählt wurde. PTN: Pleiotrophin, GAPDH: Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase, AT: Annealingtemperatur, Amp: erwartete Größe des amplifizierten PCR-Fragments.

2.5.5 PCR-Klonierung, Transformation und Plasmidisolierung

Zur Herstellung von Vektoren, aus denen durch *in vitro*-Transkription Hybridisierungssonden für Northern Blots gewonnen werden konnten (vgl. 2.5.7), mussten DNA-Fragmente über PCR amplifiziert und in geeignete Plasmide ligiert werden. Die PCR-Fragmente wurden in „blunt end“-geschnittene Vektoren (pBluescript, Stratagene, USA; mit EcoRV geschnitten) oder mit TA-Überhängen versehene Vektoren (pGEM T-easy, Promega, USA) ligiert. Zur Ligation wurden die geschnittenen Vektoren und PCR-Fragmente über Nacht mit Ligasepuffer und T4-DNA-Ligase (Roche) bei 4°C inkubiert.

NZY ⁺ -Medium (1 l)		LB-Medium (1 l)	
10 g	NZ Amine (Caseinhydrolysat)	10 g	NaCl
5 g	Hefeextrakt	10 g	Trypton
5 g	NaCl	5 g	Hefeextrakt
12,5 mM	MgCl ₂	(50 µg/ml)	Ampicillin)
12,5 mM	MgSO ₄		
20 mM	Glucose		

Ligationsansätze oder fertige Plasmide - z. B. Plasmide zur Überexpression von PTP ζ (vgl. 3.4) und zur Expression von siRNA (vgl. 2.5.9.2) - wurden zur Vervielfältigung in ultrakompetente *E. coli*-Zellen (Epicurian Coli XL-10 Gold, Stratagene) transformiert. Dazu wurden 10 ml steriles NZY⁺-Medium mit MgCl₂, MgSO₄ und Glucose ergänzt und auf 42°C vorgewärmt. Ein Aliquot der Zellen wurde vorsichtig auf Eis aufgetaut und mit 2-4 µl β -Mercaptoethanol versetzt. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurde die DNA (2-5 µl des Ligationsansatzes oder 10 pg – 50 ng Plasmid-DNA) zu den Zellen gegeben und unter gelegentlichem Mischen 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock, der die Bakterien aufnahmefähig für die DNA macht, wurde exakt 30 s lang bei 42°C ausgeführt. Die Zellen wurden rasch für 2 min auf Eis gekühlt und schließlich mit 900 µl NZY⁺-Medium versetzt. Bei 250 rpm sollten die Zellen 60 min lang bei 37°C anwachsen, bevor sie in verschiedenen Volumina (50 – 400 µl) auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden und über Nacht bei 37°C Kolonien bildeten.

Verschiedene Kolonien wurden gepickt und über Nacht bei 37°C im Schüttler (220 rpm) in LB/Amp-Medium inkubiert. Aus den gewachsenen Kulturen wurden Mini-, Midi- oder Maxipräparationen des Plasmids nach Anleitung des Herstellers angefertigt (QIAGEN). Das gereinigte Plasmid konnte nach Restriktionsverdau auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und so überprüft werden. Zur weiteren Sequenzüberprüfung - vor allem bei den Vektoren für siRNA - wurde das Plasmid sequenziert (ABIPrism Model 3100, USA).

2.5.6 Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden durch *in vitro*-Transkription

Zur Hybridisierung im Northern Blot wurden nicht-radioaktiv markierte Sonden hergestellt. Als Matrize dienten die zuvor klonierten Vektoren (2.5.5). Nach dem Prinzip einer *in vitro*-Transkription wurden nach einem Restriktionsverdau des Plasmids mithilfe DIG-markierter Nukleotide (DIG-UTP) „run-off“-Transkripte hergestellt. Verwendet wurde das DIG-labeling Kit nach den Anleitungen des Herstellers (Roche).

Für den Restriktionsverdau wurde ein Enzym am 3'-Ende der zu transkribierenden Sequenz ausgewählt. 5 µg hochreine Plasmid-DNA aus einer Maxi-Präparation wurden mit 5 µl 10x Restriktionsenzym-puffer und 3 µl Restriktionsenzym versetzt. Mit bidest. Wasser wurde auf 50 µl aufgefüllt. Das Plasmid wurde über Nacht bei 37°C vollständig geschnitten und mithilfe des PCR purification kits (QIAGEN) gereinigt.

1 µg des im Agarosegel überprüften vollständig linearisierten gereinigten Plasmids wurde für die *in vitro*-Transkription eingesetzt.

Komponente	Volumen
gereinigte linearisierte Plasmid-DNA	1 µg
DIG-UTP/NTP Gemisch	2 µl
Transkriptionspuffer 10x	2 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
RNA-Polymerase SP6/T7/T3	2 µl
RNase-freies Wasser	ad 20 µl

Dieser Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert.

Zur Entfernung der Matrizen-DNA wurde mit DNase I (Roche) 15 min bei 37°C ein Verdau durchgeführt. Durch Zugabe von 2 µl 200 mM EDTA wurden die Reaktionen gestoppt. Das RNA-Transkript wurde durch Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl gekühltem (-20°C) 100%igem Ethanol gefällt. Zur Beschleunigung der Präzipitation wurde die RNA mindestens 30 min bei -70°C gekühlt. Durch 15 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde die RNA pelletiert, mit 70% eisgekühltem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet, in 100 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und 30 min bei 37°C gelöst, anschließend in kleinen Aliquots bei -70°C gelagert. Eine kleine Probe wurde zur Kontrolle im Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt.

2.5.7 Northern Blotting

MOPS-Puffer		20x SSC	
20 mM	MOPS, pH 7,0	3 M	NaCl
8 mM	Natriumacetat	300 mM	Natriumcitrat
1 mM	EDTA		

Gelauftragungspuffer (Sigma)	
62,5% (v/v)	deionisiertes Formamid
1,14 M	Formaldehyd
1,25x	MOPS-Puffer
200 µg/ml	Bromphenolblau
200 µg/ml	Xylencyanol

Für ein 1%iges Formaldehyd-Agarosegel der Abmessung 15 x 15 cm mit 0,75 cm Dicke wurden 93 ml einer 1,6%igen geschmolzenen, aufgekochten Agaroselösung benötigt. Nach Abkühlung auf 60°C wurden 30 ml 5x MOPS-Pufferlösung und 27 ml Formaldehyd (37%) zugegeben. Das Gel wurde zügig gegossen und musste 30 min erstarren. Dann wurde die Gelkammer (Sub-Cell GT Agarose Gel Elektrophoresis System, Bio-Rad) einschließlich des Gels mit 1x MOPS-Pufferlösung gefüllt. 20 µg Gesamt-RNA oder 5 µg poly-A⁺-RNA wurden zum Auftrag auf 5 µl eingengt oder verdünnt. Mit 10-15 µl Formamid-haltigem Auftragungspuffer (Sigma) wurden die Proben für 10 min bei 65°C denaturiert, auf Eis gekühlt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Als Marker wurden 4,5 µl einer RNA-Leiter (0,24 – 9,5 Kb RNA ladder, Invitrogen) verwendet. Die RNA wurde etwa 5-7 h bei 75 V aufgetrennt – das entsprach einer Migrationsrate der Bromphenolblau-Front von etwa 3 cm/h - bis das Bromphenolblau bei zwei Dritteln der Gellänge angekommen war. Das Gel wurde vorsichtig 5 min in RNase-freiem Wasser gewaschen, dann 20 min in 20x SSC äquilibriert. Eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) wurde mit RNase-freiem Wasser benetzt und ebenfalls in 20x SSC äquilibriert. Die RNA wurde über Nacht bei RT oder alternativ bei 4°C durch Kapillarblot auf die Nylonmembran transferiert. Zur Fixierung der RNA wurde die kurz gespülte und getrocknete Membran 30 min bei 120°C gebacken. Die Markerspür konnte mit einem Skalpell abgetrennt werden. Zur Detektion der Markerbanden wurde das Membranstück in 5% Essigsäure äquilibriert, 30 s in 0,03% Methylenblau in 300 mM Natriumacetat gefärbt und mit Wasser entfärbt.

Die gebackene Membran konnte verschweißt bei -20°C aufbewahrt werden oder direkt zur Hybridisierung verwendet werden.

2.5.8 Sondenhybridisierung

Prä-/Hybridisierungslösung		Waschpuffer	
5x	SSC	100 mM	Maleinsäure, pH 7,5
50%	Formamid	150 mM	NaCl
0,1%	N-Lauroylsarcosin	0,3%	Tween 20
0,02%	SDS		
2%	Blockierungsreagenz (Roche)	Detektionspuffer	
		100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
		100 mM	NaCl

Eine mit RNA fixierte Nylonmembran musste zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mindestens 1 h bei der vorgesehenen Hybridisierungstemperatur prähybridisiert werden. Pro 100 cm² Membran wurden 20 ml Prähybridisierungslösung benötigt. Eine DIG-markierte RNA-Sonde (2.5.7) wurde nach 10 min Denaturierung bei 99°C in einer Konzentration von 50-100 ng/ml in vorgewärmter Prähybridisierungslösung verdünnt. Vorher schon verwendete verdünnte RNA-Sonden mussten 10 min bei 68°C erneut denaturiert werden. Membranen mit Sonden gegen PTP ζ bzw. gegen β -Aktin wurden über Nacht bei 55°C hybridisiert.

Die Wasch- und Detektionsschritte erfolgten nach Herstellerangaben des DIG-Systems (Roche). Die Membran wurde zweimal 20 min bei RT in 2x SSC mit 0,1% SDS gewaschen, anschließend zweimal 20 min bei der Hybridisierungstemperatur in 0,1-0,5x SSC mit 0,1% SDS. Die SDS-Konzentrationen und Verdünnungen von SSC-Puffer mussten je nach Sonde und Stringenz empirisch bestimmt werden. Zur Detektion wurde die Membran 1 min in Waschpuffer äquilibriert, 60 min bei RT in Blockierungslösung und 30 min mit dem anti-Digoxigenin-Antikörper (1:20000) inkubiert. In Waschpuffer wurde zweimal 15 min gewaschen, 2 min mit Detektionspuffer äquilibriert und mit wenigen Tropfen CDP-Star (Roche) inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei in Folie eingeschweißt und in verschiedenen Intervallen angefangen bei 1-5 min auf Röntgenfilm exponiert und entwickelt.

2.5.9 RNAi-Technologie

Der Begriff RNAi, d.h. RNA-Interferenz, wurde durch die Entdeckung geprägt, dass Injektionen von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in *C. elegans* zu einer hochspezifischen Ausschaltung von Genen („Gen-Silencing“) führten, deren Sequenz homolog zu der injizierten RNA war (Fire et al., 1998). Der entstehende RNAi-Phänotyp ist entweder identisch zu der genetischen Nullmutante („knock-out“) oder ähnelt allelischen Mutanten (Tuschl, 2001). RNA-Interferenz wurde nicht nur in Nematoden, sondern auch in anderen Tieren, darunter Mäusen, entdeckt.

Vermutlich existiert dieser Mechanismus auch im Menschen. Das zur Zeit existierende Modell erklärt den Vorgang der RNA-Interferenz mit der Prozessierung von dsRNA zu kleinen 21-23 nt umfassenden RNA-Fragmenten, den sogenannten siRNAs (small interfering RNAs) (Elbashir et al. 2001a und Elbashir et al., 2001b). Diese siRNAs zerstören durch Anlagerung an die komplementären RNA-Sequenzen mRNA-Transkripte, die sonst translatiert würden. Die Proteinexpression wird damit unterdrückt. An diesem Mechanismus sind einige Proteine beteiligt, die teilweise noch nicht identifiziert sind, daher soll auf den genauen Mechanismus an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Für die neue RNAi-Technologie macht man sich jedoch – ohne die Vorgänge genau zu kennen – den gewünschten Effekt der hochspezifischen Genausschaltung zu Nutze.

2.5.9.1 *Transfektion synthetischer siRNA*

Bei der Auswahl von siRNAs gegen eine bestimmte mRNA-Zielsequenz (in dieser Arbeit: PTP ζ) wurden einige Regeln nach der Anleitung „The siRNA user guide“ (Tuschl, 2002) befolgt.

So wurde die mRNA-Sequenz von PTP ζ nach Sequenzmotiven durchsucht, die dem Schema AA(N19)TT bzw. AA(N19)UU entsprachen. Von den 30 gefundenen möglichen siRNA-Sequenzen wurden solche ausgewählt, die einen G/C-Gehalt von etwa 50% aufwiesen und nach Datenbankrecherchen mit BLAST (NCBI) keine weiteren Entsprechungen als mit humaner PTP ζ hatten. Die siRNA-Sequenz sollte vom Startcodon mindestens 50-100 Nukleotide entfernt sein, um zu vermeiden, dass die Anlagerung der siRNA an die RNA-Sequenz durch den großen Transkriptions-Initiations-Komplex (TIC) sterisch blockiert wird. Von den nach diesen Kriterien ausgewählten verbleibenden 20 siRNA-Sequenzen wurden zunächst zwei für erste Testversuche ausgewählt: Die Sequenz von siRNA 2 (AA UCC UAA AGC GUU UCC UCG C UU) entsprach den Nukleotiden 153-175 aus der PTP ζ -Sequenz in der NCBI GenBank Nummer NM_002851; die Sequenz von siRNA 14 (AA CUG AGG UAA CAC CUC AUG C UU) entsprach den Nukleotiden 2307-2329.

Die chemisch synthetisierten 21-23 nt langen siRNA-Duplexe wurden für die direkte Transfektion in einer hochgereinigten Aufbereitung gekauft (Dharmacon Research, USA), die nur noch in Wasser gelöst werden musste.

Zur Transfektion wurden 50000 Zellen der humanen Glioblastomzelllinie U251 in 6-Well-Schalen ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit je 100 nM siRNA transfiziert. Die siRNA wurde dazu separat vom Transfektionsreagenz (TKO, Mirus, MoBiTec, Göttingen) mit serumfreiem RPMI-Medium inkubiert. In RPMI-Medium verdünntes Transfektionsreagenz

wurde nach 7-10 min bei RT vorsichtig mit der siRNA-Lösung gemischt und 25 min bei RT inkubiert. Das Transfektionsgemisch wurde danach vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Nach 24 und 48 h wurden die Zellen geerntet und RNA für einen Northern Blot isoliert (2.5.7) bzw. für funktionelle Assays (Migrationsassay, 2.3.1) verwendet. Die Transfektion der siRNA mittels Effectene (QIAGEN) wurde ebenfalls mit 100 nM siRNA/50000 Zellen nach Anleitungen der Hersteller durchgeführt. Die Transfektionseffizienz wurde mithilfe von Fluoreszenz-markierter siRNA gegen das Luciferasegen, das in Säugerzellen nicht exprimiert wird, ermittelt.

2.5.9.2 Klonierung eines siRNA exprimierenden Vektors und stabile Transfektion

Zur stabilen Transfektion von siRNA in Säugerzellen wurde ein System verwendet, das durch Einbringung eines Vektors in eine Zelle diese dazu veranlasst, über einen RNA-Promotor selbst siRNA-Duplexe zu exprimieren. Dadurch entfällt die teure chemische Synthese von RNA und die aufwändige Handhabung der siRNA-Duplexe bei der direkten Transfektion. Verwendet wurde der Vektor pSUPER (OligoEngine, USA), der auf dem Vektor pBluescript (Stratagene) basiert und durch einen H1-RNA-Promotor so verändert wurde, dass siRNA-Duplexe über eine Hairpinschleife exprimiert werden können (Brummelkamp et al., 2002).

Die Auswahl der siRNA-Sequenz (siRNA2) folgte den oben genannten Regeln, diese Sequenz wurde in den unten gezeigten Motiven (rot) als DNA-Primer (MWG Biotech) synthetisiert.

forward-Primer für siRNA-Klonierung gegen PTP ζ :

sense-Orientierung	antisense-Orientierung
GATCCCC	TCCTAAAGCGTTTCCTCGC
	ttcaagaga
	GCGAGGAAACGCTTAGGATTTTTG
GAAA	

reverse-Primer für siRNA-Klonierung gegen PTP ζ :

sense -Orientierung	antisense-Orientierung
AGCTTTTCCAAAAA	TCCTAAAGCGTTTCCTCGC
	tctcttgaa
	GCGAGGAAACGCTTAGG
AGGG	

Das Insert AA(N19)TT entspricht den Nukleotiden 153-175 aus der Sequenz für PTP ζ in der NCBI GenBank Nummer NM_002851.

Die Primer wurden in 50 µl-Ansätzen jeweils 4 min bei 95°C denaturiert und 10 min bei 70°C angelagert („annealing“). Die nun doppelsträngigen DNA-Oligonukleotide wurden in den mit den Restriktionsenzymen BglII und HindIII geschnittenen Vektor pSUPER ligiert. Die Schnittstelle von BglII ging bei einer erfolgreichen Ligation verloren, deshalb wurde der Ligationsansatz vor der Transformation 30 min bei 37°C mit BglII geschnitten. Falsch ligierte oder leere Vektoren wurden dadurch für die Transformation unbrauchbar gemacht. Der gereinigte Ligationsansatz wurde wie unter 2.5.5 beschrieben in *E. coli* transformiert. Es wurden Klone gepickt und Plasmid-Minipräparationen angefertigt. Die Plasmid-DNA wurde mit EcoRI und HindIII geschnitten, auf 1% Agarosegelen aufgetrennt und die Größe analysiert. Klone mit Insert waren etwa 360 bp groß, leere Klone nur etwa 300 bp. DNA aus einer hochreinen Midipräparation wurde für jeweils eine Sequenzierung mit T3- und T7-Primer verwendet, um die Sequenz zu überprüfen (ABI Prism Model 3100). Danach konnte die DNA für die Transfektion in Säugerzellen verwendet werden.

Da der von pBluescript abgeleitete Vektor pSUPER kein Gen für eine Neomycin- (oder ähnliche in Säugerzellen verwendete) Resistenz besitzt, wurde die stabile Transfektion als Ko-Transfektion mit pEGFP-N1 (Clontech, USA) durchgeführt. Letzterer enthält das *neo^r*-Gen für die Neomycinresistenz. Der pEGFP-Vektor exprimiert nach Transfektion das grün fluoreszierende Protein (GFP) und vereinfacht dadurch die Bestimmung der Transfektionseffizienz und die Auswahl der transfizierten Klone unter dem Fluoreszenzmikroskop (nach Collis et al., 2003). Zur Kontrolle wurde der leere Vektor pSUPER zusammen mit pEGFP transfiziert.

Jeweils 600000 U251-Zellen wurden in Petrischalen (10 cm) ausgesät und nach 24 h mit 1-2 µg DNA nach Herstellerangaben (Effectene, QIAGEN) transfiziert. Transfiziert wurde jeweils im Verhältnis pSUPER zu pEGFP 5:1 und 10:1, um zu gewährleisten, dass der größte Teil der selektierten Klone auch pSUPER-PTP ζ enthält. 24 h nach Transfektion wurde das Medium auf Selektionsmedium mit 400 µg/ml G418 umgestellt und die Zellen drei Wochen lang mit dieser Konzentration selektioniert. Die so entstandenen Klone wurden in 24-Well-Schalen vereinzelt und vermehrt, bis genügend Zellen zum Einfrieren und für Proteinlysate gewachsen waren. Danach wurden Proteinlysate aller Klone im Western Blot auf eine Expressionsverminderung von PTP ζ untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 *Differenzielle Expression der Spleißvarianten von PTP ζ in Astrozytomen und Normalhirn*

3.1.1 cDNA-Array: Methodik und Ergebnisse

Die in diesem Abschnitt (3.1.1) vorgestellten Ergebnisse bildeten die Grundlagen für die vorliegende Arbeit und wurden von der Firma AGY Therapeutics Inc. in San Francisco, USA, in Zusammenarbeit mit unserem Labor durchgeführt. Bei diesen Vorarbeiten handelte es sich um cDNA-Arrays mit RNA bzw. cDNA aus humanem Glioblastomgewebe (WHO Grad IV) und Normalhirngewebe. Es wurde eine Strategie angewandt, die subtraktive Klonierung mit der cDNA-Arraytechnik kombinierte. Die für Hybridisierung und Array benötigten cDNA-Bibliotheken wurden mithilfe einer speziellen Methodik, der „suppression subtractive hybridization“ (Diatchenko et al., 1996), schon von vornherein mit tumorrelevanten Genen angereichert. Gewöhnliche kommerziell erhältliche Arrays enthalten sonst eine Fülle von Genen, die nichts mit der in Frage kommenden Krankheit zu tun haben, und liefern deshalb eine große Anzahl nicht verwertbarer Daten. In einem primären hochverdichteten Array („high-density array“) wurden 25000 individuelle - zum Teil redundante - Klone zusammen mit Standardproben auf einen Membranfilter aufgebracht („spotted“) und gegen Sonden aus 14 verschiedenen Glioblastom- und 5 Normalhirngewebeproben hybridisiert. In einer zweiten Runde, den sekundären Arrays, wurden bis zu 6000 Klone als Triplikate gespottet und je zweimal erneut mit oben genannten Sonden hybridisiert, so dass für jedes Gen 6 Datenpunkte entstanden. Um redundante Informationen zu reduzieren, wurden Klone aus der Datenmenge entfernt, die stark mit rRNA-, GFAP- oder Alu-Sequenzen hybridisierten. Die nach bioinformatischer Auswertung verbleibende mRNA aus 874 Klonen war in mehr als zwei Tumorproben mehr als doppelt so hoch exprimiert. Die cDNA aus diesen Klonen wurde sequenziert und die Daten mit GenBank (NCBI) annotiert (Müller et al., 2003).

Über 200 Gene wurden dabei in Glioblastomen hochreguliert gegenüber Normalgewebe gefunden. Darunter waren einige Proteine der extrazellulären Matrix, die schon früher im Zusammenhang mit Glioblastomen standen. Als Beispiele seien Brevican, Tenascin und SPARC genannt, die bekanntermaßen eine Rolle bei der Invasion von Gliomen spielen (Zhang et al., 1998). Mit Antikörpern gegen Tenascin (Anti-Tenascin-¹³¹I) gibt es sogar erfolgversprechende klinische Studien in der Therapie von Glioblastompatienten (Bigner et al., 1998). Die

Überexpression von SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) führte bei Glioblastomzellen zu einem invasiveren Verhalten (Menon et al., 2000).

Zwei der in Glioblastomen am deutlichsten hochregulierten Moleküle waren die Protein-Tyrosinphosphatase ζ (PTP ζ) und ihr Ligand Pleiotrophin (PTN) (Müller et al., 2003). PTP ζ war in vier Tumorproben mehr als 1,5-fach, Pleiotrophin in sieben Tumorproben zwischen 2,3- und 15,4-fach hochreguliert. Diese Ergebnisse stellten den Ausgangspunkt und die Grundlagen der vorliegenden Arbeit dar.

In dieser Arbeit wurden mehrere Ansätze gewählt, um die Hochregulation von PTP ζ und PTN in Glioblastomen zu verifizieren. Im Northern Blot wurden semiquantitative Aussagen über die differenzielle Regulation einzelner Spleißvarianten getroffen. Die RT-PCR sollte qualitative Aussagen über Regulation auf mRNA-Ebene liefern. Auf Proteinebene wurde mit Western Blot, Immunfluoreszenz und Immunhistochemie nach den hochregulierten Varianten gesucht.

3.1.2 Expression von PTP ζ in astrozytärem Tumor- und Normalhirngewebe

Untersucht wurden zunächst mittels RT-PCR 12 Glioblastome, 2 Astrozytome WHO Grad II, 2 Astrozytome WHO Grad III sowie 4 Proben aus Normalhirngewebe. Für beide Rezeptor-Spleißvarianten von PTP ζ wurden spezifische PCR-Primer eingesetzt, die jeweils nur eine der beiden Formen erkennen konnten. Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht schematisch die Wahl der Primer:

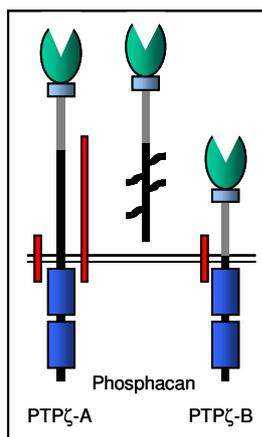


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Erkennungsregionen der verwendeten RT-PCR-Primer zum Nachweis von PTP ζ -A und PTP ζ -B.

Mit Primern für PTP ζ -A (links) wird ein 485 bp großes Fragment amplifiziert (roter Balken links). Mit den Primern für PTP ζ -B entstehen ein 2,5 kb großes, den bei PTP ζ -B deletierten Teil umfassendes Fragment (langer roter Balken), sowie das für PTP ζ -B spezifische 553 bp kleine Fragment (roter Balken rechts). Phosphacan (Mitte) wird von den verwendeten Primern nicht erkannt.

Die Primer für die lange Variante PTP ζ -A wurden von der bei der kurzen Form deletierten Region bis in den intrazellulären Bereich gelegt, so dass eine Erkennung der sezernierten Isoform Phosphacan ausgeschlossen werden konnte. Es entstand ein Fragment von 485 bp Länge. Bei der kurzen Variante PTP ζ -B wurden die Primer vor den 5'-Bereich der deletierten Region bis in den

intrazellulären Bereich gelegt, so dass bei Vorliegen der kurzen Rezeptorform ein PCR-Produkt von 553 bp Länge entstehen musste, bei PTP ζ -A jedoch ein mehr als 2,5 kb großes Fragment. Zur Kontrolle der cDNA-Integrität wurde von allen Proben eine PCR mit β -Aktin-Primern durchgeführt.

Die Expression von Phosphacan konnte durch RT-PCR nicht gesondert ermittelt werden, da sich die mRNA-Sequenz nicht von der Sequenz des extrazellulären Bereichs der langen Spleißvariante unterscheidet.

In allen Proben konnte mRNA der beiden Hauptspleißvarianten von PTP ζ , der langen Form PTP ζ -A und der kurzen Form PTP ζ -B, nachgewiesen werden (Daten für Astrozytome nicht gezeigt). In Abbildung 5 wird eine repräsentative Auswahl der PCR-Ergebnisse für Glioblastome und Normalhirnproben gezeigt.

Die RT-PCR lieferte ausschließlich qualitative Ergebnisse; die unterschiedlichen Bandenstärken konnten z. B. durch Unterschiede in der cDNA-Synthese zustande gekommen sein. Die Banden der Fragmente der kurzen Form PTP ζ -B bei den Proben aus Normalhirngewebe waren zwar schwach (Abb. 5., Spuren 6-9), aber durchaus vorhanden.

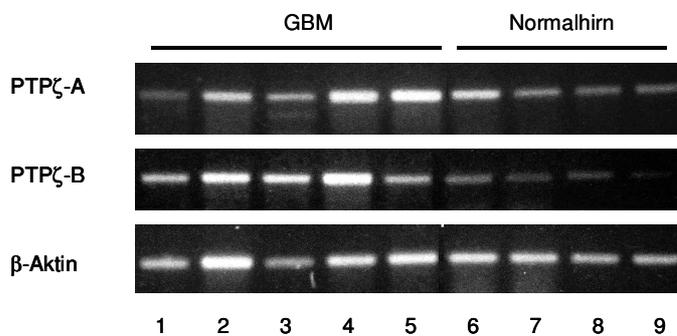


Abbildung 5. Expression von PTP ζ in Glioblastomen und Normalhirn.

RT-PCR-Fragmente der kurzen und langen Spleißvariante von PTP ζ getrennt durch ein Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung. Gezeigt werden fünf verschiedene Glioblastom- (Spuren 1-5) und vier Normalhirnproben (Spuren 6-9). Die PCR-Fragmente hatten die erwartete Größe von 485 bp (PTP ζ -A), 553 bp (PTP ζ -B) und 434 bp (β -Aktin). Sowohl Normalhirn- als auch Tumorgewebe exprimierten beide Spleißvarianten.

3.1.3 Die Expression von PTP ζ ist in Glioblastomen hochreguliert

Durch eine vergleichende Northern Blot-Analyse wurden die Expressionsniveaus der einzelnen Spleißvarianten in Glioblastom- und Normalhirngewebe genauer untersucht. Dazu wurde eine RNA-Sonde gewählt, die im N-terminalen Bereich der PTP ζ -Sequenz lag, und Abschnitte der Sequenz umfasste, die für die Carboanhydrase-ähnliche und FNIII-Typ-Domäne kodieren (siehe Abb. 6).

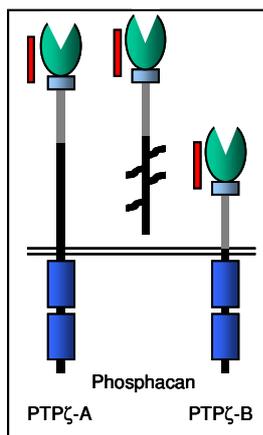


Abbildung 6. Schematische Darstellung der verwendeten RNA-Sonde zum Nachweis von PTP ζ im Northern Blot.

Der Sequenzbereich der RNA-Sonde (roter Balken) umspannt teilweise die Carboanhydrase-ähnliche Domäne (grün) sowie Teile der FNIII-Domäne (hellblau). Mit dieser Sonde konnten die drei Spleißvarianten PTP ζ -A (links), Phosphacan (Mitte) und PTP ζ -B (rechts) nachgewiesen werden.

In diesem Bereich waren alle Spleißvarianten sequenzidentisch und konnten daher gleichzeitig detektiert werden. Zur Herstellung der Sonde wurden die Nukleotide 614 bis 1117 der GenBank-Sequenz NM_002851 von PTP ζ als PCR-Fragment über „blunt end“-Klonierung in die EcoRV-Schnittstelle des Vektors pBluescript (Stratagene) ligiert. Die richtige Orientierung und fehlerlose Klonierung wurden durch Sequenzierung überprüft. Durch *in vitro*-Transkription wurde eine mit Digoxigenin markierte Sonde als „run-off“-Transkript hergestellt (2.5.6). Diese RNA-Sonde hybridisierte optimal bei 55°C mit der auf Nylonmembranen geblotteten RNA.

Untersucht wurden insgesamt 5 Normalhirnproben, 2 Proben aus nicht tumorösem gliotischen Gewebe angrenzend an Angiome (Gefäßfehlbildungen), je 3 Astrozytome WHO Grad II bzw. Grad III und 19 Glioblastome. Der mit der DIG-markierten RNA-Sonde hybridisierte Northern Blot zeigte drei Banden unterschiedlicher Laufhöhe (Abb. 7). Das größte der Fragmente lief bei etwa 8,8 kb, das mittlere bei 7,5 kb und das kleinste bei 6,4 kb. Die Größen entsprachen den unterschiedlichen Spleißvarianten PTP ζ -A, Phosphacan und PTP ζ -B. In embryonalem Nervengewebe von Ratten wurde mit einer Ratten-spezifischen Sonde im N-terminalen Bereich ein vergleichbares Muster im Northern Blot gefunden (Maurel et al., 1994). Die Bandenhöhen dieser Spleißvarianten waren mit den hier in humanem Gewebe gefundenen identisch.

In einem repräsentativen Northern Blot wurde die starke Hochregulation der Expression von PTP ζ in Glioblastomen im Vergleich zu Normalhirn dokumentiert (Abb. 7). In den Spuren 1 und 2 wurde RNA aus Normalhirn, in den Spuren 3 und 4 RNA aus an Angiome angrenzendem gliotischem Gewebe und in den Spuren 5-10 RNA aus 6 verschiedenen Glioblastomen aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurde RNA der Glioblastomzelllinie U373 verwendet, als Negativkontrolle RNA der Fibroblastenzelllinie NIH/3T3. Die drei Banden bei der Kontrollzelllinie U373 waren gut zu erkennen (Abb. 7., Spur 11). Alle drei Spleißvarianten wurden sowohl in Normalhirn als auch in Glioblastomen exprimiert. Jedoch war die Expression von PTP ζ in den Glioblastomen deutlich hochreguliert. Drei untersuchte Astrozytome WHO Grad III und eines von drei untersuchten Astrozytomen WHO Grad II exprimierten ebenfalls die drei Spleißvarianten von PTP ζ (Daten nicht gezeigt).

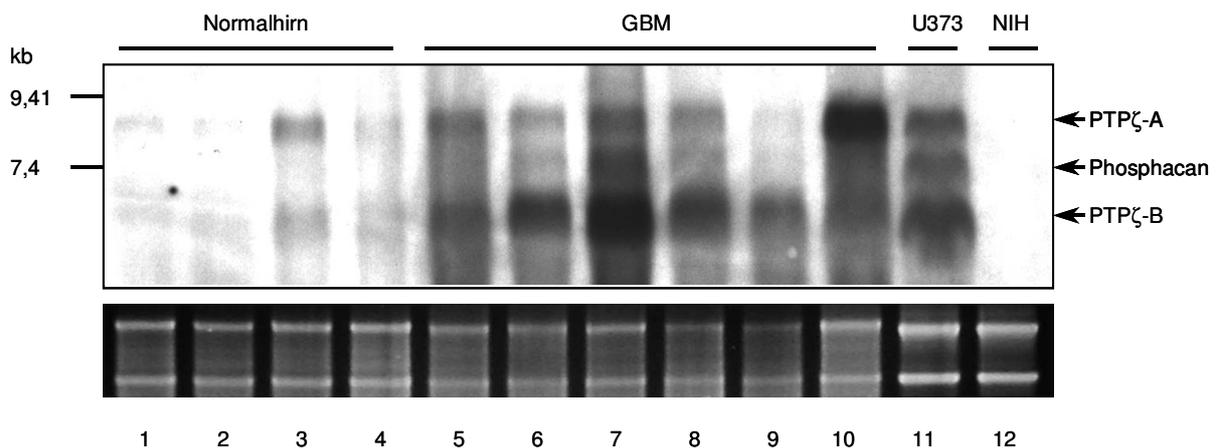


Abbildung 7. Die Expression von PTP ζ -mRNA ist in Glioblastomen hochreguliert.

Northern Blot-Analyse der Spleißvarianten von PTP ζ in Normalhirn- und Glioblastomgewebe. Gesamt-RNA aus 4 Normalhirngewebeproben, 6 Glioblastomgewebeproben, den Zelllinien U373 und NIH/3T3 wurde nach Auftrennung auf eine Membran geblottet und mit einer Sonde gegen den N-terminalen Bereich von PTP ζ hybridisiert. Spuren 1-4 zeigen die schwache Expression der drei Spleißvarianten bei 8,8 kb, 7,5 kb und 6,4 kb in Normalhirngewebe, Spuren 5-10 zeigen die starke Hochregulation der Expression von PTP ζ -A und PTP ζ -B. Zum Vergleich wurden in Spuren 11 und 12 mRNA der Zelllinien U373 und NIH/3T3 aufgetragen. Als Kontrolle der RNA-Integrität wurden die 18S und 28S RNA noch im Gel mit Ethidiumbromid gefärbt (unten).

Durch semiquantitative densitometrische Auswertung konnte die Hochregulation bei den hier ausgewählten 6 Glioblastomen genauer angegeben werden (Tab. 5). Dazu wurde die Intensität der PTP ζ -Banden auf die Intensität der rRNA-Banden bezogen. Die kurze Form PTP ζ -B war in den gezeigten Glioblastomproben etwa um das 3,3-fache hochreguliert, die lange Form PTP ζ -A etwa um das 2,3-fache. PTP ζ -B wird also in Glioblastomen stärker überexprimiert als PTP ζ -A.

Tabelle 5. Densitometrische Auswertung des Northern Blots. Expressionsniveaus von PTP ζ im Verhältnis zu rRNA.

Spur im Northern Blot	Intensitätsverhältnis PTP ζ -A /rRNA	Intensitätsverhältnis PTP ζ -B/rRNA	
1	0,17	0,16	Normalhirn
2	0,15	0,17	
3	0,26	0,23	
4	0,21	0,24	
5	0,38	0,51	Glioblastome
6	0,23	0,62	
7	0,49	1,30	
8	0,24	0,54	
9	0,16	0,31	
10	1,38	0,62	

3.1.4 Hochregulation der kurzen PTP ζ -Rezeptorform

Die Hochregulation der kurzen PTP ζ -Spleißform in Glioblastomen gegenüber Normalhirn auf mRNA-Ebene wurde auf Proteinebene bestätigt. Dies zeigte die Western Blot-Analyse. Untersucht wurden 3 Normalhirnproben, 2 Astrozytome WHO Grad II und 7 Glioblastome. Ein monoklonaler Antikörper α -PTP ζ (BD TransductionLabs), der gegen ein C-terminales Epitop von PTP ζ gerichtet ist (Abb. 8), erkennt in der Praxis nur die kurze Rezeptorform von PTP ζ .

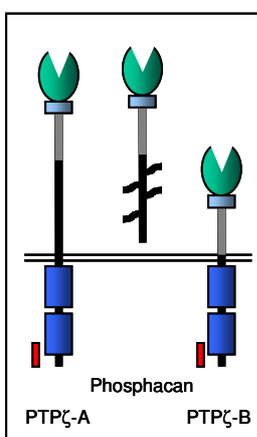


Abbildung 8. Schematische Darstellung der Erkennungsregion eines gegen PTP ζ gerichteten Antikörpers.

Die beiden roten Balken repräsentieren das C-terminale Epitop, gegen das der monoklonale Antikörper α -PTP ζ (BD TransductionLabs) gerichtet ist. Die kurze und lange Form von PTP ζ (links bzw. rechts) können durch diesen Antikörper nachgewiesen werden, nicht jedoch die lösliche Spleißvariante Phosphacan (Mitte).

Die beiden gezeigten Proben Normalhirngewebe sowie zwei Proben aus Astrozytomen WHO Grad II zeigten im Vergleich zu den 4 gezeigten Glioblastomproben keine Bande (Abb. 9). Die Expression von PTP ζ war in Normalhirn und Astrozytomen Grad II offensichtlich so schwach, dass sie im Western Blot nicht detektiert werden konnte. Die Bande bei >250 kDa repräsentierte die kurze Form PTP ζ -B.

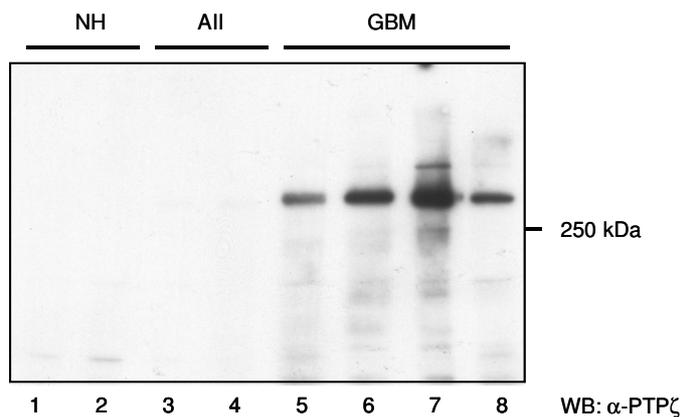


Abbildung 9. Hochregulation der kurzen Rezeptorform PTP ζ -B in Glioblastomen.

Western Blot-Analyse von vier Glioblastomproben, zwei Astrozytom- (WHO Grad II) und zwei Normalhirngewebebeisproben. Detektiert wurde mit dem monoklonalen Antikörper α -PTP ζ (1:250), der gegen ein C-terminales Epitop gerichtet ist. Die Bande oberhalb 250 kDa entspricht PTP ζ -B. Normalgewebe (NH) und Astrozytome WHO Grad II (AII) zeigten keine Proteinexpression von PTP ζ , Glioblastomgewebe (GBM) dagegen zeigte eine starke Überexpression.

3.1.5 PTP ζ wird sowohl in Neuronen als auch in astrozytären Tumorzellen exprimiert

Zur Lokalisation der Expression von PTP ζ wurden Paraffinschnitte von Normalhirn, Astrozytomen und Glioblastomen mit dem monoklonalen Antikörper gegen PTP ζ (BD, TransductionLabs) immunhistochemisch gefärbt (Abb. 8). Nachgewiesen wurden damit die lange und kurze Form von PTP ζ , PTP ζ -B und PTP ζ -A, nicht jedoch Phosphacan.

Die Färbungen wurden semiquantitativ auf einer Skala von 0 (keine sichtbare Färbung) bis 4 (sehr starke Färbung) ausgewertet (Werte s. Tab. 6, Abschn. 3.3.3). Die Ergebnisse des Western Blots wurden durch die Immunhistochemie bestätigt: Normalhirn wies nur einige positiv gefärbte kortikale Neurone auf, und in weißer Substanz konnte gar keine Färbung von PTP ζ nachgewiesen werden (Abb. 10, A und B). In Astrozytomen Grad II wurden die Tumorzellen nur

schwach angefärbt (Abb. 10, C). Glioblastome zeigten dagegen eine starke spezifische Färbung ihrer Tumorzellen (Abb. 10, D-F). Dies beschränkte sich nicht auf bestimmte Glioblastom-Subtypen; so wurde starke Expression von PTP ζ im kleinzelligen Glioblastom (Abb. 10, D), dem gemistozytären (E) und dem gigantozellulären Glioblastom (nicht gezeigt) nachgewiesen. Interessant war auch die eindeutige Abwesenheit der Färbung von Blutgefäßen und mikrovaskulären Proliferationen (Abb. 10, D).

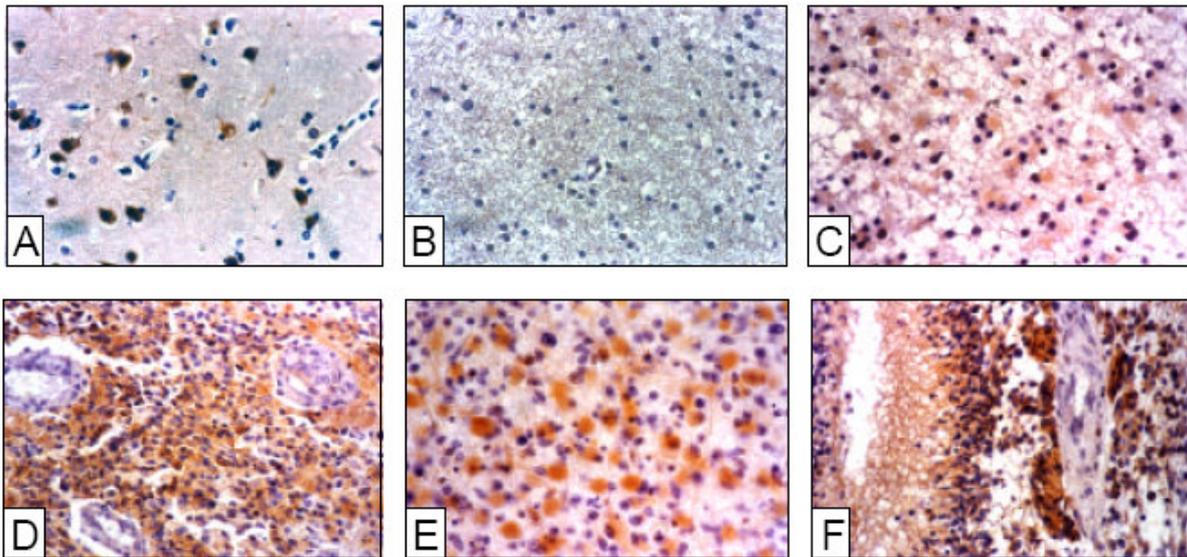


Abbildung 10. Lokalisation von PTP ζ in Normalhirn, Astrozytomen Grad II und Glioblastomen.

4 μ m dicke Paraffinschnitte aus Normalhirn und Glioblastomen wurden nach dem Standardprotokoll in Immunperoxidasetechnik mit einem monoklonalen α -PTP ζ -Antikörper gefärbt (BD TransductionLabs). In der Hirnrinde wurden nur einige Neurone angefärbt (A), in der weißen Substanz des Normalhirns gar keine Zellen (B). Astrozytome (Grad II) wurden schwach angefärbt (C). Glioblastomzellen dagegen zeigten eine intensive Färbung (F). Auch die Glioblastom-Subtypen wie das kleinzellige Glioblastom (D) und das gemistozytäre Glioblastom (E) exprimierten stark PTP ζ . Alle Bilder sind 160-fach vergrößert.

3.2 Expressionsmuster von PTP ζ in humanen Glioblastomzelllinien

Aufgrund der deutlichen Hochregulation der Protein-Tyrosinphosphatase ζ sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in Glioblastomen wurde nach geeigneten Glioblastomzelllinien als Modell für funktionelle Untersuchungen gesucht. Zunächst wurden mehrere Zelllinien auf ihren Expressionsstatus hin untersucht. Wegen einer möglichen Beteiligung von PTP ζ an der Angiogenese in Glioblastomen wurden auch humane Endothelzellen in einige Versuche mit aufgenommen. Die funktionellen Versuche werden ab Kapitel 3.6 erläutert.

3.2.1 Nur wenige humane Glioblastomzelllinien exprimieren PTP ζ

Die Expression von PTP ζ -A und PTP ζ -B wurde in 10 humanen Glioblastomzelllinien und in humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVECs) untersucht. Dazu wurden die Zelllinien G55, G55T2, G62, G112, G120, G168, U87, U118, U251 und U373 sowie HUVECs mittels RT-PCR analysiert. Verwendet wurden ähnliche Primer wie für den Nachweis von PTP ζ in Tumorgewebe (vgl. Abb. 4). Ein spezifisches Fragment für die lange Spleißvariante PTP ζ -A hatte die Größe von 588 bp. Für die kurze Variante PTP ζ -B wurden spezifische Primer verwendet, die ein PCR-Fragment von 553 bp Länge ergaben.

Nur die beiden Zelllinien U373 und U251 exprimierten beide PTP ζ -Spleißvarianten (Abb. 11, Spuren 2 und 5). In allen anderen untersuchten Zelltypen – Glioblastom- und Endothelzellen – konnte keine Spleißform der Phosphatase nachgewiesen werden. Daher wird hier nur ein exemplarisches Agarosegel mit den beiden PTP ζ -exprimierenden Zelllinien gezeigt. Die cDNA-Qualität war durch PCR mit GAPDH-Primern (Abb. 11, untere Reihe) und β -Aktin-Primern (nicht gezeigt) gesichert worden.

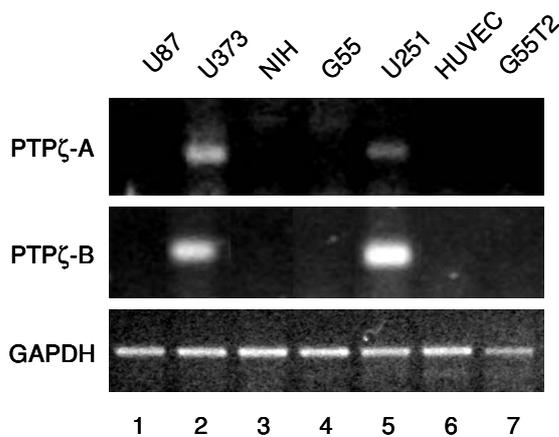


Abbildung 11. PTP ζ wird in nur zwei humanen Glioblastomzelllinien exprimiert.

RT-PCR zum Nachweis unterschiedlicher Spleißvarianten von PTP ζ in humanen Glioblastomzelllinien und Nabelschnurendothelzellen. PCR-Fragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die PCR-Fragmente hatten die erwarteten Größen von 588 bp (PTP ζ -A), 553 bp (PTP ζ -B) und 527 bp (GAPDH). Nur die Zelllinien U373 (Spur 2) und U251 (Spur 5) exprimierten beide Spleißvarianten von PTP ζ . Abkürzungen: NIH: NIH/3T3, Hu: HUVECs, GAPDH: Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase.

Die Ergebnisse der RT-PCR wurden im Northern Blot überprüft (Abb. 12). Die RNA einiger ausgewählter Zelllinien wurden mit der gegen den N-terminalen Bereich von PTP ζ gerichteten Sonde untersucht. Diese Sonde erkannte die drei Spleißvarianten: PTP ζ -A bei 8,8 kb, Phosphacan bei 7,5 kb und PTP ζ -B bei 6,4 kb. Nur die beiden auch in der RT-PCR positiv getesteten Zelllinien U373 und U251 zeigten eine deutliche Expression aller drei Spleißformen (Abb. 12, Spuren 2 und 5). Alle anderen getesteten Glioblastomzelllinien, sowie die endothelialen Zellen HUVECs, exprimierten PTP ζ nicht.

Vor allem bei der Glioblastomzelllinie U251 war die kurze Form PTP ζ -B im Verhältnis zu den beiden anderen Spleißformen deutlich stärker exprimiert (Abb. 12, Spur 5). Diese Tendenz war bereits eindeutig in humanem Glioblastomgewebe zu erkennen gewesen (vgl. Abb. 7). Diese Form ist in Tumoren möglicherweise am stärksten dereguliert.

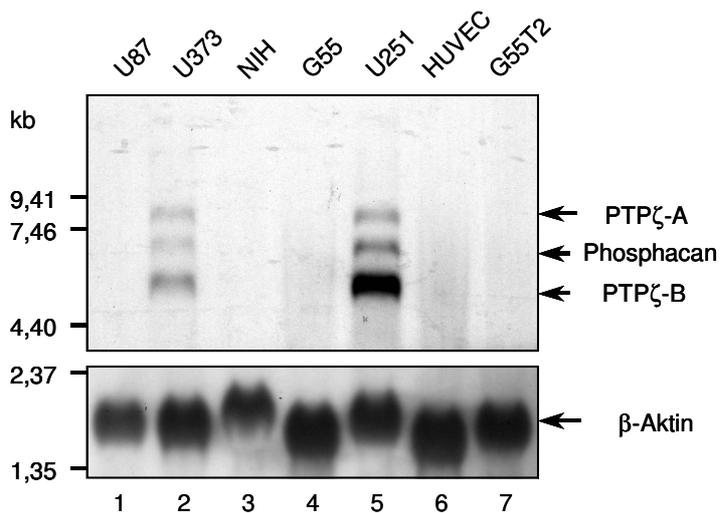


Abbildung 12. Northern Blot-Analyse der Spleißvarianten von PTP ζ in Glioblastom- und Endothelzelllinien.

Aus den Zelllinien U251, U373, U87, G55 und G55T2, sowie den Endothelzellen HUVECs wurde Gesamt-RNA gewonnen und analysiert. Die Membran wurde nach der ersten Detektion mit einer Sonde gegen den N-terminalen Bereich von PTP ζ (vgl. Abb. 6) mit einer Sonde gegen β -Aktin hybridisiert. Die β -Aktin-Bande bei 2,1 kb war bei allen Zelllinien gut zu erkennen (Spuren 1-7, unterer Blotabschnitt). Nur die Zelllinien U373 (Spur 2) und U251 (Spur 5) zeigten die Expression der drei Spleißvarianten bei 8,8 kb, 7,4 kb und 6,4 kb (Pfeile). Abk.: NIH: NIH/3T3, Hu: HUVECs.

3.2.2 Die kurze Rezeptorform PTP ζ -B wird auch auf Proteinebene nur in wenigen humanen Glioblastomzelllinien exprimiert

Um zu validieren, dass sich die Expression von PTP ζ auf mRNA-Ebene auch auf die Proteinebene überträgt, wurden Western Blot-Analysen verschiedener Glioblastomzelllinien durchgeführt. Außerdem musste für weiter führende funktionelle *in vivo*-Versuche eine in Mäusen ausreichend tumorigene Zelllinie identifiziert werden. Dafür wurden Proteinlysate der Glioblastomzelllinien A172, G55, G55T2, G62, G112, G123T2, G168, SF767, U87, U118, U251 und U373, der Rattengliomzelllinie C6 und der cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen CMECs untersucht (Abb. 13). Detektiert wurde die kurze Rezeptorform von PTP ζ wieder mit dem monoklonalen Antikörper α -PTP ζ (BD, TransductionLabs), der gegen das C-terminale Epitop von PTP ζ gerichtet ist (Abb. 8). Von den humanen Glioblastomzelllinien exprimierten nur die Linien U373, U251 und G112 PTP ζ (Abb. 13, Spuren 4, 5 und 10). Die Rattenglioblastomzelllinie C6 zeigte ebenfalls starke PTP ζ -Expression. Der verwendete monoklonale Antikörper detektierte also sowohl humane PTP ζ als auch PTP ζ aus Ratten (Abb. 13, Spur 3).

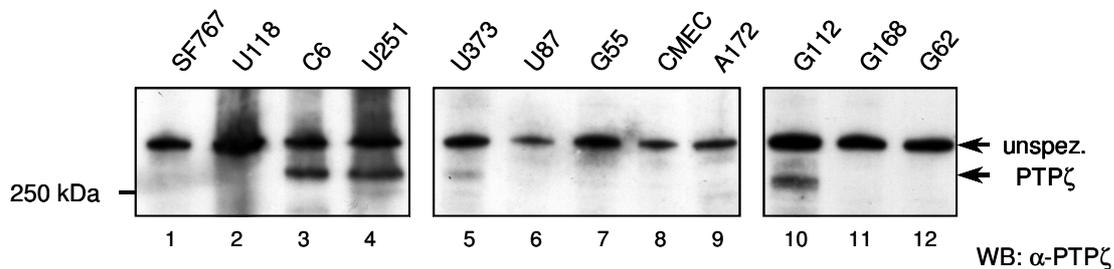


Abbildung 13. Western Blot-Analyse verschiedener humaner Glioblastomzelllinien, der Rattengliomzelllinie C6 und der cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (CMECs) zur Untersuchung der Expression von PTP ζ .

PTP ζ wurde in Proteinlysaten der gezeigten Zelllinien durch den monoklonalen Antikörper α -PTP ζ nachgewiesen. Die Bande oberhalb 250 kDa entspricht der kurzen Form von PTP ζ , die in allen Zelllinien auftretende Bande ist unspezifisch (Erklärung siehe Text). Die Rattenzelllinie C6 und die humanen Linien U251, U373 und G112 zeigten eine eindeutige Bande für die Expression der kurzen PTP ζ -Form. Abk.: CMEC: cerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen.

Eine hoch tumorigene Zelllinie, die PTP ζ deutlich exprimierte, war nur die Rattengliomzelllinie C6. Die humanen Glioblastomzelllinien, die detektierbar PTP ζ exprimierten, hatten sich in Untersuchungen, die dieser Arbeit vorangegangen waren, als nur schwach (U251 und U373) bis

kaum (G112) tumorigen erwiesen. Die in Mäusen hoch tumorigenen Zelllinien U87 und G55T2 exprimierten PTP ζ nicht in nachweisbaren Mengen.

In Proteinlysaten aus cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (CMEC) konnte im Western Blot kein Vorkommen von PTP ζ nachgewiesen werden (Abb. 13, Spur 8). Damit wurde das zuvor gewonnene immunhistochemische Ergebnis bestätigt: Bei diesen Färbungen (Abb. 10) waren die Blutgefäße in Glioblastomen ebenfalls nicht angefärbt worden. Die Expression von PTP ζ beschränkte sich also auf Tumorzellen.

Der gegen humane PTP ζ gerichtete Antikörper zeigte in allen Zelllinien - auch in den Zelllinien, die auf mRNA-Ebene PTP ζ nicht exprimierten - eine zweite Bande bei >400 kDa. Diese Bande trat bei Proteinproben aus Gewebe nicht auf (vgl. Western Blot Abb. 9). Daher wurde vermutet, dass es sich um eine unspezifische Bande handeln könnte. Zur Klärung dieser Frage wurde die Membran nach Abschluss der Antikörper-Detektion mit Coomassie-Blau angefärbt. Auf derselben Höhe der Antikörperbanden bei >400 kDa waren überall starke Proteinbanden zu erkennen (Coomassie-Färbung nicht gezeigt). Es wurde daher angenommen, dass es sich hier um eine unspezifische Bande eines Proteins handelte, das im Gegensatz zu Hirngewebe von Zellen in Kultur besonders stark exprimiert wird.

3.3 Expression von Pleiotrophin in humanen Astrozytomen und Normalhirn

Als Ligand von PTP ζ ist Pleiotrophin von großer Bedeutung (vgl. Kapitel 1). In den dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchungen, die zusammen mit AGY Therapeutics Inc. (San Francisco) durchgeführt worden waren, wurde Pleiotrophin in cDNA-Arrays genau wie PTP ζ in Glioblastomen hochreguliert gefunden (Müller et al., 2003). Um diese Beobachtung auf Proteinebene zu bestätigen, wurden verschiedene immunologische Nachweismethoden angewandt. Mit ELISA und Immunhistochemie wurde eine große Anzahl verschiedener Astrozytome untersucht.

3.3.1 Die Expression von Pleiotrophin ist in Glioblastomen hochreguliert

Zunächst wurden 12 Glioblastome, 2 Astrozytome WHO Grad II und 2 Proben aus Normalhirn im Western Blot auf ihre Pleiotrophin-Expression untersucht. Nachgewiesen wurde Pleiotrophin mit dem polyklonalen Antikörper α -PTN (R&D Systems).

In Normalhirngewebe war Pleiotrophin in geringem Maße nachweisbar (Abb. 14, Spuren 1 und 2). Verglichen mit dem ebenfalls geringen Pleiotrophingehalt in den beiden Astrozytomen WHO Grad II (Abb. 14, Spuren 3 und 4) enthielten die Glioblastome eine viel größere Menge an Pleiotrophin (Abb. 14, Spuren 5-8). Lediglich in 2 von 12 untersuchten Glioblastom-Proben konnte Pleiotrophin nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Das 15 kDa kleine Protein Pleiotrophin läuft im Western Blot stets bei etwa 18 kDa, was in der Literatur bereits beschrieben ist (Hampton et al., 1992; vgl. 1.4.1). Zur Kontrolle wurden hier 25 ng eines rekombinanten Pleiotrophins (Sigma) aufgetragen (Abb. 14, Spur 9).

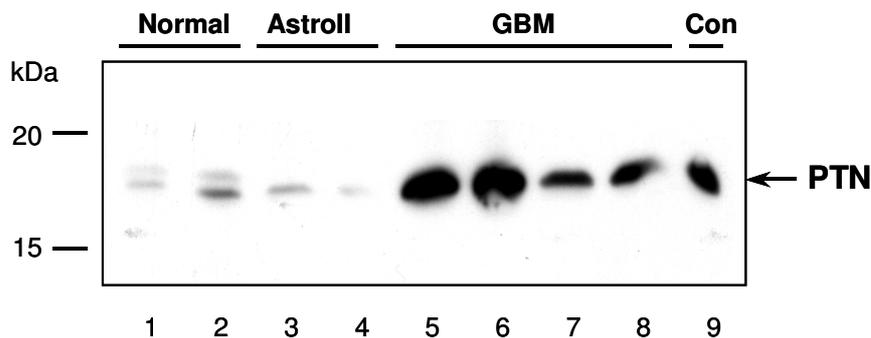


Abbildung 14. Die Pleiotrophin-Expression ist in Glioblastomen stark hochreguliert.

Nachweis von Pleiotrophin in Normalhirngewebe, Astrozytomen und Glioblastomen durch Western Blot-Analyse. Verwendet wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Pleiotrophin (R&D Systems). Die Pleiotrophin-Bande wurde bei etwa 18 kDa detektiert (Pfeil). In den beiden repräsentativ aufgetragenen Normalhirnproben (Spuren 1 und 2) war wie in den Astrozytomproben (Spuren 3 und 4) kaum Pleiotrophin nachzuweisen; in allen Glioblastomproben jedoch war Pleiotrophin in großer Menge vorhanden (Spuren 5-8). Zur Kontrolle (Spur 9) wurden 25 ng rekombinantes Pleiotrophin (Sigma) aufgetragen.

3.3.2 Hohe Expression von Pleiotrophin in niedriggradigen Astrozytomen

Um die Pleiotrophinmenge in einer repräsentativen Anzahl an Tumoren weiter zu untersuchen, wurden Proteinextrakte von 30 Glioblastomen, 17 Astrozytomen Grad II, 3 Astrozytomen Grad III und 18 Normalhirnproben hergestellt. Das Isolationsprotokoll für Extrakte (2.4.1.3) gewährleistete die Präparation des löslichen und in die extrazelluläre Matrix sezernierten Faktors Pleiotrophin. Die Pleiotrophinkonzentration in diesen Extrakten wurden in einem spezifischen ELISA gemessen.

Nur in zwei Normalhirngewebeproben, zwei Proben aus diffusen Astrozytomen (Grad II) und einem Glioblastom konnte kein Pleiotrophin nachgewiesen werden. In allen anderen Gewebeextrakten konnte Pleiotrophin in einer Konzentration zwischen 0 und 18 ng/mg Protein

gemessen werden. Wie in Abbildung 15 gezeigt, enthielten die Glioblastomproben 1,7 mal mehr Pleiotrophin als die Normalhirnproben. Allerdings war der Pleiotrophingehalt im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Western Blot-Analyse in niedriggradigen Astrozytomen von Grad II genauso hoch wie in Glioblastomen. Möglicherweise enthielten die beiden im Western Blot untersuchten Tumorproben zufällig nur sehr wenig Pleiotrophin, durch die ELISA-Versuche kann in dieser Hinsicht eine repräsentativere Aussage getroffen werden.

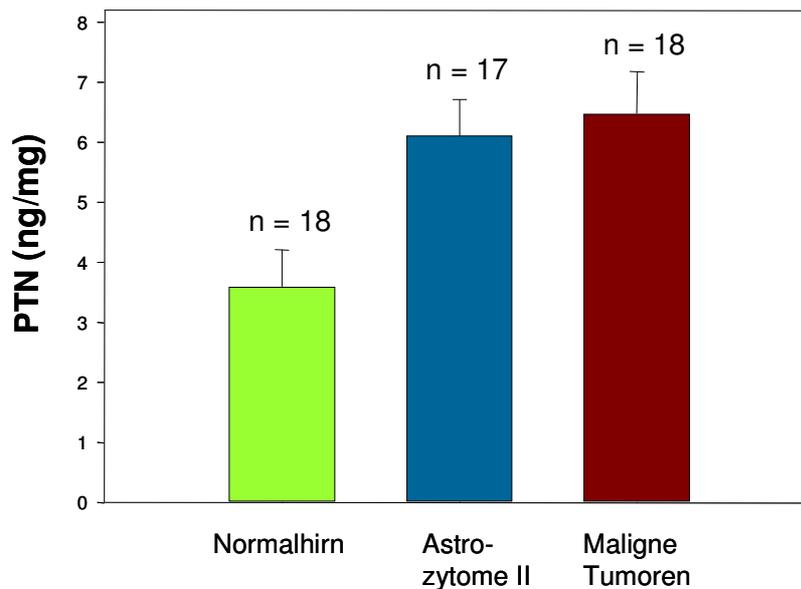


Abbildung 15. Die Expression von Pleiotrophin wird bereits in diffusen Astrozytomen hochreguliert.

Messung des Pleiotrophingehalts in Proteinextrakten von 30 Glioblastomen, 17 Astrozytomen Grad II, 3 Astrozytomen Grad III und 18 Normalhirnproben durch einen spezifischen ELISA. Verwendet wurden der monoklonale Antikörper 4B7 gegen Pleiotrophin und ein biotinylierter α -PTN-Antikörper (R&D Systems). Die Pleiotrophinkonzentrationen wurden auf den Gesamtproteingehalt normalisiert. Gezeigt sind hier gemittelte Werte \pm Standardabweichung.

3.3.3 Lokalisation der Pleiotrophin-Expression auf astrozytären Tumorzellen und tumoreigenen Blutgefäßen

Die Verteilung und Lokalisation von Pleiotrophin in bestimmten Zelltypen wurde durch immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten einer größeren Anzahl von Tumoren untersucht. 26 Astrozytome Grad II, 13 Astrozytome Grad III und 39 Glioblastome wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Pleiotrophin (R&D Systems) angefärbt. Die Auswertung der Färbeintensitäten (Tab. 6) entsprach der bei der Färbung von PTP ζ (3.1.5) verwendeten Skala von 0 (keine Färbung) bis 4 (sehr starke Färbung).

In Normalhirn wurde Pleiotrophin nur in Blutgefäßen und sehr schwach im Cortex sowie in weißer Substanz nachgewiesen (Abb. 16, A). Bei den niedriggradigen Astrozytomen wurde eine deutlich intensivere Färbung als in Normalhirn detektiert, wobei die Färbung nicht mehr ausschließlich nur Blutgefäß-assoziiert war (B). Bei einigen Glioblastomen wurde eine sehr starke Färbung gefunden (C), dagegen färbten andere nur sehr schwach, so dass im Durchschnitt die Färbung moderat war. In den meisten Glioblastomen wurde Pleiotrophin in Tumorzellen und tumoreigenen Blutgefäßen sowie mikrovaskulären Proliferationen lokalisiert. In einigen Proben wurde Pleiotrophin direkt neben Blutgefäßen gefunden (Abb. 16, D und E). Die meisten hochgradigen Tumore waren stark oder sehr stark angefärbt worden.

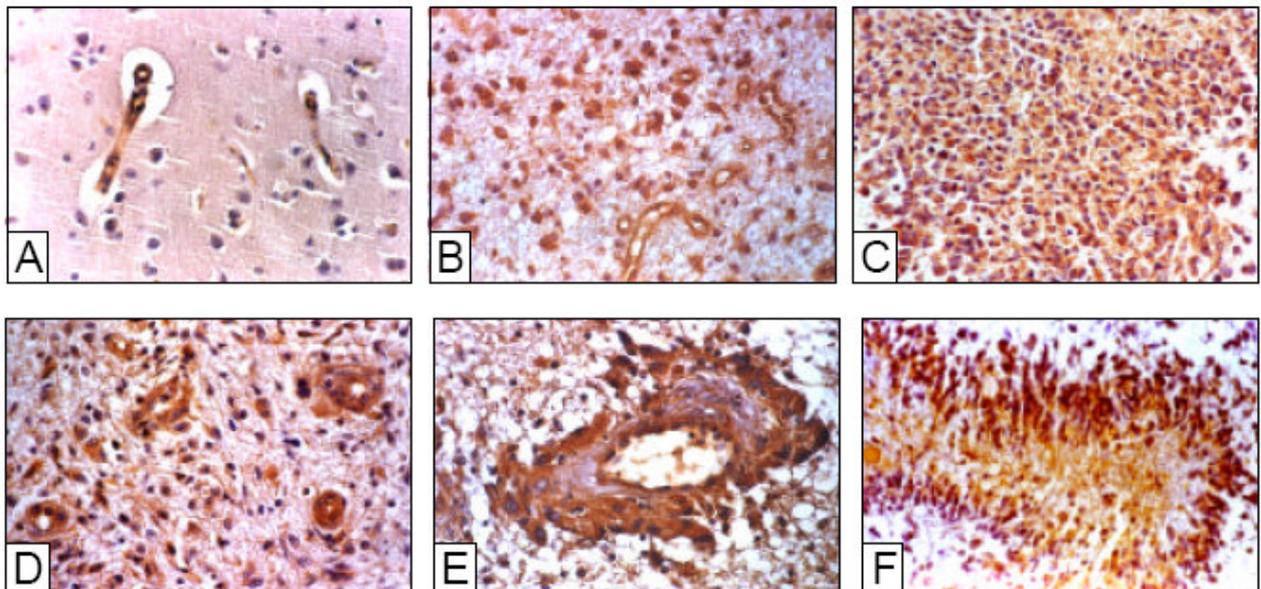


Abbildung 16. Lokalisierung von Pleiotrophin in Normalhirngewebe und astrozytären Gliomen.

4 µm dicke Paraffinschnitte wurden nach einem Standardprotokoll mit einem polyklonalen Antikörper gegen Pleiotrophin (R&D Systems) gefärbt. Im Cortex wurden nur schwach einige Neurone angefärbt; die Blutgefäße dort jedoch exprimierten Pleiotrophin (A). Ein Astrozytom Grad II zeigte starke (B), ein Glioblastom eine sehr starke Färbung (C). Besonders Blutgefäße in Glioblastomen (D) und um Blutgefäße liegende Tumorzellen (E) wurden sehr stark angefärbt. Außerdem wurde Pleiotrophin in den pseudopalisadenartigen Zellen um Nekrosen exprimiert (F). Alle gezeigten Ausschnitte wurden in 160-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die semiquantitative Auswertung (Tab. 6) ergab keine signifikante Korrelation zwischen der Pleiotrophin-Immunreaktivität und dem Malignitätsgrad. In Einklang mit den aus dem ELISA gewonnenen Daten konnte beim Auswerten der malignen Tumore (Grad III+IV) verglichen mit den Astrozytomen Grad II nur eine schwache Steigerung der mittleren Färbeintensität detektiert werden. Die relativ starke Färbung, die schon bei Grad II Astrozytomen auftrat, spricht dafür, dass die Hochregulation von Pleiotrophin ein frühes Ereignis bei der Progression von Astrozytomen ist.

Tabelle 6. Semiquantitative Analyse der immunhistochemischen Färbungen von Astrozytomen gegen PTP ζ und PTN.

	PTP ζ			PTN		
	Anzahl n	MW \pm Stdabw	Spektrum	Anzahl n	MW \pm Stdabw	Spektrum
All	25	1,360 \pm 0,230	0-4	26	2,077 \pm 0,183	1-4
AllI	13	2,692 \pm 0,308	1-4	13	2,769 \pm 0,231	2-4
GBM	38	2,632 \pm 0,215	0-4	39	2,513 \pm 0,172	1-4

Die Immunreaktivität von Tumorzellen für PTP ζ und PTN wurde folgendermaßen bewertet: 0 = keine Färbung, 1 = schwache Färbung, 2 = mittlere Färbung, 3 = starke Färbung, 4 = sehr starke Färbung. All: Astrozytome WHO Grad II, AllI: Astrozytome WHO Grad III, GBM: Glioblastome; MW \pm Stdabw: Mittelwerte angegeben mit der jeweiligen Standardabweichung.

3.3.4 Expressionsmuster von Pleiotrophin und PTP ζ in primären und sekundären Glioblastomen

In der Einleitung war dargestellt worden, dass Glioblastome aufgrund ihrer molekulargenetischen Basis in zwei Subtypen - nämlich primäre und sekundäre Glioblastome - eingeteilt werden können (vgl. 1.2.2). Primäre Glioblastome werden vorwiegend mit der Überexpression und Amplifikation des EGF-Rezeptors in Verbindung gebracht, während sekundäre Glioblastome häufig Mutationen im p53-Gen aufweisen (Abb. 1).

Um herauszufinden, ob die Expression von PTP ζ bzw. von Pleiotrophin einem der beiden Subtypen zuzuordnen ist, wurde die Expression von EGFR und p53 immunhistochemisch an Glioblastomschnitten untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde die erwartete inverse Assoziation zwischen der Akkumulation von p53 und der Überexpression von EGFR bestätigt ($p < 0,001$; Korrelationstest nach Spearman). Die Expression von Pleiotrophin und PTP ζ jedoch stand mit keinem der beiden Färbe- bzw. Expressionsmuster in einem statistisch signifikanten Zusammenhang (vgl. Ulbricht et al., 2003).

3.4 Überexpression von PTP ζ in der humanen Glioblastomzelllinie G55T2

Obwohl in der Mehrzahl humaner Glioblastome PTP ζ hochreguliert gefunden worden war, konnte in den meisten humanen Glioblastomzelllinien keine Expression von PTP ζ nachgewiesen werden. Es ist daher anzunehmen, dass die Expression *in vitro* unter Zellkulturbedingungen zumeist verloren geht. Um ein Modell für funktionelle Untersuchungen zu generieren und die Überexpression von PTP ζ in Tumorgewebe zu simulieren, wurden zwei humane Zelllinien mit einem Vektor, der für die lange Rezeptorform PTP ζ -A kodierte, transfiziert.

Ausgewählt wurden die Zelllinien G55T2 und U87, weil diese einfach zu transfizieren und in Nacktmäusen hoch tumorigen sind. Für beide Zelllinien wurde identisch vorgegangen, deshalb werden hier zur Vereinfachung nur die Ergebnisse präsentiert, die mit der Zelllinie G55T2 erzielt wurden.

Bei dem Transfektionsvektor handelte es sich um den Vektor pLNCX2 (Clontech), der uns mitsamt Insert, das die „full length“-Sequenz von PTP ζ enthielt, freundlicherweise von Dr. Dr. S. Müller (AGY Therapeutics Inc., San Francisco) zur Verfügung gestellt wurde (pLNCX2-RPTP β). Die Sequenz von PTP ζ -A war in die MCS (multiple cloning site) von pLNCX2 zwischen die Restriktions-Schnittstellen StuI und ClaI kloniert worden. Als Kontrollvektoren wurden der leere Vektor pLNCX2 und ein die alkalische Phosphatase exprimierender Vektor pLAPSN (Clontech) eingesetzt.

Die volle Länge der PTP ζ -Sequenz betrug 7 kb, so dass der gesamte Vektor eine Größe von etwa 13 kb hatte. Der Vektor wurde für die stabile Transfektion mit dem Restriktionsenzym PvuI linearisiert und gereinigt. 500000 Zellen der humanen Glioblastomzelllinie G55T2 wurden auf Petrischalen (10 cm) ausgesät und nach 24 h mit 2 μ g des linearisierten Vektors transfiziert. Die Transfektionsbedingungen für Zellen und Transfektionsreagenz (Effectene, QIAGEN) waren zuvor optimiert worden. Nach weiteren 48 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen für zwei Wochen mit 400 μ g/ml G418 behandelt. Die entstandenen 66 Klonpopulationen wurden vereinzelt und vermehrt.

Die einzelnen Klone mussten separat untersucht werden. Dazu wurde von 62 Klonen Gesamt-RNA und nach DNase-Verdau cDNA hergestellt. Diese wurde mittels PCR nach exprimierten Fragmenten von PTP ζ -A untersucht. 31 Klonpopulationen exprimierten mindestens ein Fragment von PTP ζ , 22 davon wurden weiter im Northern Blot analysiert. Zur Kontrolle wurden auch mehrere Klone untersucht, bei denen durch RT-PCR PTP ζ nicht nachgewiesen werden konnte.

Die DIG-markierte RNA-Sonde, die schon im Northern Blot zum Nachweis von PTP ζ in Tumorgewebe und Gliomzelllinien eingesetzt worden war, war gegen die N-terminale Domäne von PTP ζ gerichtet (Abb. 6). Ein repräsentativer Northern Blot ist in Abbildung 17 gezeigt.

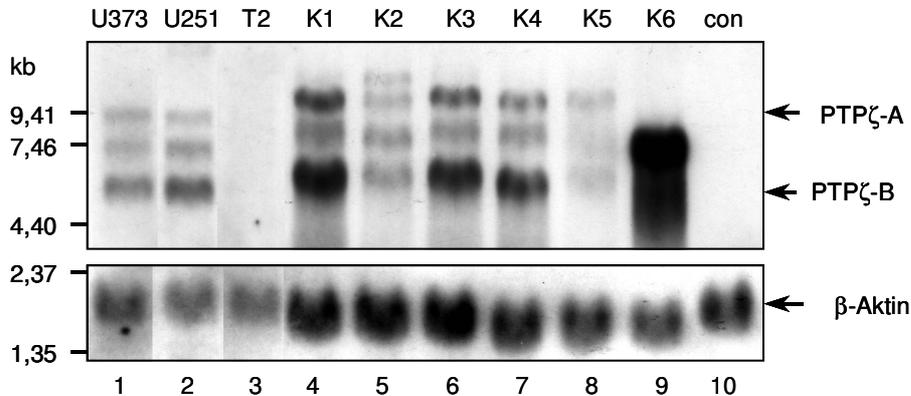


Abbildung 17. Überexpression von PTP ζ nach Transfektion mit einem Vektor für PTP ζ -A in der humanen Glioblastomzelllinie G55T2 – nachgewiesen durch Northern Blot-Analyse.

Northern Blot-Analyse der stabil den Vektor pLNCX2-RPTP β exprimierenden Klone K1 bis K6. Hybridisiert wurde mit der DIG-markierten Sonde gegen den N-terminalen Bereich von PTP ζ (Sonde siehe Abb. 6). Zur Kontrolle wurde der Blot mit einer Sonde gegen β -Aktin inkubiert und entwickelt (untere Hälfte). T2: Zelllinie G55T2, K1-K6: Klon 1-6, con: Kontrolle leerer Vektor.

Zur Kontrolle wurde RNA aus den beiden PTP ζ -exprimierenden Zelllinien U251 und U373 mit aufgetragen (Spuren 1 und 2). RNA der nicht transfizierten Zelllinie G55T2 lief in Spur 3 (T2, G55T2 wt) und als Negativkontrolle wurde RNA der mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen aufgetragen (Spur 10).

Einige der positiv selektierten Klone zeigten ein dreibandiges Muster (K1, K3, K4 und K5), das dem Muster der PTP ζ -exprimierenden Zelllinien U251 und U373 sehr ähnlich war. Ein Klon zeigte ein vierbandiges Muster (K2). Außerdem wurde in der RNA eines Klons (K6) eine einzelne Bande bei etwa 7,5 kb nachgewiesen. Erwartet worden war eine einzelne Bande bei 9,5 kb, diese konnte jedoch bei keinem der untersuchten Klone gefunden werden. Stattdessen hatte die Transfektion vermutlich eine endogene Expression von PTP ζ getriggert. Diese unerwarteten Ergebnisse werden in Kapitel 4 eingehender diskutiert (4.4).

22 Klone wurden im Northern Blot auf diese Weise analysiert und ergaben in ihrer Gesamtheit etwa das gezeigte repräsentative Bild. Das dreibandige Muster stimmte nicht ganz mit dem Muster der intrinsisch PTP ζ exprimierenden Zelllinien U251 und U373 überein. Die Signale waren in Richtung größerer RNA verschoben. Bei dem vierbandigen Muster (K2) war eine zusätzliche Bande bei etwa 11-12 kb sichtbar. Proteinlysate aller Klone wurden im Western Blot

auf Expression von PTP ζ untersucht, es konnte jedoch keine Proteinexpression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), auch nicht bei dem viel versprechend aussehenden Klon K6 mit der einzelnen Bande. Die stabile Expression der langen Rezeptorform von PTP ζ in G55T2-Zellen konnte also nicht erreicht werden. Um trotzdem mehr über die funktionelle Bedeutung von PTP ζ bei Gliomen erfahren zu können, wurde daher schließlich in einer anderen humanen Gliomzelllinie mit siRNA versucht, die endogene Expression von PTP ζ zu unterdrücken (s. 3.7). Außerdem wurde versucht, mithilfe der Rattengliomzelllinie C6 mehr Informationen über die Funktion von PTP ζ in Gliomzellen zu gewinnen (siehe folgenden Abschnitt: 3.5).

3.5 Nachweis von PTP ζ in Rattengliomzellen C6

3.5.1 Spezifische Antikörper erkennen die kurze Rezeptorform PTP ζ -B aus Ratte

Auf der Suche nach alternativen Antikörpern gegen PTP ζ konnten die monoklonalen Antikörper 2B49 und 3F8 erworben werden. Diese Antikörper sind gegen verschiedene Epitope von Ratten-Phosphacan gerichtet. Der Antikörper 2B49 ist gegen die N-terminale Hälfte, inklusive der Carboanhydrase-Domäne und der Fibronectin III-Domäne (FNIII), gerichtet. Er sollte daher die kurze und lange Form von PTP ζ sowie Phosphacan gleichermaßen erkennen. Der Antikörper 3F8 erkennt die membrannahe extrazelluläre Domäne der langen Form von PTP ζ , d. h. die C-terminale Domäne von Phosphacan. Mit diesem Antikörper konnte die kurze Form von PTP ζ nicht nachgewiesen werden, da bei PTP ζ -B genau dieser Epitopbereich fehlt. Die Antikörper wurden an Proteinlysaten einer Serie humaner tumorigener Glioblastomzelllinien sowie der Rattengliomzelllinie C6 im Western Blot erprobt. Dabei zeigte sich, dass keiner der beiden Antikörper eine Form der humanen Phosphatase erkannte (Abb. 18, oben und Mitte).

Als Kontrolle wurde ein Blot mit dem Antikörper gegen humane PTP ζ dekoriert (Abb. 18 unten). Die kurze Form von PTP ζ konnte in C6-Zellen sowie in U251-Zellen nachgewiesen werden. Der Antikörper 2B49 gegen das N-terminale Epitop detektierte jedoch nur die kurze Form von PTP ζ in der Rattenzelllinie (Abb. 18 oben; Bande bei >250 kDa). Dieser Antikörper gegen Ratten-PTP ζ hatte eine viel spezifischere Bindung als der Antikörper gegen humane PTP ζ (α -PTP ζ), was sich im Fehlen von unspezifischen Nebenbanden bemerkbar machte. Die lange Form von PTP ζ konnte jedoch auch von diesem Antikörper nicht sichtbar gemacht werden. Weitere Glioblastomzelllinien, darunter auch die PTP ζ -exprimierenden Zelllinien U373 und G112, waren im Western Blot analysiert worden, keine davon zeigte mit dem 2B49- oder dem 3F8-Antikörper eine positive Bande (Daten nicht gezeigt).

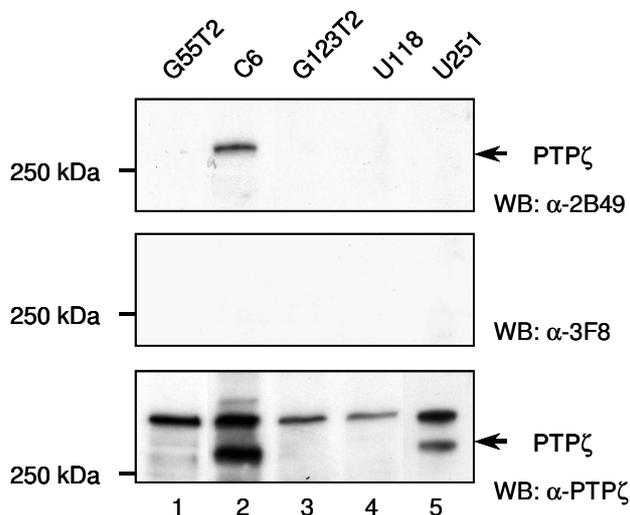


Abbildung 18. Nachweis von PTP ζ -B in Gliomzelllinien durch verschiedene Antikörper.

Nachweis von PTP ζ in Proteinlysaten von einer Ratten- und vier humanen Glioblastomzelllinien. Jeweils eine Membran wurde mit einem Antikörper gegen den N-Terminus von PTP ζ (α -2B49), einem Antikörper gegen den membrannahen Teil von PTP ζ -A (α -3F8) und mit dem Antikörper gegen den C-Terminus (α -PTP ζ) inkubiert. Nur der Antikörper gegen den C-Terminus α -PTP ζ erkannte die kurze Form von PTP ζ bei >250 kDa in Ratte und Mensch (unterer Blot).

In Immunfluoreszenzfärbungen wurde untersucht, ob die Antikörper 3F8 und 2B49 wenigstens an PTP ζ direkt an der Zelloberfläche binden konnten. Zellen der beiden humanen Linien U373 und U251 und der C6-Zelllinie (Ratte) wurden auf Glasplättchen ausgesät, darauf fixiert und mit den Antikörpern gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit einem konfokalen Mikroskop (Zeiss) ausgewertet, nachdem mit dem gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskop kaum Unterschiede in der Fluoreszenzintensität ausgemacht werden konnten.

Das konfokale Mikroskop zeigte dann deutlich die Unterschiede: Nur mit dem Antikörper 2B49 konnte eine Bindung an PTP ζ in den Rattenzellen C6 nachgewiesen werden (Abb. 19 A). Die Kontrolle ohne Erstantikörper zeigte keine Färbung (Abb. 19 E). PTP ζ aus den Zelllinien U373 und U251 wurde auch hier mit dem Antikörper 2B49 nicht detektiert (B und C). Der Antikörper 3F8 erkannte wie im Western Blot PTP ζ weder an Ratten- noch an humanen Zellen (für C6: Abb. 19 D; Zelllinien U373 und U251 nicht gezeigt).

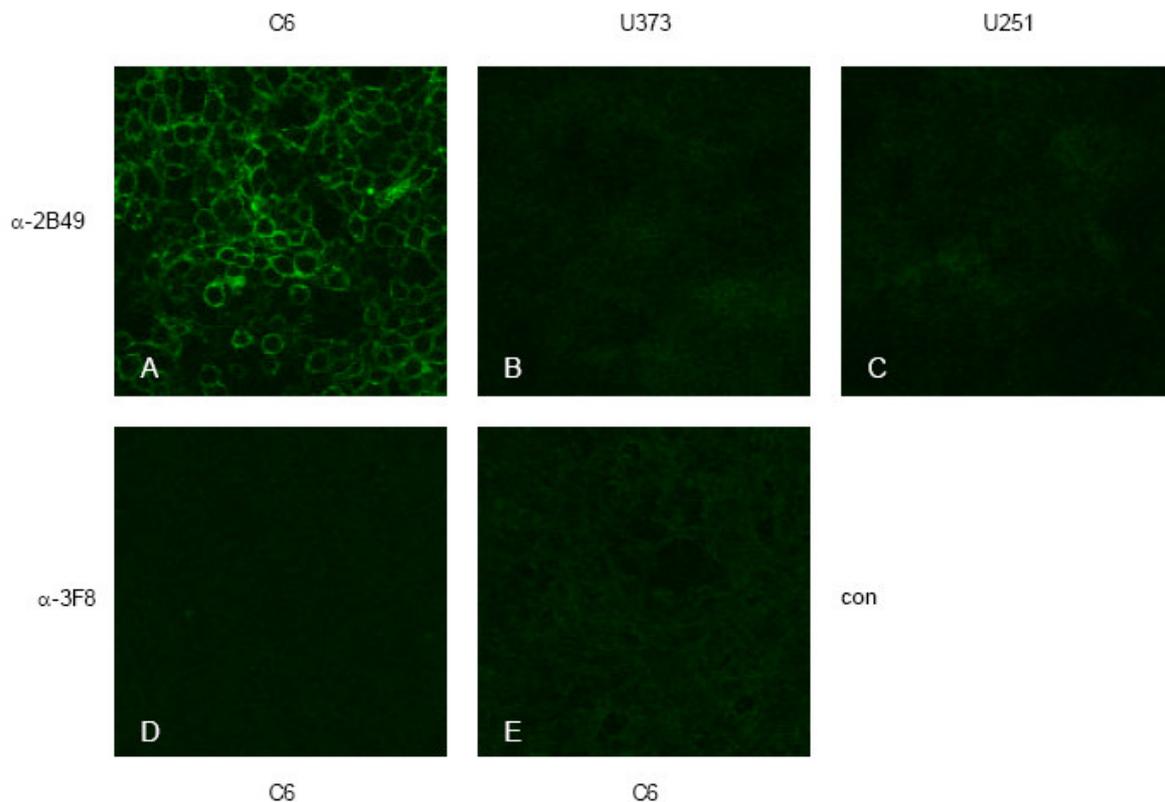


Abbildung 19. Immunfluoreszenzfärbungen der Zelllinien C6, U373 und U251 mit Antikörpern gegen PTP ζ (2B49 und 3F8).

Auf Glasplättchen ausgesäte Zellen wurden nach Fixierung mit den Antikörpern 2B49 und 3F8 gefärbt. Der gegen PTP ζ aus Ratte hergestellte monoklonale Antikörper 2B49 färbte PTP ζ auch nur auf den Rattenzellen C6 (A). Die beiden humanen Zelllinien konnten weder mit dem Antikörper 2B49 (B und C) noch mit dem Antikörper 3F8 (Daten nicht gezeigt) angefärbt werden. PTP ζ konnte in C6-Zellen mit dem Antikörper 3F8 nicht nachgewiesen werden (D). Um unspezifische Färbung auszuschließen, wurden C6-Zellen ohne Erstantikörper behandelt (E, repräsentatives Bild). Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) gemacht; Objektiv 1:40.

3.5.2 Posttranslationale Modifikation der kurzen Spleißvariante von PTP ζ

Die lange Rezeptorform von PTP ζ ist stark posttranslational modifiziert. Den Hauptteil der Modifikationen bilden vor allem Chondroitinsulfat-Seitenketten (Barnea et al., 1994). Da die CS-Seitenketten im membrannahen extrazellulären Teil der Aminosäuresequenz verankert sind und dieser Teil bei der kurzen Form PTP ζ -B deletiert ist, kann diese auch keine dort angehefteten Seitenketten tragen (vgl. Abb. 3). In einem embryonalen Entwicklungsstadium des Rattenhirns wurde PTP ζ -B jedoch auch bereits mit Chondroitinsulfat-Seitenketten modifiziert gefunden (Sakurai et al., 1996). Ob dies auch in C6-Zellen der Fall war, wurde durch einen Verdau mit Chondroitinase überprüft.

Das Proteinlysate von C6-Rattengliomzellen wurde in einem mit Proteaseinhibitoren angereicherten Puffer mit proteasefreier Chondroitinase ABC (Seikagaku) für 30 min bei 37°C inkubiert und im Western Blot analysiert (Abb. 20).

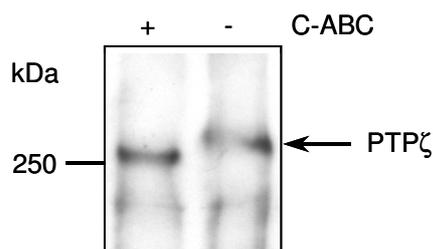


Abbildung 20. Abspaltung der Chondroitinsulfat-Seitenketten von PTP ζ -B durch enzymatischen Verdau mit Chondroitinase ABC in Rattenglioblastomzellen C6.

Proteinlysate der Zelllinie C6 wurden nach Verdau mit Chondroitinase ABC mittels Western Blot analysiert. Verwendet wurde der Antikörper 2B49, der gegen den N-Terminus von PTP ζ gerichtet ist. Die nachgewiesene kurze Form von PTP ζ zeigte nur einen schwachen Bandenshift durch Chondroitinaseverdau, diese Spleißvariante ist also nur leicht mit Chondroitinsulfat-Seitenketten modifiziert. Der Antikörper 2B49 detektierte PTP ζ in der modifizierten und der nicht-modifizierten Form.

Tatsächlich gab es einen kleinen Bandenshift auf Höhe der kurzen Form von PTP ζ , der bedeutet, dass PTP ζ -B leicht mit CS-Seitenketten modifiziert ist. Detektiert wurde mit dem Ratten-Antikörper 2B49, der das N-terminale Ende von PTP ζ erkannte. Dieser Antikörper, der auch zur Hemmung der Migration führte (s. 3.6.3), erkannte das Antigen also sowohl mit als auch ohne Chondroitinsulfat-Seitenketten.

Weitere Versuche mit Chondroitinase ABC führten leider nicht dazu, dass durch Abspaltung der langen CS-Seitenketten auch die lange Variante von PTP ζ im Western Blot sichtbar gemacht werden konnte.

3.6 Die Effekte von Pleiotrophin auf die Migration von Glioblastomzellen

Die Migration von Tumorzellen ist in hoch malignen Astrozytomen dafür verantwortlich, dass die Tumoren sich über ihr infiltrierendes Wachstum in alle Hirnbereiche hin ausdehnen (siehe Einleitung). Da Pleiotrophin und PTP ζ bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems in der Zellmigration eine besondere Rolle spielen, wurde von uns postuliert, dass den beiden Molekülen und dem durch sie vermittelten Signalweg auch in Tumorzellen eine Bedeutung zukommen könnte. Daher wurde eine mögliche Rolle von Pleiotrophin und PTP ζ bei der Gliomzellmigration untersucht.

Mit vier PTP ζ -exprimierenden und sechs PTP ζ nicht exprimierenden Glioblastomzelllinien wurden chemo- und haptotaktische Migrationsversuche durchgeführt. In die Versuche wurden auch die cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen CMECs mit eingeschlossen. Dass alle Zelllinien Pleiotrophin auch selbst exprimierten, war durch RT-PCR und Western Blot zuvor nachgewiesen worden (Daten nicht gezeigt).

Bei den in Abschnitt 3.6.1 beschriebenen chemotaktischen Versuchen handelte es sich um Stimulationsassays, in denen Zellen in Richtung eines positiven Gradienten eines löslichen Liganden wandern. Bei der Haptotaxis (vgl. Abschnitt 3.6.2) wandern Zellen in Richtung eines immobilisierten membrangebundenen Substrates. Diese Versuche wurden mittels eines modifizierten Boydenkammer-Assays durchgeführt (vgl. 1.2.3 und 2.3.1).

3.6.1 Die Gliomzellmigration wird chemotaktisch kaum von Pleiotrophin stimuliert

Pleiotrophin stimulierte die chemotaktische Migration bei 6 von 9 getesteten humanen Glioblastomzelllinien, die Effekte waren allerdings generell schwach. Maximal konnte eine zweifache Stimulation beobachtet werden, und zwar bei den Zelllinien G168 und G112 (Abb. 21, obere Schaubilder). Zellen der Linie U87 zeigten keinerlei chemotaktische Migration (Abb. 21, unten links). Cerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen ließen sich von Pleiotrophin ebenfalls nur schwach chemotaktisch stimulieren (Abb. 21, unten rechts).

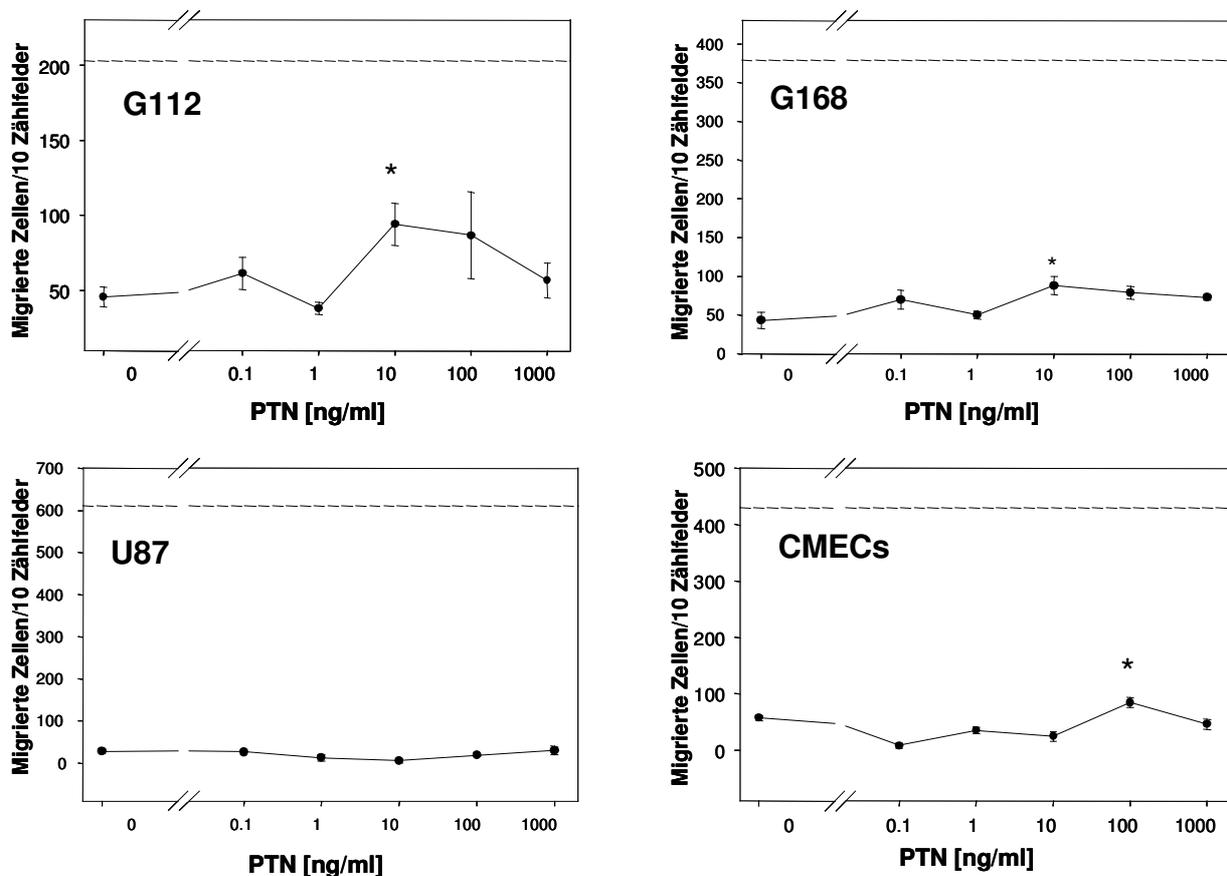


Abbildung 21. Chemotaktische Stimulation der Migration der humanen Glioblastomzelllinien U87, G112 und G168 sowie von cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (CMECs) durch Pleiotrophin.

Pleiotrophin wurde in verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,1 und 1000 ng/ml in die unteren Wells einer Boydenkammer gegeben, in den oberen Wells befanden sich jeweils 15000 Zellen (chemotaktischer mod. Boydenkammer-Assay). Durch die Sternchen sind jeweils signifikante Werte der Migrationsstimulation gekennzeichnet (Student'scher t-Test; $p < 0,05$). Die gestrichelte Linie repräsentiert die Migration der Zellen durch Stimulation mit Assaymedium, dem 10% FCS zugesetzt wurden (Positivkontrolle). Die Migration der anderen untersuchten Zelllinien wird in Tabelle 7 aufgelistet.

Die maximalen Effekte wurden bei einer Konzentration zwischen 10 und 100 ng/ml erreicht. Bei fast allen anderen Linien, darunter die humanen Zelllinien U373 und U251, betrug die Stimulation etwa das 1,5-fache, was nur zum Teil und nur knapp statistisch signifikant war (Tab. 7, Sternchen). Im Einzelnen sind die Werte für jede untersuchte Zelllinie in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7. Chemotaktische und haptotaktische Stimulation der Migration von Glioblastomzelllinien und von cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (CMECs) durch Pleiotrophin.

Zelllinie	Stimulation bei Chemotaxis x-fach	Stimulation bei Haptotaxis x-fach	Expression von Pleiotrophin	Expression von PTP ζ
G55	1,5	80,4*	+	-
G62	1,5*	200,0*	+	-
G112	2,0*	58,7*	+	+
G120	1,3	3,7	+	-
G168	2,0*	174,9*	+	-
U87	0,0	198,5*	+	-
U118	1,7*	9,5*	+	-
U251	1,4*	17,0*	+	+
U373	1,4*	35,6*	+	+
C6	1,4	120,8*	+	+
CMEC	1,5*	235,5*	+	-

Zusammenfassung der Ergebnisse chemotaktischer und haptotaktischer (vgl. 3.6.2) Migrationsstimulation durch Pleiotrophin. Angaben in x-fach bezogen auf die Migration stimuliert durch Assay-Medium bei den chemotaktischen Versuchen und durch immobilisiertes BSA bei den haptotaktischen Versuchen. Sternchen bezeichnen eine statistisch signifikante Stimulation der Migration - bei der Chemotaxis verglichen mit Assay-Medium, bei der Haptotaxis verglichen mit der BSA-Kontrollbeschichtung ($p < 0,05$; Student'scher t-Test).

3.6.2 Starke haptotaktische Stimulation der Gliomzellmigration durch Pleiotrophin

Zur haptotaktischen Stimulation der Migration wurde die Unterseite eines Polycarbonat-Porenfilters mit Pleiotrophin beschichtet – in den Konzentrationen zwischen 0,5 und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Als unspezifisches Kontrollsubstrat diente BSA in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Untersucht wurden die in Tabelle 7 aufgelisteten Zelllinien.

Für 8 der 9 untersuchten Zelllinien wurde eine sehr starke Stimulation der Migration bei 2 bis 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pleiotrophin beobachtet, eine Ausnahme bildete die Linie G120, die sich nicht signifikant stimulieren ließ. Maximal wurde eine 200-fache Stimulation beobachtet (Zelllinie G62). Die maximalen Effekte wurden oft erst bei der höchsten Konzentration erreicht (Abb. 22; U87, G55, U251, U373). In der Rattengliomzelllinie C6 führten bereits 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pleiotrophin zur maximalen Stimulation der Migration (Abb. 22). Die cerebralen Endothelzellen ließen sich mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pleiotropin ebenfalls sehr stark stimulieren (Abb. 22, rechts).

Bemerkenswert war allerdings, dass kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der Höhe der Stimulation und der Expression von PTP ζ beobachtet werden konnte. Die PTP ζ -exprimierenden Zelllinien G112, U373, U251 und C6 ließen sich zwischen 17- und 120-fach stimulieren; alle anderen Zelllinien, die PTP ζ nicht exprimierten, ließen sich jedoch ebenfalls um das 4- bis 200-fache stimulieren.

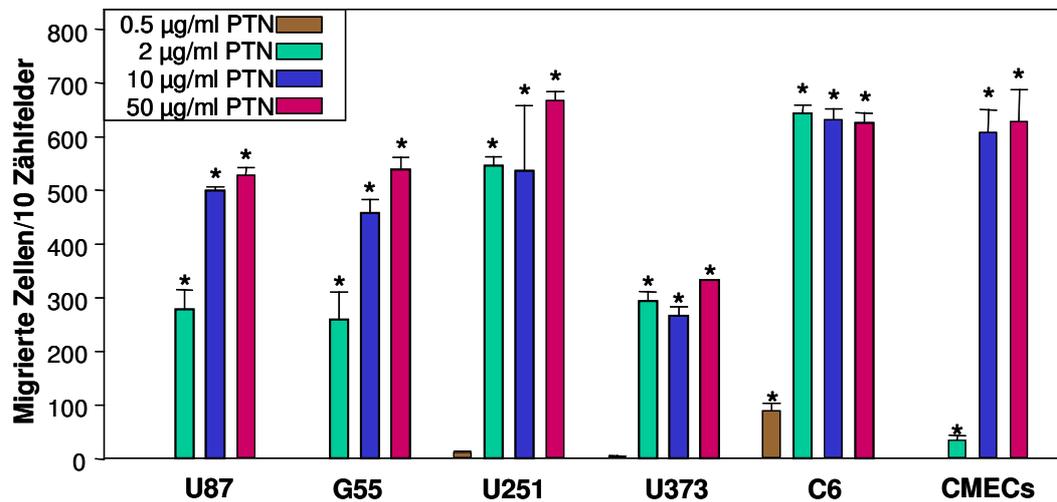


Abbildung 22. Durch Pleiotrophin stimulierte haptotaktische Migration von 5 ausgewählten Glioblastomzelllinien und CMECs.

Die Unterseite eines Porenfilters wurde mit Pleiotrophin in verschiedenen Konzentrationen von 0,5 – 50 µg/ml bzw. mit BSA (50 µg/ml) als Kontrolle beschichtet (haptotaktischer modifizierter Boydenkammer-Assay). Die Stimulation der Migration durch BSA betrug bei allen Zelllinien <10 Zellen/10 Zählfelder (Daten nicht gezeigt). Sterne bezeichnen eine signifikante Stimulation der Migration (Student'scher t-Test; $p < 0,05$). Das Schaubild zeigt nur eine Auswahl der untersuchten Zelllinien; alle Zelllinien sind in Tabelle 7 aufgelistet.

3.6.3 Ein monoklonaler Antikörper gegen PTP ζ hemmt die haptotaktische durch Pleiotrophin stimulierte Migration von Rattengliomzellen C6

Der Antikörper 2B49 wurde in einem funktionellen Assay eingesetzt, in welchem die haptotaktische Migration von PTP ζ -exprimierenden C6-Rattengliomzellen bei Stimulation durch Pleiotrophin untersucht wurde. Auf das Rattengliommodell wurde zurück gegriffen, da der Antikörper 2B49 auf diesen Zellen - im Gegensatz zu humanen Zellen - eindeutig PTP ζ erkannt hatte; und zwar nicht nur im denaturierten, sondern auch im nativen Zustand (vgl. Western Blot und Immunfluoreszenz Abb. 18 und 19). 2B49 ist gegen ein N-terminales, also extrazelluläres Epitop von PTP ζ gerichtet; im Gegensatz dazu ist der verfügbare Antikörper gegen humane PTP ζ (α -PTP ζ) gegen ein intrazelluläres Epitop gerichtet. Wie im vorherigen Boydenkammer-

Assay wurde die Unterseite eines Porenfilters zunächst mit 50 µg/ml Pleiotrophin bzw. den Kontrollsubstanzen Kollagen und BSA beschichtet.

Den C6-Zellen wurde in verschiedenen Konzentrationen (Verdünnungen 1:100, 1:500) Antikörper 2B49 zugesetzt, der den Rezeptor PTP ζ an der extrazellulären Domäne binden und durch Störung der Wechselwirkung von Pleiotrophin und PTP ζ die Migration hemmen sollte (Abb. 23). Diese Hemmung war bei einer 1:100 - Verdünnung des Antikörpers sehr stark (etwa 62%) und sogar bei der hohen 1:500 - Verdünnung noch signifikant (Abb. 23, Mitte; Hemmung 38%). Bei der Vergleichsbeschichtung mit Kollagen zeigte der Antikörper keine Effekte.

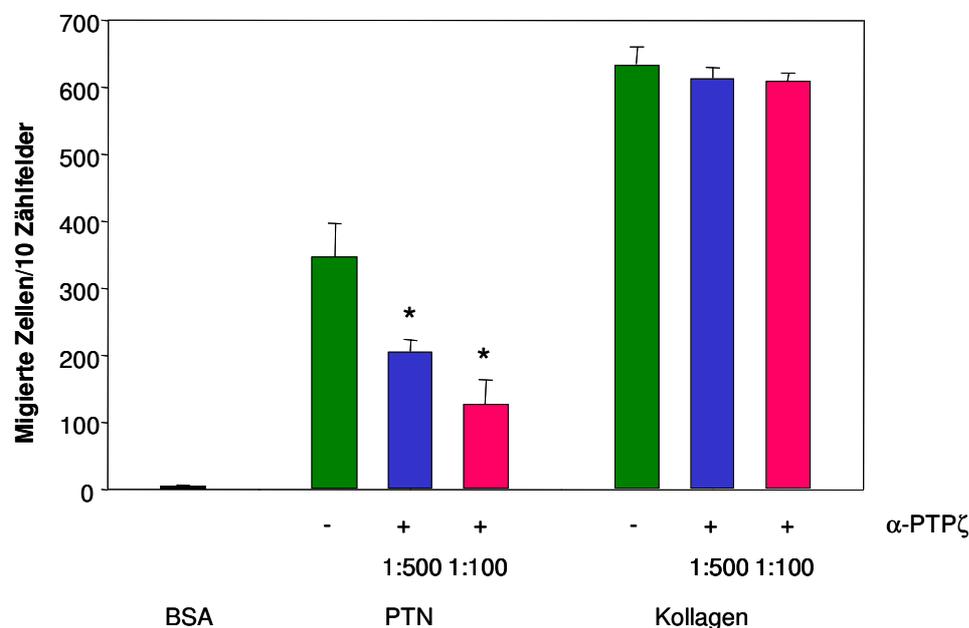


Abbildung 23. Spezifische Hemmung der Migration von C6-Rattengliomzellen nach Pleiotrophin-Stimulation durch einen monoklonalen Antikörper gegen PTP ζ .

In einem modifizierten Boydenkammer-Assay wurde die Unterseite eines Porenfilters mit 50 µg/ml Pleiotrophin, Kollagen oder BSA beschichtet. Jeweils 15000 C6-Rattengliomzellen wurden zusammen mit (oder als Kontrolle ohne) Antikörper gegen den N-Terminus von PTP ζ (2B49) in die oberen Wells der Boydenkammer ausgesät. Die Stimulation der Migration durch BSA betrug bei allen Zelllinien <10 Zellen/10 Zählfelder (Daten nicht gezeigt). Sterne bezeichnen eine signifikante Hemmung der Migrationsstimulation (Student'scher t-Test; $p < 0,05$). Der Antikörper 2B49 blockierte konzentrationsabhängig die Pleiotrophin-induzierte haptotaktische Migration der C6-Zellen. Auf die von Kollagen induzierte Migration hatte der Antikörper keinen Effekt.

3.7 „Knockdown“ der PTP ζ -Expression in humanen Glioblastomzellen durch RNA-Interferenz

Die Wechselwirkung zwischen Pleiotrophin und PTP ζ konnte in Rattengliomzellen C6 durch einen Antikörper gegen PTP ζ inhibiert werden. In humanen Gliomzellen war dies bisher nicht gelungen, da kein geeigneter Antikörper gegen die humane PTP ζ zur Verfügung stand. Da eine Überexpression von PTP ζ in humanen Glioblastomzellen nicht gelungen war (vgl. 3.4), wodurch funktionelle Untersuchungen möglich geworden wären, wurde nun nach Alternativen gesucht, PTP ζ auf andere Weise, d. h. ohne Mitwirkung eines Antikörpers zu blockieren.

Es gibt zahlreiche Methoden, um die Expression von PTP ζ in der Zelle zu unterdrücken, u. a. „antisense“-Oligonukleotide, DNA-Enzyme und RNA-Interferenz (RNAi). Studien der vergangenen Jahre deuteten darauf hin, dass RNAi in dieser Hinsicht die einfachste und effektivste Methode ist. Dabei werden kleine doppelsträngige RNA-Fragmente mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden durch Transfektion in die Zelle gebracht. Diese kleine interferierende RNA, die so genannte siRNA (small interfering RNA) degradiert die sequenzkomplementäre zelleigene RNA (Elbashir et al., 2001a; vgl. 2.5.9). Diese Technik wurde ausgewählt, um die Expression der mRNA von PTP ζ zu hemmen. Als humane Glioblastomzelllinie eignete sich die PTP ζ -exprimierende Zelllinie U251, die sich bei Ko-Injektionen mit Matrigel - einer künstlichen Basalmembran, die das Anwachsen von Tumoren erleichtert - auch im Tierversuch als tumorigen erwies (vgl. 3.8).

Um eine für den „Knockdown“ von PTP ζ günstige Sequenz zu finden, mussten zahlreiche Regeln befolgt werden (Tuschl, 2002; vgl. 2.5.9.1). Die short interfering RNA-Sequenzen (siRNA-Sequenzen) wurden so gewählt, dass sie jeweils gegen alle drei Haupt-Spleißvarianten von PTP ζ gerichtet waren. Sowohl siRNA 2 (nt 153-175) als auch siRNA 14 (nt 2307-2329) lagen im 5'-Bereich der RNA-Sequenz, vor der ersten Spleißstelle (diese befindet sich bei 2410 nt). Auf Proteinebene entsprach dies der extrazellulären aminoterminalen Hälfte. Dies war insbesondere für funktionelle Tests von Bedeutung. Für die Detektion im Western Blot war wichtig, dass die kurze Form von PTP ζ unterdrückt wurde.

3.7.1 Mehrere siRNAs hemmen die Expression von PTP ζ

Zellen der humanen Glioblastomzelllinie U251 wurden wie in Abschnitt 2.5.9 beschrieben mit siRNA 14 transfiziert. Die RNA wurde nach 24 und 48 h in einem Northern Blot analysiert. Mit 100 nM siRNA gegen die im so genannten „Spacer-Bereich“ der Sequenz von PTP ζ gelegen kurzen RNA (siRNA 14) und dem Transfektionsreagenz TKO konnte auf RNA-Ebene ein starker Rückgang der Expression von PTP ζ bewirkt werden (Abb. 24). Die Hemmung der PTP ζ -Expression war 24 Stunden nach Transfektion deutlich und hielt selbst 48 Stunden nach Transfektion noch an (Abb. 24, Spuren 2 und 4). Der Effekt schien nach 48 Stunden sogar noch stärker, jedoch zeigte die Ladungskontrolle durch β -Aktin, dass hier etwas weniger RNA aufgetragen worden war (Abb. 24, untere Blothälfte). Die Expression aller drei nachgewiesenen Splei β varianten konnte durch siRNA14 herabreguliert werden. Da die kurze Rezeptorform PTP ζ -B in unbehandelten U251-Zellen stärker als die lange Form und Phosphacan exprimiert wird, war die Hemmung der Expression bei dieser Splei β form nicht so stark wie bei den langen Splei β varianten. Nach densitometrischer Auswertung und Normalisierung durch die Ladungskontrolle betrug der Rückgang der Expression von PTP ζ -B im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle bei den 24h-Werten 95%, bei den 48h-Werten sogar 99%.

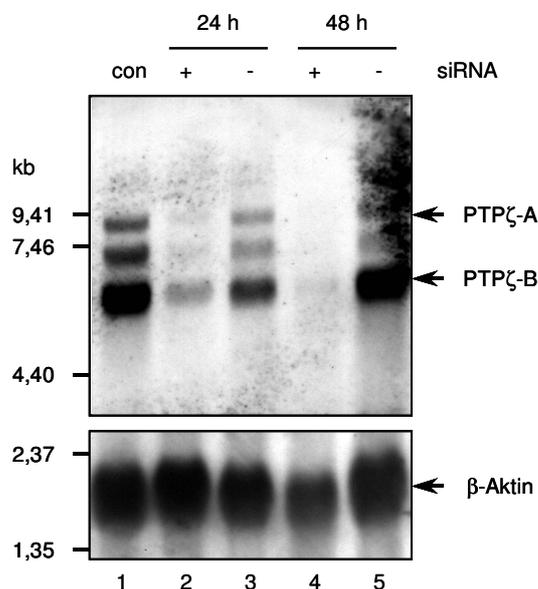


Abbildung 24. Hemmung der PTP ζ -Expression durch RNA-Interferenz.

RNA aus mit siRNA 14 transient transfizierten Zellen der Glioblastomzelllinie U251 wurde nach 24 bzw. 48 h in einem Northern Blot analysiert. Hybridisiert wurde mit der Sonde gegen den N-terminalen Bereich von PTP ζ und einer Sonde gegen β -Aktin. Die Expression der mRNA von PTP ζ konnte durch Transfektion von siRNA 14 gegen PTP ζ stark gehemmt werden (Spur 2). Der Effekt hielt wenigstens 48 h an (Spur 4). Zur Kontrolle wurde RNA der Linie U251 (wt, nicht transfiziert, Spur 1) aufgetragen.

In einem Wiederholungsversuch wurde ein weiteres Transfektionsreagenz (Effectene) und die zweite siRNA (siRNA 2) mit getestet. Nach 24 bzw. 48 h wurden die Zellen geerntet und zur Untersuchung der Expression RNA isoliert. Im Vergleich zwischen den Transfektionsreagenzien war TKO gegenüber Effectene weitaus wirkungsvoller (Abb. 25). Die Transfektionseffizienz von mit Effectene transfizierten Zellen konnte in keinem Versuch die nahezu 100%ige Effizienz von TKO erreichen (Daten nicht gezeigt). Die weitere getestete siRNA (siRNA 2) hatte die gleichen Effekte wie siRNA 14. Bei den mit TKO transfizierten Zellen hielt der RNA-Interferenz-Effekt bis zu 48 Stunden an, sowohl mit der am 5'-Ende gelegenen (siRNA 2) als auch mit der bei nt 2307-2329 gelegenen (siRNA 14) Sequenz.

Bei den mit Effectene transfizierten Zellen war der die RNA-Expression unterdrückende Effekt schon nach 48 Stunden wieder aufgehoben. Bei beiden siRNAs glich das Expressionsniveau nach 48 Stunden fast wieder dem der Kontrollen (Abb. 25).

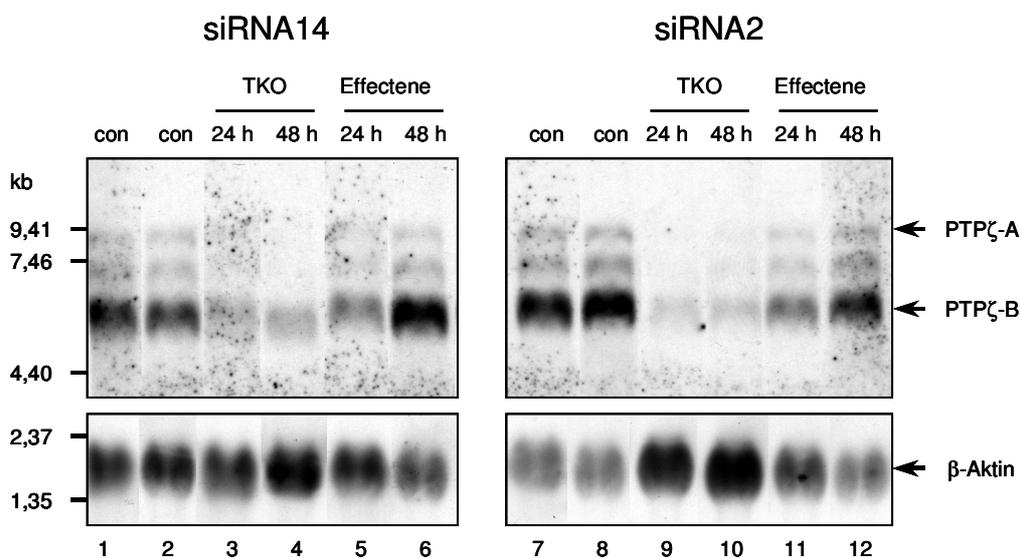


Abbildung 25. Optimierung der Transfektionsbedingungen zur Hemmung der Expression von PTPζ durch RNA-Interferenz.

Zellen der Glioblastomzelllinie U251 wurden mit zwei verschiedenen siRNAs, die gegen zwei unterschiedliche Bereiche von PTPζ gerichtet waren, transfiziert. Außerdem wurden zwei Transfektionsreagenzien getestet. RNA der Zellen wurde jeweils 24 h und 48 h nach Transfektion im Northern Blot analysiert. Hybridisiert wurde mit der Sonde gegen den N-terminalen Bereich von PTPζ und einer Sonde gegen β-Aktin. Das Transfektionsreagenz TKO (Spuren 3, 4, 9 und 10) hatte insgesamt eine stärkere Wirkung als Effectene (Spuren 5, 6, 11 und 12). Als beste siRNA erwies sich siRNA 2 (Spuren 9 und 10). Als Kontrollen (con) wurde jeweils RNA der nicht transfizierten wt-U251-Linie (Spuren 1, 2, 7 und 8) aufgetragen.

3.7.2 Hemmung der Migration PTP ζ -defizienter Glioblastomzellen

Untersucht wurde das haptotaktische Migrationsverhalten nach Stimulation durch 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ immobilisiertes Pleiotrophin. Als Kontrollsubstrat wurde immobilisiertes Kollagen (Vitrogen 100) verwendet. Die siRNA 2 gegen PTP ζ hemmte die Pleiotrophin-induzierte Migration von TKO-transfizierten Zellen (Abb. 26 A, rechte Balkengruppe). Im gleichen Umfang wurde jedoch auch die Zellmigration durch die Kontroll-siRNA blockiert. Der inhibitorische Effekt ging offensichtlich nicht von der Antagonisierung von PTP ζ aus. Nur mit TKO – aber ohne zusätzliche siRNA – transfizierte Zellen waren ebenfalls fast so stark in ihrer Migration eingeschränkt wie mit siRNA transfizierte Zellen. PTP ζ -reduzierte Zellen waren außerdem auch in ihrer durch (Kontroll-)Kollagen-induzierten Migration beeinträchtigt (Abb. 26 A, linke Balkengruppe).

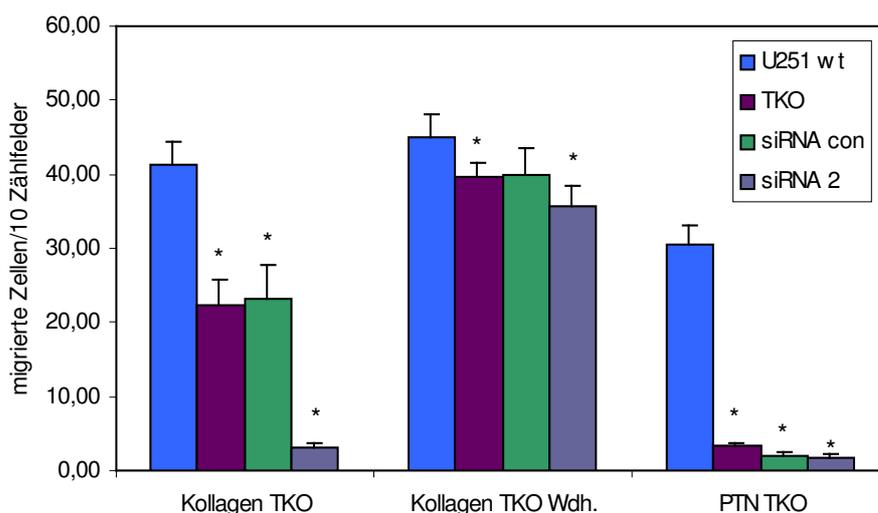


Abbildung 26. Hemmung der Pleiotrophin-induzierten Migration von transient PTP ζ -herabregulierten Glioblastomzellen U251.

Transient mit siRNA 2 transfizierte Gliomzellen U251 wurden in einem modifizierten Boydenkammer-Assay eingesetzt. Ein Polycarbonat-Filter wurde vor Beginn des Assays auf der Unterseite mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pleiotrophin bzw. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Vitrogen 100 (Kollagen) beschichtet (Haptotaxis-Assay). Die Sternchen bezeichnen eine statistisch signifikante Hemmung der Haptotaxis gegenüber den U251-wt-Zellen (Student'scher t-Test; $P < 0,05$). Die beobachteten Effekte werden im Text näher erläutert. TKO: Kontroll-Transfektion ohne siRNA; siRNA con: Kontroll-Transfektion mit in Säugerzellen nicht vorkommender siRNA gegen Luciferase-mRNA.

Die Migration TKO-behandelter Zellen sowie mit Kontroll-siRNA transfizierter Zellen war bei Kollagen um etwa 50% gehemmt. In einem Wiederholungsversuch dagegen blieben sämtliche

transfizierte und nicht-behandelte Zellen in ihrer Kollagen-stimulierten Wanderung unbeeinträchtigt (Abb. 26 A, mittlere Balkengruppierung). Die durch Pleiotrophin hervorgerufenen Effekte konnten auch im Wiederholungsversuch ähnlich dargestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Eine Beobachtung erklärte die Effekte der nur mit dem Transfektionsreagenz transfizierten Kontroll-Zellen. Bei mehrfach wiederholter Analyse der Zellen bei höherer Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop stellte sich heraus, dass Komplexe aus Transfektionsreagenz (TKO) und Kontroll-siRNA bei den transfizierten Zellen weitgehend an der Zellmembran angelagert waren. Wieviel davon ins Zellinnere gedrungen war, ließ sich nicht sichtbar machen. Dies hatte offensichtlich keine Auswirkungen auf die exzellente Transfektionseffizienz, wohl aber auf die Migration der Zellen.

3.7.3 Stabile Unterdrückung der Expression von PTP ζ in humanen Glioblastomzellen

Zur dauerhaften Herabregulation der RNA-Expression von PTP ζ und zur Vermeidung von Problemen mit den Transfektionsreagenzien bei funktionellen Assays wurde eine stabil siRNA exprimierende Glioblastomzelllinie U251 hergestellt.

Dazu wurde die Sequenz siRNA 2 in den Expressionsvektor pSUPER kloniert (vgl. 2.5.9.2). U251-Zellen wurden wie ebenfalls unter 2.5.9.2 beschrieben transfiziert, selektiert und aus vereinzelt Zellkolonien Klonpopulationen gewonnen. 31 selektierte und 5 Kontroll-transfizierte Klone wurden im Western Blot auf Expression von PTP ζ untersucht. Die meisten Klone zeigten keine oder kaum Reduktion der Expression von PTP ζ . Bei vier Klonen jedoch konnte eine deutliche Reduktion des Expressionsniveaus festgestellt werden.

Zwei dieser Klone sind in Abbildung 27 gezeigt. Im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Klonen (Spuren 4 und 5) und der nicht transfizierten Zelllinie U251 (wt, Spur 3), ist die Expression von PTP ζ in Klon 39 leicht, in Klon 11 stark reduziert (Spuren 1 und 2).

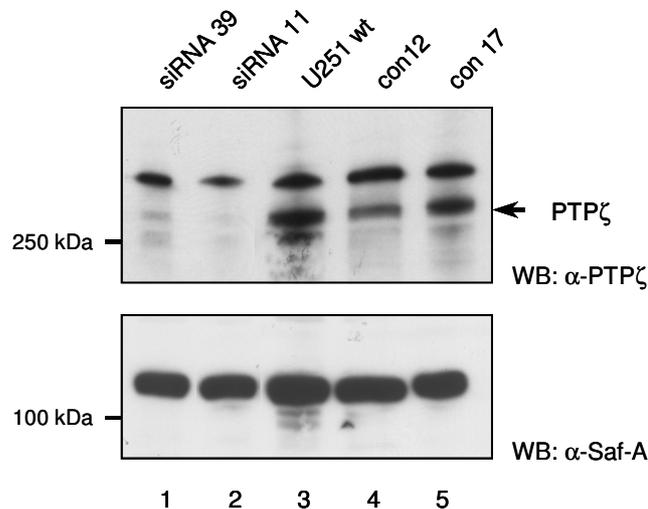


Abbildung 27. Reduktion der Proteinexpression von PTP ζ -B durch stabile Transfektion der humanen Gliomzelllinie U251 mit einem für siRNA 2 kodierenden Expressionsvektor.

Gesamtprotein aus stabil mit pSUPER-PTP ζ transfizierten und selektionierten Zellklonen wurde im Western Blot analysiert. Zur Kontrolle wurden stabil transfizierte Kontrollklone (pSUPER/pEGFP: con 12, con 17) und U251-Zellen (wt) analysiert. Detektiert wurde die kurze Rezeptorform von PTP ζ (PTP ζ -B) mit dem monoklonalen Antikörper α -PTP ζ . Zur Normalisierung der PTP ζ -Signale wurde der Blot mit Coomassie gefärbt (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde die Membran mit dem polyklonalen Antikörper α -SAF-A inkubiert. Die Expression von PTP ζ -B war bei den Klonen 39 und 11 stark reduziert.

Zur Normalisierung der aufgetragenen Proteinmengen wurde die Membran desselben Blots mit Coomassie-Blau angefärbt. Diese Färbung bestätigte den Gelauftrag und Membrantransfer gleicher Proteinmengen (Daten nicht gezeigt).

Außerdem wurde die Membran gestrippt und mit einem Antikörper gegen das Zellkernprotein SAF-A inkubiert. SAF-A (scaffold attachment factor-A) ist eines der zehn häufigsten Proteine der Kernmatrix und hat durch seine DNA- und RNA-bindenden Eigenschaften vielseitige Funktionen, z. B. bei der Zellkernarchitektur und der Organisation von Chromatin. Durch seine hohe Kopienzahl im Zellkern eignet sich SAF-A gut zur Normalisierung von Zellzahlen bzw. Zellproteinmengen (Kipp et al., 2000; Fackelmayer et al., 1994). In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass es sich jeweils um etwa gleiche Bandenstärken von Saf-A, d. h. um gleiche Proteinmengen, handelte (untere Blothälfte, Spuren 1-5). Die Expression von SAF-A war also offenbar von der Transfektion mit siRNA unbeeinträchtigt geblieben.

3.7.4 Migrationsverhalten wenig PTP ζ exprimierender Glioblastomzellen

Der in Abschnitt 3.7.2 beschriebene Migrationsassay konnte durch die Verwendung von stabil siRNA 2 exprimierenden Zellen wiederholt werden, ohne dass mögliche Einflüsse des oben verwendeten Transfektionsagens berücksichtigt werden mussten. Die haptotaktische Stimulation der Migration durch Pleiotrophin war bei dem kaum noch PTP ζ exprimierenden Klon 11 bezogen auf die Kontrollzellklone (leerer Vektor) um etwa 70% gehemmt. Die Migration von Zellen der Klonpopulation siRNA 39 mit einer Restexpression an PTP ζ war um etwas mehr als 50% inhibiert (Abb. 26, mittlere Balkengruppe). Die beiden getesteten Kontrollsubstrate Kollagen (linke Balkengruppe) und Fibronectin (rechte Balkengruppe) hatten weder auf die Migration PTP ζ -defizienter Zellen noch auf die Migration von Kontrollzellen einen statistisch signifikanten Effekt.

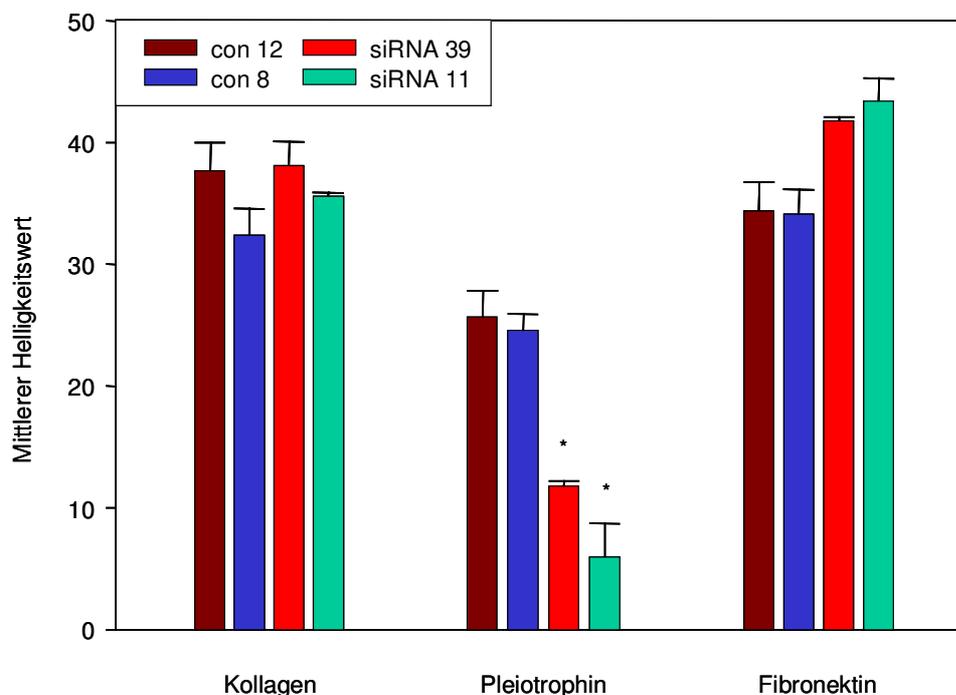


Abbildung 28. Hemmung der haptotaktischen Stimulation der Migration nach konstanter Verminderung der Expression von PTP ζ durch RNA-Interferenz.

Die Migration von Zellen der Glioblastomzelllinie U251, die siRNA gegen PTP ζ stabil exprimierten, wurde im modifizierten Boydenkammer-Assay von folgenden Substraten stimuliert: Kollagen, Pleiotrophin und Fibronectin. Die Unterseite des Porenfilters war mit jeweils 50 $\mu\text{g/ml}$ des entsprechenden Substrates beschichtet (Haptotaxis-Assay). Die Migration der Zellen wurde durch Pleiotrophin bei den beiden Zellpopulationen gehemmt, bei denen durch siRNA-Expression die Expression von PTP ζ reduziert war (siRNA 39 und siRNA 11). Klon 11 exprimierte kaum noch PTP ζ und wurde daher auch am stärksten in seiner Migration gehemmt. Die Kontroll-Zellen wurden in ihrer Migration nicht inhibiert (con 12 und 8; transfiziert mit leerem Vektor). Die Sterne geben eine statistisch signifikante Hemmung der Haptotaxis im Vergleich zu den Kontrollzellen an (Student'scher t-Test; $P < 0,05$).

3.7.5 PTP ζ ist für die Zellproliferation wichtig

In ihrer Morphologie unterschieden sich die gering PTP ζ exprimierenden Klone von den Kontroll-Klonen nicht. Die größte Auffälligkeit bei Klon 11, der kaum noch PTP ζ exprimierte, war die eindeutige starke Wachstumshemmung, die die normale Kultivierung stark verlangsamte. Diese war bei anderen wenig PTP ζ exprimierenden Klonen nicht ganz so deutlich. Zur genaueren Analyse wurde über acht Tage ein Proliferationsassay durchgeführt. Dieser Assay bestätigte die makroskopisch getätigten Beobachtungen (Abb. 28). Die zur Kontrolle transfizierten Klone (leerer Vektor) sowie die nicht transfizierten Zellen der Zelllinie U251 (wt) wuchsen weiterhin exponentiell (Abb. 28, con 8 und U251) - mit einer Einschränkung bei Kontrollklon 12 (con 12). Das Wachstum der noch PTP ζ exprimierenden Zellen von Klon 39 war stark gehemmt (siRNA 39). Im Vergleich dazu jedoch wuchsen Zellen von Klon 11 fast überhaupt nicht mehr (siRNA 11). Zellen dieser Klonpopulation zeigten im Western Blot auch kaum noch eine Expression von PTP ζ . Die Proliferationshemmung von Zellen der Klone 11 und 39 war an Tag 9 statistisch hoch signifikant sowohl in Bezug zu U251-Wildtyp-Zellen als auch in Bezug zu beiden Kontrollklonen (Student'scher t-Test, $p < 0,001$). Die Verringerung des Expressionsniveaus von PTP ζ führte also zu verminderter Proliferation.

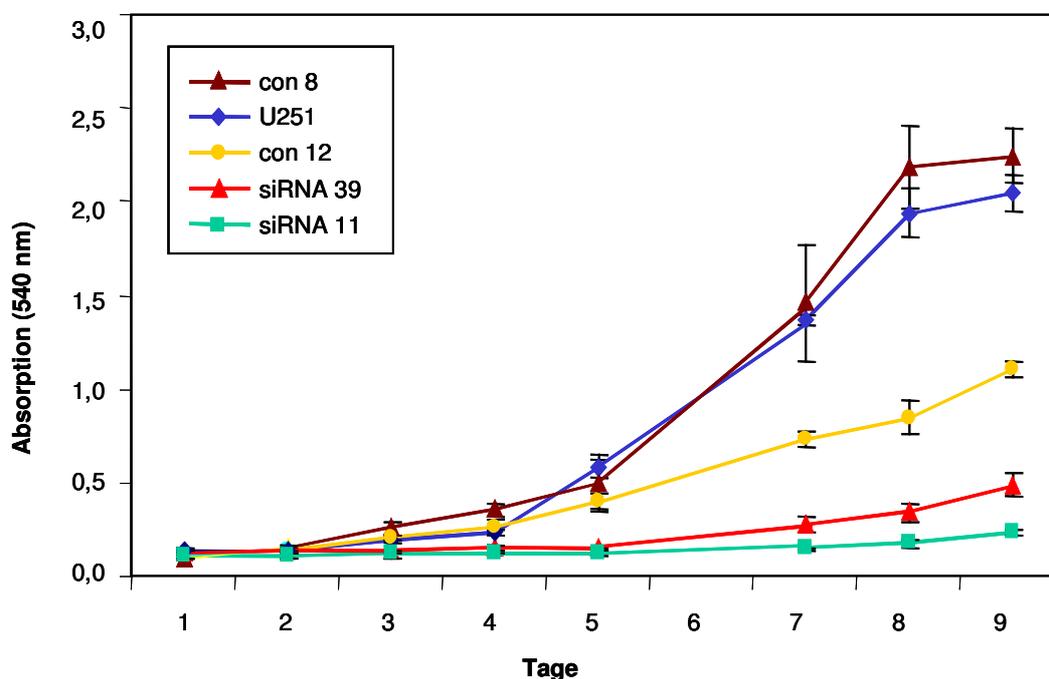


Abbildung 29. Hemmung der Proliferation durch reduzierte Expression von PTP ζ in der Glioblastomzelllinie U251.

Mit Zellen, die wenig PTP ζ exprimierten, sowie mit Kontrollzellen (leerer Vektor) wurde ein Proliferationsassay (12-fach-Bestimmung) durchgeführt. Die PTP ζ -reduzierten Klonpopulationen (siRNA Klon 11 und 39) proliferierten im Vergleich zu Wildtyp-U251-Zellen (U251) und Kontrolltransfizierten Zellpopulationen (con 8 und con 12) kaum noch.

3.7.6 PTP ζ wird für das *in vivo*-Wachstum von Gliomzellen benötigt

Um zu untersuchen, welche Effekte die verringerte Expression von PTP ζ auf das Gliomwachstum *in vivo* hatte, wurden Zellen der Klone, die PTP ζ reduziert exprimierten, in die Flanken von Nacktmäusen injiziert und das Tumorstadium *in vivo* analysiert.

Dazu wurden subkonfluent gewachsene U251-Gliomzellen der Klone 11 und 39, sowie Zellen von zwei Kontrollklonen im Verhältnis 1:1 mit Matrigel gemischt und jeweils 10 Mio. Zellen subkutan in die Flanken von 4 bis 7 Wochen alten Nacktmäusen (NMRI-*nu/nu*) injiziert. Matrigel ist eine artifizielle Basalmembran und ähnelt durch den Gehalt an Kollagenen, Lamininen, Proteoglykanen, sowie Enzymen, Inhibitoren und Wachstumsfaktoren der extrazellulären Matrix. Matrigel verstärkt die *in vivo*-Tumorigenität und führt bei den sonst nur schwach tumorigenen U251-Gliomzellen zu einer 100%igen Tumorangehrate (Akbasak et al., 1996).

Das Tumorstadium bestimmte sich aus den wöchentlich mit einer Schieblehre gemessenen Tumordurchmessern nach folgender Formel: $V = (1/6)\pi(d_1d_2d_3)$. Nach 12 Wochen erreichten die größten Tumore einen Maximaldurchmesser von etwa 20 mm, daraufhin wurde der Versuch beendet.

Gliomzellen der Kontrollklone begannen nach etwa 6 Wochen mit einem leichten Anstieg des Tumorstadiums (Abb. 30, con 8 und 12), das nach 10 Wochen in ein exponentielles Wachstum überging. Die Gliomzellen der PTP ζ -reduzierten siRNA-Klone wuchsen dagegen auch nach 12 Wochen überhaupt nicht (Abb. 30, siRNA Klon 11 und Klon 39) - unabhängig von der Stärke der Restexpression von PTP ζ .

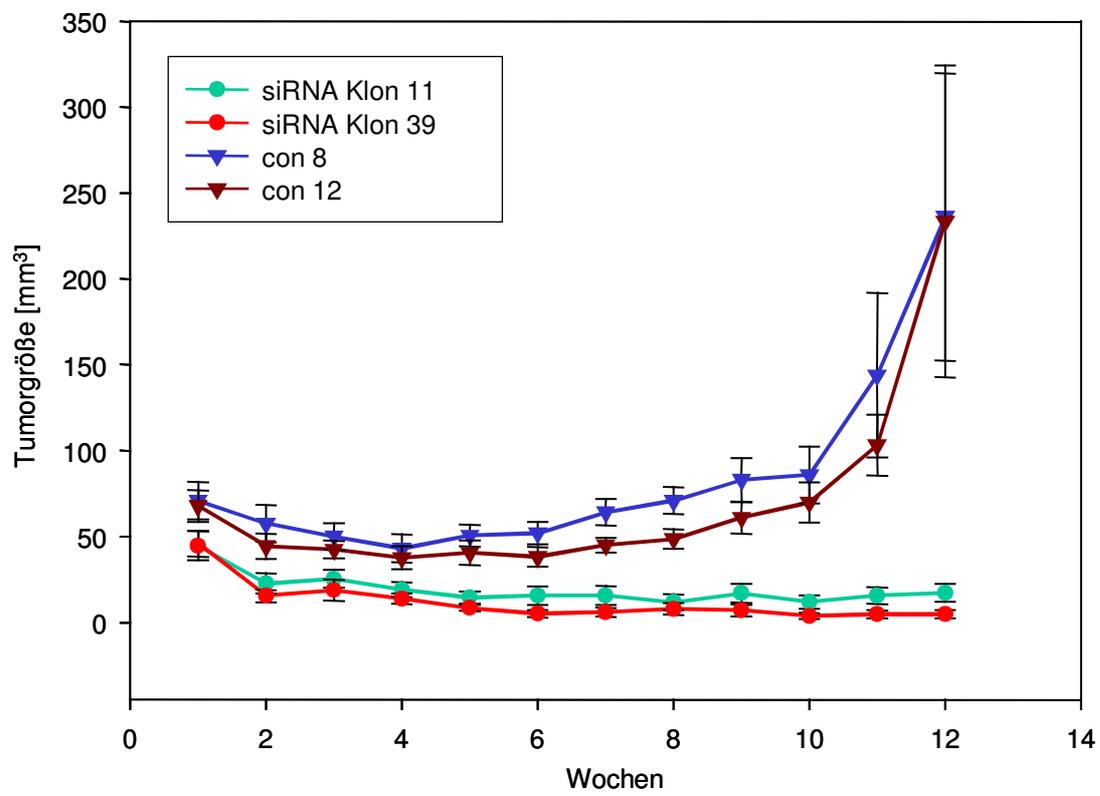


Abbildung 30. *In vivo*-Wachstum der PTP ζ -herabregulierten Gliomzellklone.

Tumorgößen von durch Glioblastomzellen mit reduziertem PTP ζ -Gehalt bzw. von durch Kontrollzellen mit normalem PTP ζ -Gehalt induzierten Tumoren nach subkutaner Injektion in die Flanken von Nacktmäusen. Gliomzellen der Zelllinie U251, die wenig (siRNA 39) oder kaum noch (siRNA 11) PTP ζ exprimierten, waren in ihrem *in vivo*-Wachstum im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen praktisch vollständig gehemmt.

3.7.7 Proliferative Aktivität PTP ζ -herabregulierter Gliomzellen *in vivo*

Zur Messung der proliferativen Aktivität der Tumorzellen wurden Paraffinschnitte der *in vivo* gewachsenen Klone mit einem monoklonalen MIB-1-Antikörper (DAKO) gegen das Ki-67 Antigen gefärbt. Der Anteil positiv angefärbter Zellkerne wurde bestimmt, indem die immunreaktiven Zellkerne in jeweils 3 zufällig ausgewählten Zählfeldern, sowie in jeweils 3 Zählfeldern der stark proliferierenden Tumorzonen gezählt wurden. Während die Tumore mit den Kontrollzellen jeweils etwa 50% immunreaktive Zellkerne enthielten, waren bei den kaum gewachsenen Tumoren mit herabreguliertem Gehalt an PTP ζ nur etwa 15 - 25% der Zellkerne in proliferativer Aktivität (Abb. 31). PTP ζ ist für das *in vivo*-Wachstum und die *in vivo*-Proliferation offensichtlich von entscheidender Bedeutung.

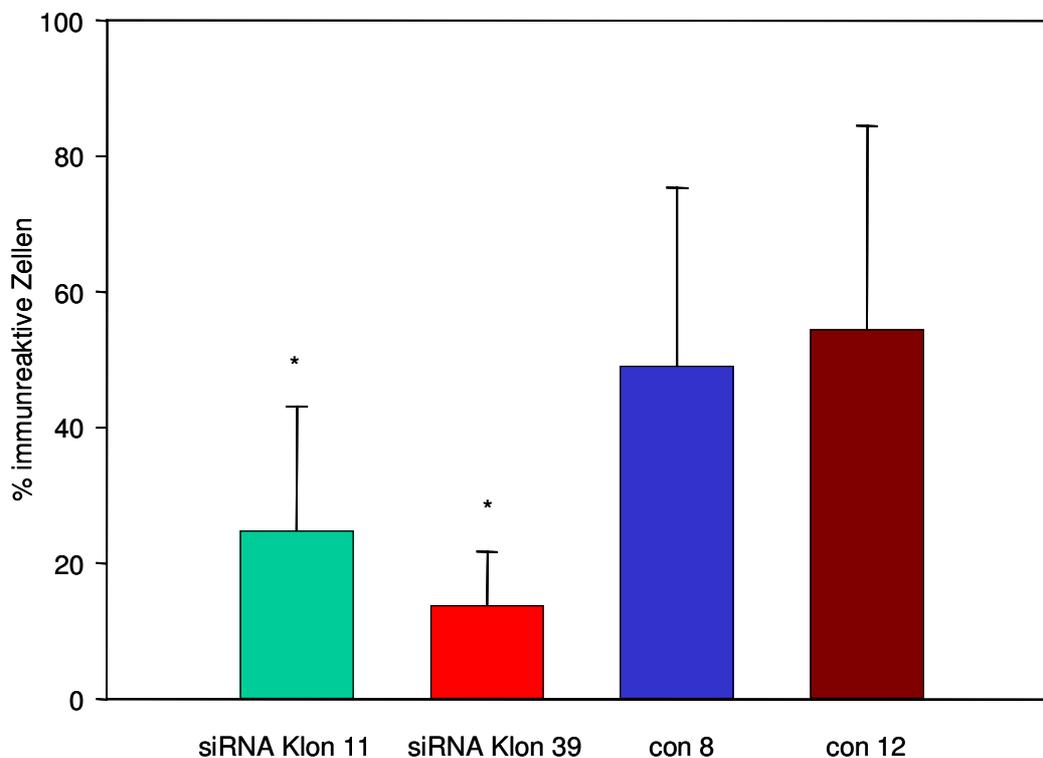


Abbildung 31. *In vivo*-Proliferation der PTP ζ -herabregulierten Gliomzellklone.

Paraffinschnitte der *in vivo* gewachsenen Tumore von PTP ζ -herabregulierten Gliomzellen sowie von Tumoren mit normalem PTP ζ -Level wurden immunhistochemisch nach einem Standardprotokoll mit einem α -MIB-1-Antikörper gefärbt. Tumore, die wenig PTP ζ exprimierten (Klon 11 und Klon 39), proliferierten deutlich geringer als Tumore mit normalem PTP ζ -Gehalt (con 8 und con 12). Die Sterne bezeichnen eine statistisch signifikante Reduktion im Vergleich zu den Kontrollen (Student'scher t-Test; $P < 0,05$).

3.7.8 Apoptoserate *in vivo* gewachsener PTP ζ -reduzierter Gliomzellen

Um zu untersuchen, ob in den *in vivo* gewachsenen Tumoren apoptotische Zellen vorhanden waren, wurden ebenfalls Paraffinschnitte der Tumoren immunhistochemisch gefärbt. Verwendet wurde hier ein polyklonaler Antikörper gegen gespaltene Caspase-3 (cleaved caspase-3; Cell Signaling Technology). Immunreaktive Zellen wurden in jeweils 5 Zählfeldern ausgezählt, wobei nekrotische Tumorareale vermieden wurden. Während die Kontrolltumore mit normalem PTP ζ -Gehalt etwa 20% apoptotischer Zellen enthielten, war in Tumoren mit fast vollständiger Reduktion der PTP ζ -Expression (Klon 11) der Anteil Caspase-3-immunreaktiver Zellen auf etwa 12% gesenkt (Abb. 32). In Tumoren mit einer leichten PTP ζ -Restexpression (Klon 39) entsprach der Anteil apoptotischer Zellen etwa dem der Kontrolltumoren.

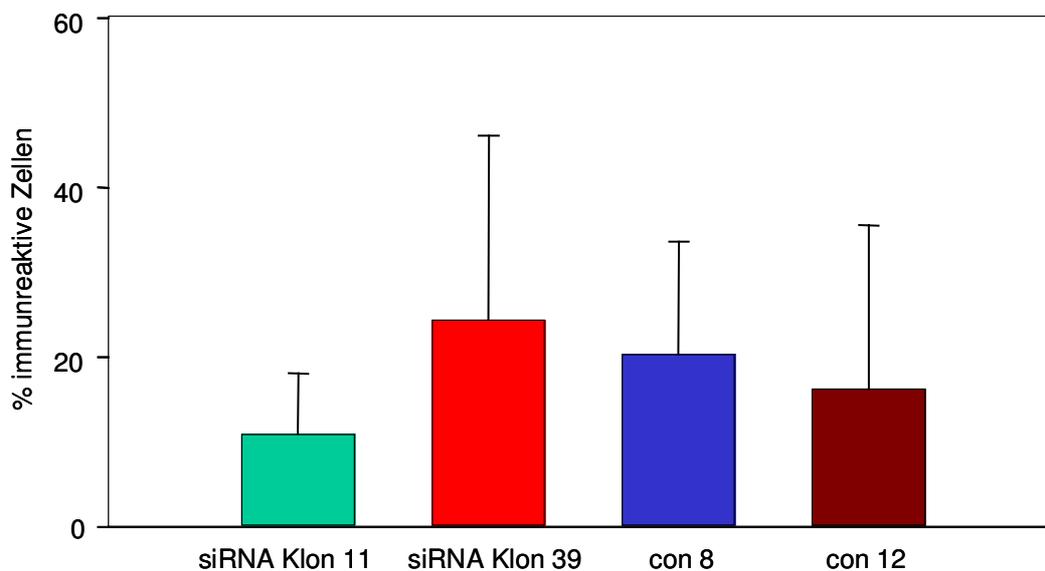


Abbildung 32. Apoptoserate PTP ζ -herabregulierter Gliomzellklone.

Paraffinschnitte der *in vivo* gewachsenen Tumore von PTP ζ -herabregulierten Gliomzellen sowie von Tumoren mit normalem PTP ζ -Level wurden immunhistochemisch nach einem Standardprotokoll mit einem α -cleaved-caspase-3-Antikörper gefärbt. Kontrolltumore (con 8; con 12) enthielten etwa 20% apoptotischer Zellen. Bei Tumoren, die weniger PTP ζ exprimierten, konnten 25% (siRNA Klon 39) bzw. 12% (siRNA Klon 11) apoptotischer Zellen detektiert werden.

4 Diskussion

4.1 Expressionsanalysen von PTP ζ und Pleiotrophin

Die Grundlagen der vorliegenden Arbeit wurden durch Ergebnisse von cDNA-Arrays geschaffen, in denen festgestellt wurde, dass PTP ζ und Pleiotrophin in humanen Glioblastomen im Vergleich zu Normalhirn hochreguliert sind (Müller et al., 2003). Um auszuschließen, dass es sich bei diesen Analysen um mögliche Artefakte handelte, wurden die im Folgenden diskutierten validierenden Methoden herangezogen. Dabei wurde die Expression auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht, und es erfolgten Untersuchungen zur Lokalisation und Quantifizierung der Expression.

4.1.1 Expression von PTP ζ

Für ein erstes Screening zur Validierung der cDNA-Array-Ergebnisse eignete sich die RT-PCR. Hier konnten auf mRNA-Ebene viele Proben in kurzer Zeit qualitativ untersucht werden. Außerdem waren dabei die kurze und lange Rezeptorform von PTP ζ leicht zu unterscheiden. Alle der 9 mittels RT-PCR untersuchten Glioblastome sowie auch 4 von 4 untersuchten Normalhirnproben exprimierten beide Rezeptorformen von PTP ζ : PTP ζ -A und PTP ζ -B (3.1.2). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einer bereits zuvor publizierten RT-PCR-Studie, in der bei 6 von 11 untersuchten Glioblastomproben keine Expression einer der beiden Rezeptorformen von PTP ζ gefunden wurde, sondern ausschließlich das Transkript der extrazellulär sezernierten Form Phosphacan (Norman et al., 1998). Dagegen fanden sich in 12 untersuchten niedriggradigen Gliomen beide Rezeptor-Spleißvarianten von PTP ζ . Es wurde vermutet, dass der Verlust der Expression der beiden PTP ζ -Rezeptorformen mit der Progression glialer Tumore korrelieren könnte. Die Ursache des Abweichens der Ergebnisse der Studie von Norman et al. verglichen mit denen der vorliegenden Arbeit ist nicht zu klären. Denkbar wäre beispielsweise, dass zum Teil nekrotische oder randliche Tumorareale in der Studie von Norman et al. für die mRNA-Extraktion verwendet wurden, was bei fehlender histologischer Kontrolle des Operationsmaterials durchaus vorkommen kann. Dies könnte eine mögliche Ursache für falsch negative Ergebnisse hinsichtlich des Nachweises von PTP ζ sein. Offenbar gingen Norman et al. von der Hypothese aus, dass es sich bei dem Gen von PTP ζ um ein Tumorsuppressorgen

handelt. Während Kinasen oftmals von Proto-Onkogenen kodiert werden, wird von Phosphatasen umgekehrt oftmals angenommen, dass sie Tumorsuppressorfunktion haben. Dabei wird davon ausgegangen, dass der Verlust an Dephosphorylierung, z. B. durch Mutation oder Inaktivierung einer Phosphatase, durch Anstieg phosphorylierter Produkte in der Zelle eine onkogene Wirkung hat. Als bekanntestes Beispiel für einen solchen Mechanismus in Gliomen gilt die kleine zytoplasmatisch exprimierte Phosphatase PTEN (vgl. 1.2.2), die bei der Regulation von Apoptose- sowie Zellinvasions- und Zellmigrationsmechanismen eine Rolle spielt (Tamura et al., 1999). PTEN ist bei etwa 30% der primären Glioblastome mutiert (vgl. Abb. 1), und der Verlust der PTEN-Wildtypfunktion gilt als wesentlicher Faktor, der für die Entstehung dieser Tumore mitentscheidend ist.

Es gibt jedoch auch Phosphatasen, denen eine onkogene Wirkung zugeschrieben wird. Beispielsweise können Phosphatasen Kinasen dephosphorylieren und dadurch aktivieren. In T-Zellen werden z. B. die src-Kinasen Lck und Fyn direkt von der transmembranären Rezeptor-Phosphatase CD45 (vgl. Abb. 2) dephosphoryliert und so in ihrer aktiven Konformation gehalten (Shiroo et al., 1992; Sieh et al., 1993). Ein direkter Einfluss von Protein-Tyrosinphosphatasen auf die Tumorzellproliferation konnte für die Rezeptor Protein-Tyrosinphosphatase RPTP α demonstriert werden. Die Überexpression von RPTP α führte in embryonalen Rattenfibroblasten zur direkten Aktivierung von Kinasen der src-Familie und somit zu verstärkter Zellproliferation und zur Zelltransformation (Zheng et al., 1992).

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten sprechen dafür, dass es sich bei PTP ζ nicht um ein Tumorsuppressorgen, sondern eher um ein Gen mit onkogenen Eigenschaften im Kontext von Gliomen handeln könnte. Denn die über die RT-PCR hinausgehenden Untersuchungen zur Expression von PTP ζ auf mRNA- und Proteinebene belegen ausnahmslos eine starke Expression in Glioblastomen und eine Assoziation mit dem Malignitätsgrad. Gegen eine Reduzierung der PTP ζ -Expression spricht außerdem die Lokalisation des PTP ζ -Gens (PTPRZ) auf den langen Arm von Chromosom 7, welches in malignen Astrozytomen oft amplifiziert ist (Ariyama et al., 1995; Sehgal, 1998).

Dass mithilfe der RT-PCR-Primer zwischen Phosphacan und der langen Variante von PTP ζ nicht unterschieden werden konnte, war ein Nachteil und ist darauf zurückzuführen, dass die Sequenzen der humanen RNA für den extrazellulären Teil von PTP ζ und Phosphacan identisch sind. In der Sequenz von PTP ζ aus Ratte gibt es einen Unterschied in den 3'-UTRs, den nicht translatierten Regionen am 3'-Ende (Maurel et al., 1994). Dieser Unterschied ist jedoch bei der

humanen RNA-Sequenz nicht bekannt. Zur Differenzierung der verschiedenen Spleißvarianten wurde daher eine Northern Blot-Analyse mit einer Sonde durchgeführt, die mit allen drei Haupt-Spleißvarianten PTP ζ -A, PTP ζ -B und Phosphacan hybridisiert. Mithilfe dieser am 5'-Ende der kodierenden Sequenz von PTP ζ gelegenen RNA-Sonde, die den Sequenzbereich der CAH-Domäne und der FNIII-Domäne teilweise abdeckt, konnten semiquantitative Aussagen in Bezug auf jede der drei Haupt-Spleißvarianten getroffen werden.

Alle der 19 im Northern Blot untersuchten Glioblastome sowie eines der drei Astrozytome WHO Grad II und drei Astrozytome WHO Grad III exprimierten alle drei PTP ζ -Spleißformen (vgl. 3.1.3). In Normalhirnproben waren die PTP ζ -Spleißvarianten dagegen nur auf einem sehr niedrigen Niveau nachweisbar. Die Hochregulation der kurzen Form PTP ζ -B war in Glioblastomen höher als die der langen Form PTP ζ -A und Phosphacan.

Interessanterweise wurde während der Durchführung der Experimente die Entdeckung einer neuen Spleißvariante, einer kurzen Isoform von Phosphacan (PSI), veröffentlicht (Garwood et al., 2003; vgl. 1.3.1). Mittels der genannten RNA-Sonde hätte PSI ebenfalls detektiert werden können. Dies war jedoch nicht der Fall. Möglicherweise war die kleinste Spleißvariante von 1,8 kb nicht hoch genug exprimiert, um in Northern Blot-Analysen detektiert werden zu können. Dies deutet darauf hin, dass nur die drei großen Haupt-Spleißvarianten PTP ζ -A, PTP ζ -B und Phosphacan bei Astrozytomen verstärkt exprimiert werden, nicht jedoch die kleinste Variante, PSI.

Mit der Northern Blot-Analyse konnten also die Ergebnisse der RT-PCR bestätigt werden. Demnach handelt es sich bei der in cDNA-Arrays gefundenen Hochregulation von PTP ζ in Glioblastomen verglichen mit Normalhirn um keine Artefakte, sondern um echte Ergebnisse.

Die erhöhte Expression eines Gens auf RNA-Ebene muss sich nicht zwangsläufig in der Verstärkung der entsprechenden Proteinexpression widerspiegeln. Daher wurden Western Blot-Analysen von Normalhirn- und Astrozytomproben durchgeführt, durch die PTP ζ auf Proteinebene detektiert werden konnte. Dabei zeigte sich, dass die kurze Spleißvariante PTP ζ -B in allen untersuchten Glioblastomen stark exprimiert wurde, während sie in Normalhirn und niedriggradigen Astrozytomen praktisch nicht nachweisbar war.

Der für den Western Blot verwendete Antikörper gegen PTP ζ war gegen ein C-terminales Epitop gerichtet, das sowohl bei PTP ζ -A als auch PTP ζ -B vorkommt, in der Praxis erkannte dieser Antikörper jedoch stets nur die kurze Form von PTP ζ . Dies fand sich in der Literatur bestätigt: Die Zelllinie U373 exprimiert - nachgewiesen durch den PTP ζ -Antikörper im Western

Blot - große Mengen an PTP ζ -B; dagegen kann PTP ζ -A - trotz der von uns im Northern Blot nachgewiesenen mRNA-Expression - auch von anderen Arbeitsgruppen mit diesem Antikörper nicht detektiert werden (Meng et al., 2000).

Es konnte also gezeigt werden, dass sich die in den cDNA-Arrays beobachtete Hochregulation der PTP ζ -Expression - zumindest für die kurze Rezeptorvariante, die ja auch auf mRNA-Ebene die am stärksten regulierte Form war - auf Proteinebene bestätigte.

Mit der Untersuchung einer repräsentativen Zahl von Astrozytomen durch immunhistochemische Färbungen wurde der Nachweis von PTP ζ abgerundet. Darüber hinaus konnte hierdurch die Expression von PTP ζ im Tumorgewebe lokalisiert werden.

In Normalhirn exprimierten nur wenige Neurone, in Glioblastomen jedoch fast alle Tumorzellen in großer Menge PTP ζ (vgl. 3.1.5). Die Hochregulation auf Proteinebene wurde durch diese Versuche noch einmal bestätigt. Niedriggradige Astrozytome exprimierten ebenfalls PTP ζ , wenngleich in deutlich geringerer Menge als Glioblastome, so dass sich bei der semiquantitativen Auswertung eine signifikante Assoziation mit dem Malignitätsgrad fand.

Obwohl früher angenommen wurde, dass die Expression von PTP ζ auf das zentrale Nervensystem beschränkt sei, konnte interessanterweise in primären humanen Melanomen und daraus entstandenen Metastasen immunhistochemisch ebenfalls eine Expression von PTP ζ nachgewiesen werden. In gesunden Melanozyten konnte dagegen keine PTP ζ -Expression detektiert werden (Goldmann et al., 2000). Entwicklungsbiologisch entstammen die Vorläufer der Hautzellen dem Neuroektoderm, d. h. sie haben einen gemeinsamen Ursprung mit den Zellen des zentralen Nervensystems. Dies könnte erklären, warum auch in transformierten Melanozyten eine Expression von PTP ζ zu beobachten ist.

Eine „Rückentwicklung“ der Expressionsniveaus bestimmter Gene auf das Niveau des Embryonalzustands wird während der Tumorigenese häufig beobachtet. Beispielsweise wird Brevican, ein Proteoglykan, das in Gliomen überexprimiert wird und auch in den dieser Arbeit zugrunde liegenden cDNA-Arrays als heraufreguliert gefunden wurde, in embryonalem sowie postnatalem Hirngewebe stark exprimiert, in adultem Gewebe jedoch nur schwach (Gary et al., 2000; Yamada et al., 1994). Ähnlich verhält es sich mit PDGF-A (platelet derived growth factor) und seinem Rezeptor, der Protein-Tyrosinkinase PDGFR- α , die im frühen Entwicklungsstadium von Vertebraten transient exprimiert werden (Pringle et al., 1991; Hoch & Soriano, 2003). Während der Progression von Astrozytomen wird dieses Liganden-Rezeptor-Paar schon früh, d. h. schon in niedriggradigen Astrozytomen exprimiert (Abb.1). Besonders PDGFR- α bleibt dann

auch in malignen sekundären Glioblastomen stark überexprimiert (vgl. 1.2.2). Von Brevican und PDGF-A/PDGFR- α wird angenommen, dass sie für die Migration und/oder Proliferation neuroglialer Vorläuferzellen relevant sind. Da Migration und Proliferation ebenfalls wichtige Eigenschaften von Gliomzellen sind, wird so deren „Re-Expression“ in den Tumorzellen erklärt. Mit PTP ζ wurde in der vorliegenden Arbeit ein weiteres Molekül identifiziert, dessen Expression sowohl während der Entwicklung des ZNS als auch in malignen Gliomen hochreguliert ist (Sakurai et al., 1996). Dies könnte auf eine Beteiligung von PTP ζ an der Entstehung und/oder Progression von Glioblastomen hindeuten.

Für die Entwicklung eines geeigneten *in vitro*-Systems, an dem die Funktion von PTP ζ in Gliomzellen untersucht werden konnte, war es zunächst wichtig, den Expressionsstatus von PTP ζ in Glioblastomzelllinien zu analysieren. Von den in der vorliegenden Arbeit getesteten 12 Zelllinien exprimierten nur drei humane, nämlich die Glioblastomzelllinien U251, U373 und G112 sowie eine Rattengliomzelllinie C6 PTP ζ . Bei den Zelllinien U251, U373 und C6 war eine PTP ζ -Expression bereits zuvor bekannt (Krueger & Saito, 1992; Sakurai et al., 1996). Die Expression von PTP ζ scheint also nicht für das Überleben bzw. die Proliferation aller Glioblastomzelllinien wichtig zu sein, da einige Gliomzelllinien PTP ζ exprimieren, andere jedoch nicht. Für die Zelllinie U251 ist die Expression von PTP ζ allerdings offenbar von großer Bedeutung für die Migrations- und Proliferationsfähigkeit, wie im unteren Abschnitt erläutert wird (s. 4.6). Die einzelnen Zelllinien sind demnach in Bezug auf ihre Abhängigkeit von der PTP ζ -Expression heterogen.

Eine Blutgefäß-assoziierte Expression von PTP ζ in Tumorgewebe konnte von uns nicht detektiert werden, ebenso wenig wie eine PTP ζ -Expression in den humanen Endothelzellen HUVECs und CMECs. Auch in der Literatur wurde bislang nicht von einer Blutgefäß-assoziierten Expression von PTP ζ berichtet. Unveröffentlichten Beobachtungen zufolge wurde PTP ζ zwar in Blutgefäßen während der Reparatur nach einer Verletzung transient exprimiert gefunden, dies wurde aber bislang nicht bestätigt (Horiba et al. in: Yamakawa et al., 1999). Demnach ist anzunehmen, dass PTP ζ vermutlich für die Angiogenese in Tumoren nicht relevant ist (vgl. auch 4.3).

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse der Expressionsanalysen darauf hin, dass PTP ζ von Tumorzellen exprimiert wird und für die Entstehung sowie für die Progression von Gliomen von Bedeutung sein könnte.

4.1.2 Expression von PTN

Die bei den cDNA-Arrays beobachtete Hochregulation von Pleiotrophin in Glioblastomen wurde von uns mit Proteinnachweismethoden validiert. Western Blot-Analysen boten sich für einen zuverlässigen Nachweis auf Proteinebene an, da von Pleiotrophin im Unterschied zu PTP ζ keine Spleißvarianten exprimiert werden. In Glioblastomen wurde Pleiotrophin sehr stark exprimiert gefunden, wohingegen die Expression in Normalhirngewebe und niedriggradigen Astrozytomen zwar nachweisbar, jedoch nur schwach war. Demnach ist Pleiotrophin nicht nur in zahlreichen verschiedenen epithelialen Neoplasien überexprimiert (vgl. 1.4.2), sondern auch in malignen Gliomen.

Um zu untersuchen, ob die Lokalisation der Pleiotrophin-Expression in Glioblastomen mit der von PTP ζ überlappte, wurde wie für PTP ζ eine große Anzahl von Tumoren immunhistochemisch gefärbt. Im Unterschied zur PTP ζ -Lokalisation wurde Pleiotrophin in Normalhirn in einigen Blutgefäßen detektiert. In Tumormaterial dagegen wurden sowohl tumoreigene Blutgefäße als auch die Tumorzellen selbst stark angefärbt. Die semiquantitativ ausgewerteten Färbeintensitäten von Pleiotrophin und PTP ζ waren statistisch miteinander assoziiert - mit steigendem Malignitätsgrad trat eine intensivere Immunfärbung für beide Proteine auf. Anders als bei PTP ζ stieg jedoch schon bei den niedriggradigen Astrozytomen (WHO Grad II) die Expression von Pleiotrophin deutlich an. Dies stand scheinbar im Widerspruch zu den Western Blot-Analysen, in denen Pleiotrophin bei niedriggradigen Astrozytomen kaum nachweisbar war. Das zur Verfügung stehende Tumormaterial für Western Blot-Analysen war jedoch limitiert, so dass lediglich zwei verschiedene Astrozytome WHO Grad II auf diese Weise untersucht werden konnten. Um eine repräsentative Anzahl von Gliomen verschiedener Malignitätsgrade zu untersuchen, wurde daher zusätzlich auf weniger Tumormaterial erfordernde ELISA-Analysen ausgewichen.

Mithilfe von ELISAs war es möglich, eine große Zahl von Proben zu untersuchen und quantitative Ergebnisse zu erhalten. Hierbei zeigte sich, dass sich die Resultate aus den immunhistochemischen Färbungen in den Ergebnissen des ELISA widerspiegeln. Pleiotrophin wurde in malignen Astrozytomen im Vergleich zu Normalhirn sehr stark exprimiert, der Anstieg

der Expression konnte jedoch bereits in den niedriggradigen Astrozytomen gemessen werden. Die Tatsache, dass in der Western Blot-Analyse nur eine sehr geringe Menge an Pleiotrophin in Astrozytomen Grad II detektierbar war, die etwa dem Niveau in Normalhirn entsprach, könnte daher auf einer zufälligen Auswahl zweier Tumore mit außergewöhnlich geringer Expression von Pleiotrophin beruhen. Die Auswertung war hierbei also im Gegensatz zum ELISA, bei dem Gewebe von 17 verschiedenen Astrozytomen WHO Grad II untersucht wurde, nicht repräsentativ.

Zusammenfassend sprechen die immunhistochemischen und die ELISA-Untersuchungen dafür, dass Pleiotrophin in Gliomen verglichen mit Normalhirngewebe überexprimiert wird. Die Heraufregulation von Pleiotrophin scheint dabei bereits früher aufzutreten als die von PTP ζ , denn schon in Astrozytomen WHO Grad II finden sich relativ hohe Konzentrationen an Pleiotrophin, die denen in malignen Gliomen entsprechen und die nicht - im Gegensatz zu PTP ζ - mit zunehmender Malignität weiter ansteigen.

Da die Expression von Pleiotrophin bereits ausnahmslos sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in vielen Glioblastomzelllinien, wie A172, U112, U118, U138, U343 und U373 nachgewiesen worden war (Mentlein & Held-Feindt, 2002), beschränkten wir uns beim Nachweis von Pleiotrophin auf ein RT-PCR-Screening. Alle untersuchten Glioblastomzelllinien exprimierten Pleiotrophin (vgl. Tab. 7), wohingegen - wie bereits erwähnt - nur wenige dieser Zelllinien PTP ζ exprimierten.

Eine ähnliche Abweichung war bei den tumoreigenen Blutgefäßen bzw. den untersuchten Endothelzellen zu erkennen. Im Unterschied zu PTP ζ wurde für Pleiotrophin immunhistochemisch eine Blutgefäß-assoziierte Expression nachgewiesen. Außerdem konnte Pleiotrophin in humanen Nabelschnurendothelzellen sowie in cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen detektiert werden.

Möglicherweise sind die Funktionen von Pleiotrophin nicht nur auf den Bindungspartner PTP ζ beschränkt. Bei den Zelltypen, die sowohl Pleiotrophin als auch PTP ζ exprimieren, könnte durchaus ein autokriner Effekt vorhanden sein, indem Pleiotrophin von den Zellen sezerniert wird, auf die es über den Rezeptor PTP ζ einwirkt. Die nur partielle Übereinstimmung der Expression beider Moleküle deutet jedoch darauf hin, dass Pleiotrophin auch über andere Rezeptoren in Gliomen wirken könnte (vgl. auch 4.2). Dabei spricht die Assoziation von Pleiotrophin mit Blutgefäßen in den Tumoren z. B. für eine Beteiligung an der Angiogenese bei Gliomen.

Weder die Expression von Pleiotrophin noch von PTP ζ konnte mit den für primäre bzw. sekundäre Glioblastome spezifischen genetischen Veränderungen, z. B. der Überexpression des EGF-Rezeptors in primären Glioblastomen und den p53-Mutationen in sekundären Glioblastomen (Abb. 1) assoziiert werden. Daher ist zu vermuten, dass die Überexpression von Pleiotrophin und PTP ζ von der genetischen Entstehung primärer bzw. sekundärer Glioblastome unabhängig ist.

4.2 Die Rolle von Pleiotrophin und PTP ζ bei der Gliomzellmigration

Während der Entwicklung des zentralen Nervensystems sind Pleiotrophin und PTP ζ an der Migration von Astrozyten und neuronalen Zellen beteiligt (Maeda et al., 1995; Maeda & Noda, 1998; Kadomatsu & Muramatsu, 2004). Aufgrund dessen war zu vermuten, dass die Expression beider Moleküle in Gliomen ebenfalls an der Migration bzw. der Invasion der Gliomzellen beteiligt sein könnte. Dieser Fragestellung wurde durch chemo- und haptotaktische Migrationsassays nachgegangen. In Experimenten, die in Kollaboration mit unserer Arbeitsgruppe von Frau Dr. Dr. Sabine Müller bei der Firma AGY Therapeutics, Inc. (San Francisco) durchgeführt worden waren, konnte die Migration der PTP ζ -exprimierenden Zelllinie D566 von Pleiotrophin chemotaktisch stimuliert werden, die der PTP ζ -negativen Zelllinie G84 hingegen nicht (Müller et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Untersuchung auf eine repräsentativere Anzahl von Zelllinien ausgeweitet. Pleiotrophin konnte in den chemotaktischen Experimenten die Migration bei 6 der 9 untersuchten Zelllinien zwar stimulieren, die Effekte waren jedoch mit einer maximal zweifachen Stimulation generell sehr gering. Vergleicht man diese beispielsweise mit einer früheren Studie aus unserem Labor, in der der Wachstumsfaktor SF/HGF (Scatter factor/hepatocyte growth factor) als Migrationsstimulans untersucht worden war, so war dort eine bis zu 140-fache Stimulation der Gliomzellmigration gemessen worden, so dass Pleiotrophin vergleichsweise nur als sehr schwaches chemotaktisches Stimulans bezeichnet werden kann (Lamszus et al., 1998).

In haptotaktischen Migrationsassays dagegen konnte Pleiotrophin 8 von 9 untersuchten Glioblastomzelllinien bis zu 200-fach stimulieren. Pleiotrophin ist demnach ein starkes haptotaktisches Migrationsstimulans. Interessanterweise war bei der Stimulation der neuronalen Migration durch Pleiotrophin ein ähnlicher Wirkmechanismus festgestellt worden. Während substratgebundenes Pleiotrophin die Migration neuronaler Zellen förderte, wurde diese durch lösliches Pleiotrophin eher inhibiert (Maeda & Noda, 1998). Ebenso konnte in einem weiteren System gezeigt werden, dass immobilisiertes Midkine, ein Pleiotrophin-ähnlicher

Wachstumsfaktor, der ebenfalls an PTP ζ bindet, die Migration Osteoblasten-ähnlicher Zellen stimulierte, nicht jedoch ungebundenes lösliches Midkine (Maeda et al., 1999; Qi et al., 2001).

Übertragen auf die Situation im Hirn von Glioblastompatienten sprechen die vorliegenden Ergebnisse dafür, dass Pleiotrophin sowohl von Glioblastomzellen als auch von vaskulären Endothelzellen sezerniert wird und dann in der extrazellulären Matrix immobilisiert wird. Dabei kommt als Pleiotrophin-,„Speicher“ möglicherweise sezerniertes Phosphacan in Betracht. Denn Phosphacan ist bekanntermaßen Bestandteil der extrazellulären Matrix im adulten Hirnparenchym (Nishiwaki et al., 1998) und wird außerdem - wie durch unsere Northern Blot-Analysen gezeigt - in Glioblastomen verstärkt exprimiert. Die mit PTP ζ als Rezeptoren ausgestatteten Gliomzellen könnten so mit Phosphacan als haptotaktischem Substrat interagieren und somit zu einer gerichteten Migration veranlasst werden. Damit bestünde für dieses System ein autokriner Mechanismus („autokriner Loop“), da Pleiotrophin auf die gleichen Tumorzellen stimulatorisch einwirkt, von denen es sezerniert wird.

Zusammengefasst ist als Hauptergebnis der Migrationsstudien festzuhalten, dass die Migration von Gliomzellen - zumindest in Bezug auf Pleiotrophin - vorwiegend über haptotaktische Effekte gesteuert wird.

Die bisher erwähnten Ergebnisse zur Stimulation der Migration von Gliomzellen durch Pleiotrophin erlaubten noch keine Aussage darüber, ob die beobachteten Effekte spezifisch über eine Interaktion von Pleiotrophin und PTP ζ vermittelt wurden. Um dies zu untersuchen wurde versucht, die Interaktion der beiden Moleküle zu blockieren.

Mit einem monoklonalen Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von Ratten-PTP ζ (2B49; Maurel et al., 1994) wurde die Bindungsspezifität von PTP ζ an Pleiotrophin in einer Rattengliomzelllinie (C6) analysiert. Der Antikörper gegen PTP ζ konnte die Pleiotrophin-stimulierte haptotaktische Migration von C6-Zellen konzentrationsabhängig blockieren, nicht jedoch die Kollagen-stimulierte Migration. Demnach ließ sich die beobachtete Stimulation der Migration durch Pleiotrophin auf eine spezifische Interaktion mit PTP ζ zurückführen. Ähnliche Versuche mit einem polyklonalen Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von PTP ζ hatten gezeigt, dass PTP ζ auch bei der Stimulation der Migration neuronaler Zellen als spezifischer Rezeptor für Pleiotrophin fungiert (Maeda & Noda, 1998).

Daraufhin wurde von uns untersucht, ob sich dieser spezifische Effekt auch in humanen Gliomzellen nachweisen ließe. Da für humane PTP ζ keine geeigneten Antikörper vorlagen, wurde die Interaktion von Pleiotrophin und PTP ζ in der humanen Glioblastomzelllinie U251

durch Suppression der Expression von PTP ζ untersucht. Dies wurde mittels Transfektion eines siRNA-exprimierenden Vektors erreicht (vgl. 4.5f.). Die stabile Reduktion der Expression von PTP ζ durch RNAi führte zu einer starken Hemmung der Pleiotrophin-induzierten Migration. Dies wurde bereits in D556-Zellen durch transiente Transfektion von siRNA gezeigt (Müller et al., 2003) und konnte von uns nun in U251-Zellen durch stabile Transfektion bestätigt werden. Die Pleiotrophin-induzierte Migration wurde durch Herabregulation von PTP ζ inhibiert, und zwar um so stärker, je niedriger das Expressionsniveau von PTP ζ war (Abb. 29). Kollagen und Fibronectin als haptotaktische Kontrollsubstrate hatten dagegen auf die Migration PTP ζ vermindert exprimierender Zellen keinen Einfluss. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass nicht nur die durch Pleiotrophin vermittelte haptotaktische Migration neuronaler Zellen, sondern auch die von Gliomzellen spezifisch durch PTP ζ vermittelt werden kann.

Unerwarteterweise konnte bei 6 der 10 durch Pleiotrophin haptotaktisch stimulierbaren Zelllinien keine PTP ζ -Expression entdeckt werden. Denkbar wäre, dass die Detektionsschwellen im Western Blot bzw. in den RT-PCR- und Northern Blot-Analysen zu niedrig gewesen sein könnten, um die Expression von PTP ζ nachweisen zu können. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da alle drei Methoden übereinstimmend jeweils die gleichen Ergebnisse erbrachten. Die Abwesenheit von PTP ζ in den betreffenden Zelllinien spricht daher eher dafür, dass die Effekte auch über andere Pleiotrophin-Rezeptoren vermittelt werden könnten. Als weitere Rezeptoren von Pleiotrophin sind Syndecan-3 und die anaplastische Lymphoma-Kinase ALK bekannt (s. 1.4.5).

Pleiotrophin bindet etwa mit gleicher Affinität an Syndecan-3 wie an PTP ζ ($K_D \approx 0,5$ nM; Raulo et al., 1994). Syndecan-3 ist ein Vertreter der Proteoglykane mit Heparansulfat-Seitenketten (HSPGs), die als Rezeptoren oder Ko-Rezeptoren häufig Wachstumsfaktoren - wie z. B. Pleiotrophin und FGF-2 - binden (Chernousov & Carey, 1993). Die Bindung an diese Wachstumsfaktoren ist dabei von den Glykosaminoglykan-Seitenketten abhängig (Berndt et al., 2001). Für eine Beteiligung von Syndecan-3 bei der Migration neuronaler Zellen gibt es eine Reihe von Hinweisen: Pleiotrophin konnte beispielsweise in Neuroblastomzellen das Auswachsen von Neuriten stimulieren, nachdem die Zellen mit einer cDNA für Syndecan-3 transfiziert worden waren (Kinnunen et al., 1998). In primären Ratten-Neuronen, die *in vitro* auf einer Pleiotrophin-beschichteten Matrix wuchsen, war Syndecan-3 zudem an der Oberfläche von Neuriten und in den Wachstumskegeln lokalisiert (Raulo et al., 1994). Die Überexpression von humanem Syndecan-3 führte außerdem in verschiedenen Zelllinien zur Lokalisierung des Proteins an der Zellmembran und zur Bildung filopodien-artiger Strukturen, die mit dem Umbau des Aktin-Zytoskeletts einhergingen (Berndt et al., 2001). Interessanterweise werden Pleiotrophin

und Syndecan-3 auch gemeinsam in Osteoblasten bzw. deren Vorläuferzellen exprimiert. Pleiotrophin konnte in diesen Zellen die haptotaktische Migration stimulieren (Imai et al., 1998). Demnach könnte Syndecan-3 in Zellen, die PTP ζ nicht exprimieren, möglicherweise der Rezeptor für Pleiotrophin sein, der das migrationsstimulierende Signal auf die Zelle überträgt.

ALK ist ein weiterer potenzieller Rezeptor für Pleiotrophin in Gliomen. Pleiotrophin und ALK werden sowohl im ZNS als auch in mehreren Tumorzelllinien, wie z. B. der pankreatischen Tumorzelllinie Colo357, der Mammakarzinom-Zelllinie Hs578T und in einigen Glioblastomzelllinien gemeinsam exprimiert (Weber et al., 2000). ALK bindet hochaffin an Pleiotrophin ($K_D \approx 32$ pM), wobei die Bindung hier nicht über Heparansulfat-Seitenketten, sondern über eine für Transmembranproteine charakteristische Domäne im extrazellulär gelegenen Sequenzbereich (MAM-Domäne) vermittelt wird (Stoica et al., 2001). Denkbar wäre, dass ALK als Rezeptor-Tyrosinkinase und PTP ζ als Rezeptor-Tyrosinphosphatase Gegenspieler sind, die um die Bindung von Pleiotrophin konkurrieren. Da ALK Pleiotrophin sehr viel stärker bindet als PTP ζ ($K_D \approx 3$ nM) könnte vermutet werden, dass in Zellen mit gleichzeitiger Expression der beiden Rezeptormoleküle zunächst die Bindungsstellen von ALK abgesättigt werden und die Phosphatase erst danach durch Bindung von Pleiotrophin stimuliert wird.

Spezifische Wirkungen von ALK auf die Zellmigration in Glioblastomzelllinien sind bisher nicht bekannt. Interessant ist jedoch, dass durch Antagonisierung von ALK durch Ribozyme die Proliferation der Glioblastomzelllinie U87 *in vivo* inhibiert werden konnte. Dies führte in Mäusen zur Bildung kleinerer Tumore und durch verstärkte Apoptoserate als Folge der Phosphorylierung des Akt-Proteins zur Verlängerung der mittleren Überlebenszeit (Powers et al., 2002).

Bezüglich der durch Pleiotrophin ausgelösten Stimulation der Migration von Gliomzellen muss zusammenfassend davon ausgegangen werden, dass diese nur zum Teil spezifisch über PTP ζ vermittelt wird. In der Rattengliomzelllinie C6 sowie in der humanen Glioblastomzelllinie U251 scheinen diese Effekte spezifisch von PTP ζ abhängig zu sein, in weiteren humanen Glioblastomzelllinien sind jedoch vermutlich auch andere Rezeptoren wie ALK und/oder Syndecan-3 an der Migrationsstimulation beteiligt.

4.3 Pleiotrophin als Angiogenesefaktor in Glioblastomen

Die chemotaktische Stimulation der Migration von Endothelzellen durch lösliche Faktoren *in vitro* korreliert mit der angiogenetischen Aktivität dieser Faktoren *in vivo* (Zetter, 1987; Folkman & Klagsbrun, 1987). Da sich Pleiotrophin immunhistochemisch nicht nur assoziiert mit Tumorzellen, sondern auch mit den intratumoralen Blutgefäßen fand und sich dort auf Endothelzellen nachweisen ließ, war zu vermuten, dass Pleiotrophin in Gliomen an der Tumorangio-genese beteiligt sein könnte. Daher wurde die chemotaktische Stimulierbarkeit mikrovaskulärer Hirnendothelzellen durch Pleiotrophin *in vitro* untersucht. Chemotaktisch ließen sich die Endothelzellen genau wie die Glioblastomzellen nur schwach von Pleiotrophin stimulieren, haptotaktisch jedoch stark. Dies könnte ähnlich wie bei den Tumorzellen darauf schließen lassen, dass immobilisiertes Pleiotrophin Endothelzellen durch die extrazelluläre Matrix leiten könnte. Möglicherweise wird dieser Effekt jedoch ebenfalls nicht über PTP ζ vermittelt. Denn weder in CMECs noch in den immunhistochemisch angefärbten Tumorschnitten konnte eine endotheliale Expression von PTP ζ nachgewiesen werden. Von Horiba und Kollegen wurde allerdings beobachtet, dass nach einer Gefäßverletzung PTP ζ in Blutgefäßen exprimiert wird (Yamakawa et al., 1999). Möglicherweise unterscheiden sich diesbezüglich die Mechanismen der Tumorangio-genese und der Gefäßreparatur, wobei bei letzterer eine eventuell temporal begrenzte Hochregulation und Expression in Endothelzellen möglich sein könnte.

Der alternative Pleiotrophin-Rezeptor ALK war von uns durch RT-PCR in CMECs ebenfalls nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt), so dass es unwahrscheinlich ist, dass Pleiotrophin Hirnendothelzellen auf diese Weise stimuliert. Der oben erwähnte Rezeptor Syndecan-3 (4.2) wird interessanterweise in Gefäßen von Leberkarzinomen stark exprimiert, was einen Hinweis auf die Beteiligung von Syndecan-3 an der Tumorangio-genese geben könnte (Roskams et al., 1998). Außerdem gilt Syndecan-3 - ein Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) - als Ko-Rezeptor für den basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF-2 (Chernousov & Carey, 1993), einen Angiogenesefaktor, der auch in Gliomen exprimiert wird (Stefanik et al., 1991). FGF-2 und andere Wachstumsfaktoren werden von HSPGs als Ko-Rezeptoren mit niedriger Affinität gebunden, um von diesen einem hochaffin bindenden Rezeptor - z. B. der Protein-Tyrosinkinase FGFR-1 - präsentiert werden zu können, welcher Signalkaskaden in der Zelle aktiviert (Rapraeger et al., 1991). Denkbar wäre, dass Syndecan-3 auch als Ko-Rezeptor für Pleiotrophin dient und einem weiteren noch unbekanntem Rezeptor die Bindung von Pleiotrophin vermittelt. Über die Expression von Syndecan-3 in Glioblastomen ist bislang jedoch nichts bekannt.

Zusammenfassend ist es unwahrscheinlich, dass die haptotaktische Stimulation der Migration von Hirnendothelzellen über PTP ζ oder ALK vermittelt wird. Vorstellbar wäre, dass Syndecan-3 und/oder ein weiterer - noch nicht identifizierter - Rezeptor diese Effekte vermitteln.

4.4 Versuch einer Überexpression der langen Rezeptorform von PTP ζ in der humanen Glioblastomzelllinie G55T2

Als Modell für funktionelle Untersuchungen *in vitro* eignen sich Zellkultursysteme, die durch Transfektion der cDNA eines Gens das Zielprotein überexprimieren. Um PTP ζ *in vitro* zu überexprimieren, wurde ein Vektor mit der Sequenz der langen Spleißvariante PTP ζ -A in die humane Glioblastomzelllinie G55T2 transfiziert. Von 22 untersuchten stabil transfizierten Klonpopulationen exprimierte jedoch keiner ausschließlich die erwartete lange Form PTP ζ -A. Vielmehr zeigten fast alle Zellklone im Northern Blot drei RNA-Banden, die den Banden der Spleißvarianten PTP ζ -A, Phosphacan und PTP ζ -B in vergleichbaren Zelllinien verblüffend ähnlich waren.

Bei Transfektion mit einem einzigen Vektor erwartet man auch im Northern Blot eine einzige Bande. Dass es sich bei dem präparierten Plasmid um ein Gemisch aus Vektoren gehandelt haben könnte, schloss ein mehrfach wiederholter Restriktionsverdau aus (Daten nicht gezeigt). Die frappierende Ähnlichkeit der dreibandigen Muster mit dem Muster der drei Spleißvarianten, ließ die Vermutung aufkommen, dass durch den Transfektions- und/oder Integrationsvorgang des Plasmids in die genomische DNA eine Art „triggering“ aufgetreten war, was dazu führte, dass bisher nicht exprimierte Sequenzen wieder transkribiert wurden.

Nach dieser „triggering“-Theorie könnte sogar vermutet werden, dass eine neue Spleißvariante nachgewiesen worden war. Denn ein Klon (Abb. 17; K2) zeigte ein vierbandiges mRNA-Muster, dessen bei 11-12 kb laufende Bande eine größere Spleißvariante als die bisher beschriebenen repräsentieren könnte. Neue Spleißvarianten von PTP ζ , die größer als die lange Form PTP ζ -A sind, wurden allerdings noch nicht beschrieben. Da jedoch vor kurzem erst eine neue Spleißvariante (PSI; vgl. Abb. 3) beschrieben wurde, ist es nicht ausgeschlossen, dass es weitere Spleißvarianten gibt, die bisher noch nicht entdeckt wurden.

Im Western Blot konnte infolge der Transfektion - im Gegensatz zum Northern Blot - keine Form von PTP ζ detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Da es sich bei PTP ζ um ein stark posttranslational modifiziertes Protein handelt, das durch die vielen Chondroitinsulfat-Seitenketten eine enorme Größe erreicht, ist es der transfizierten Zelle vielleicht nicht möglich,

eine solche Modifikationsleistung zu erbringen und das Protein in dieser Größe an die Zelloberfläche zu transportieren bzw. korrekt zu falten.

Von anderen Arbeitsgruppen wurde berichtet, dass es bereits gelungen war, die kurze Rezeptorform von PTP ζ -B in Zellen stabil zu überexprimieren, z. B. in der neuronalen Zelllinie PC12D (Shintani et al., 2001). Die Funktion der Zellen - in diesem Falle das NGF-induzierte Auswachsen von Neuriten - wurde durch diese Überexpression allerdings nicht beeinflusst. Die Expression der humanen Sequenz der langen Form von PTP ζ ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. In neuronalen Ratten-L-Zellen konnte die Ratten-Sequenz von PTP ζ -A erfolgreich stabil exprimiert werden, um posttranslationale Modifikationen und die intrazelluläre Lokalisation des Proteins zu untersuchen. Allerdings wurden außer dem 380 kDa großen Kernprotein große Mengen eines 125-150 kDa großen Proteins, vermutlich einer unreifen oder falsch prozessierten kürzeren PTP ζ -Variante nachgewiesen (Nishiwaki et al., 1998). Die extreme Größe der Sequenz ist wahrscheinlich für die Probleme bei der stabilen Transfektion und Expression verantwortlich. Die hier diskutierten Ergebnisse führten dazu, dass anstelle des *in vitro*-Systems für die Hochregulation von PTP ζ in Glioblastomen ein Modell für die Unterdrückung der PTP ζ -Expression in Glioblastomzellen etabliert wurde. Dieses durch RNA-Interferenz vermittelte Modell wurde für Analysen in funktionellen Assays herangezogen (s. 4.5f.).

4.5 Knockdown des RNA-Transkripts von PTP ζ durch RNA-Interferenz

Sowohl durch transiente Transfektion mit siRNA als auch durch stabile Expression von siRNA durch einen Vektor konnte eine starke Herabregulation der PTP ζ -Expression in U251-Gliomzellen erzielt werden.

Bei der direkten Transfektion der kleinen empfindlichen siRNA-Duplexe war der Transfektionserfolg stark vom verwendeten Transfektionsreagenz abhängig. Es scheint, dass speziell für die Transfektion von siRNA entwickelte Reagenzien hinsichtlich der Transfektionseffizienz und damit des gewünschten Effekts des Gen-Knockdowns einen erheblichen Vorteil gegenüber sonst für Plasmidtransfektionen verwendeten Reagenzien haben. Welche physiologischen Auswirkungen aber solche siRNA-Transfektionsreagenzien auf Zellen haben können, wurde in den Versuchen mit migrierenden Zellen deutlich.

Das speziell für siRNA geeignete Reagenz TKO (Mirus, Göttingen) lagerte sich trotz nachgewiesener exzellenter Transfektionseffizienz an die Zellmembran an. Im Migrationsassay wirkte sich das so aus, dass Zellen, die mit dem Transfektionsreagenz - mit oder ohne siRNA - inkubiert wurden, im Vergleich zu nicht behandelten Zellen nicht oder viel weniger migrieren

konnten. Vermutlich schränkte das an der Zellmembran haftende Reagenz entweder die Beweglichkeit der Zellen ein oder interferierte mit deren Adhäsion an die zur Beschichtung des Filters verwendeten Substrate wie Pleiotrophin oder Kollagen.

Dennoch war die transiente Transfektion als erstes Screening gut geeignet, um herauszufinden, welche RNA-Abschnitte sich prinzipiell als Zielsequenzen für die siRNAs eigneten.

Um die unerwünschten Effekte der siRNA-Transfektionsreagenzien auszuschalten, wurde ein alternativer Weg über stabil in den Zellen exprimierte siRNA gewählt, der sich als erfolgreich erwies. Der stabile Knockdown von PTP ζ in U251-Glioblastomzellen gelang problemlos und war hocheffizient, so dass mit diesen Zellen funktionelle *in vitro*- und *in vivo*-Assays auch über einen langen Zeitraum durchgeführt werden konnten.

4.6 PTP ζ und Gliomzellproliferation

Da unkontrollierte Proliferation ein Merkmal von Tumorzellen ist, wurde *in vitro* und *in vivo* eine mögliche Beteiligung von PTP ζ an der Zellproliferation untersucht.

Mit U251-Glioblastomzellen, die durch stabile Transfektion des oben erwähnten siRNA-Vektors wenig bzw. kaum PTP ζ exprimierten, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Dabei zeigten Zellen mit stark reduzierter Expression von PTP ζ - verglichen mit Kontroll-transfizierten Zellen und U251-Wildtypzellen - eine stark verminderte Proliferation. Darüber hinaus wurde das Gliomwachstum PTP ζ reduzierter Zellen *in vivo* untersucht. Hierbei war das Tumorstadium der siRNA-transfizierten Klone vollständig gehemmt, während bei Kontrolltumoren schließlich ein exponentieller Wachstumsanstieg verzeichnet wurde. Außerdem war die durch einen Marker (Ki-67 Antigen) bestimmte proliferative Aktivität im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant bis zu 75% inhibiert.

Die Verminderung der Tumorzellproliferation bei Herabregulation von PTP ζ ist möglicherweise auf den Phosphorylierungsstatus bestimmter intrazellulärer Substrate - wie z. B. β -Catenin - zurückzuführen (vgl. 1.5.2.3). In der humanen Glioblastomzelllinie U373 konnte β -Catenin als direktes Substrat von PTP ζ identifiziert werden. Von der konstitutiv aktiven Phosphatase wird β -Catenin dephosphoryliert, bis PTP ζ durch Bindung des Liganden Pleiotrophin dimerisiert und inaktiviert wird, und somit der Gehalt an phosphoryliertem β -Catenin ansteigt (Meng et al., 2000).

Eine Beteiligung von aktiviertem β -Catenin bei der Zellproliferation konnte in mehreren Zelltypen nachgewiesen werden. In epithelialen Zellen beispielsweise hat die Expression von β -

Catenin die Translokation des Moleküls in den Nukleus zur Folge, wo es durch Bindung an den Transkriptionsfaktor TCF/Lef die Expression von c-Myc und CyclinD1 fördert. Diesen Proteinen kommt eine zentrale Funktion bei der Regulation der Proliferation zu (Sellin et al., 2001). In humanen Glioblastomen wurde die Expression von β -Catenin mit der Proliferation der tumoreigenen Endothelzellen in Verbindung gebracht (Yano et al., 2000). Und auch bei der Entwicklung des Rückenmarks wurden durch die Expression von β -Catenin neurale Progenitorzellen in einem proliferativen Zustand gehalten, anstelle sich neuronal zu differenzieren (Zechner et al., 2003).

Es ist also denkbar, dass β -Catenin in Glioblastomzellen den durch die Expression von PTP ζ beobachteten Effekt auf die Proliferation vermittelt. Pleiotrophin ist als Ligand von PTP ζ sowohl in humanen Glioblastomen als auch in Glioblastomzelllinien vorhanden und könnte die Liganden-induzierte Inaktivierung von PTP ζ - ähnlich wie bei der Migration postuliert - autokrin regulieren.

4.7 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen werfen eine Reihe von Fragen auf, andererseits eröffnen sie bereits jetzt potenzielle therapeutische Perspektiven.

Eine Hauptfrage, die sich unmittelbar aus den Ergebnissen der dargestellten Experimente ergibt, ist die mögliche Beteiligung anderer Rezeptoren als PTP ζ an der Vermittlung der Effekte von Pleiotrophin auf Gliomzellen. Denn obwohl Pleiotrophin auf alle untersuchten Glioblastomzelllinien haptotaktisch wirkt, wird PTP ζ nur von einem Teil dieser Zelllinien exprimiert. Zu klären sind hier insbesondere eine Beteiligung von Syndecan-3 als (Ko-) Rezeptor sowie von ALK als Rezeptor. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass weitere, bislang noch nicht identifizierte Rezeptoren auf den Gliomzellen Pleiotrophin binden könnten.

Eine weitere wichtige Frage ist, welche Signalwege an der Vermittlung der Effekte von PTP ζ beteiligt sind. Es wurden bislang nur wenige direkte Substrate für PTP ζ identifiziert, darunter β -Catenin, Git1/Cat-1 und PSD-95/SAP90 (vgl. 1.5.2 und 4.6). Die Beteiligung dieser Signalmoleküle lässt auf eine Rolle von PTP ζ bei der Zellmigration und Proliferation schließen. Allerdings scheinen diese Moleküle unter Umständen nicht die Hauptsubstrate von PTP ζ zu sein, denn im Anschluss an erste Publikationen lassen sich jeweils keine weiteren konfirmatorischen Forschungsergebnisse zu den betreffenden Interaktionsmechanismen in der Literatur finden.

Unabhängig von den genannten zu klärenden Fragen eröffnen sich bereits auf der Basis des gegenwärtigen Erkenntnisstandes potenzielle therapeutische Möglichkeiten. Sowohl PTP ζ als auch Pleiotrophin eignen sich prinzipiell als Angriffspunkte für die Behandlung von Astrozytomen, da beide in Tumoren sehr hoch, in Normalhirn jedoch kaum exprimiert werden. PTP ζ wird von AGY Therapeutics Inc. (San Francisco) intensiv als mögliches Zielgen für die Entwicklung therapeutischer Substanzen zur Behandlung in Gliomen untersucht. Ein Ziel ist die Herstellung humanisierter Antikörper und kleiner bzw. niedermolekularer Substanzen (small molecules), die die Funktion von PTP ζ spezifisch blockieren sollen. Des Weiteren könnte die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Expressionsunterdrückung von PTP ζ in humanen Glioblastomzelllinien als Grundlage für einen therapeutischen Ansatz mithilfe der RNA-Interferenz-Technologie dienen. Die intratumorale Injektion von siRNA-exprimierenden Vektoren beispielsweise, durch welche die Expression extrazellulärer Proteinase gehemmt wird, wurde in einem intrakraniellen Gliommodell in Mäusen bereits mit Erfolg durchgeführt (Lakka et al., 2004).

Die Antagonisierung von Pleiotrophin zur Inhibierung des Tumorwachstums wird bereits von mehreren Arbeitsgruppen erfolgreich angewandt. Das *in vitro*-Wachstum von Glioblastomzelllinien konnte durch eine Ribozym-reduzierte Expression von Pleiotrophin signifikant verringert werden (Aigner et al., 2002). In einem gentherapeutischen Ansatz für Melanome konnten sogar systemisch applizierte Ribozyme gegen Pleiotrophin mit Erfolg eingesetzt werden (Malerczyk et al., 2005). Vielversprechend sind außerdem Studien, in denen mithilfe von Ribozymen die Expression des Pleiotrophin-Rezeptors ALK in der Glioblastomzelllinie U87 reduziert werden konnte. Dabei zeigte sich, dass das Tumorwachstum ALK reduziert exprimierender U87-Zellen *in vivo* signifikant gehemmt und dadurch die mittlere Überlebenszeit deutlich verlängert war (Powers et al., 2002).

5 Zusammenfassung

Astrozytome sind hirneigene Tumore, die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) nach aufsteigendem Malignitätsgrad eingeteilt werden (Grad I-IV). Das Glioblastom (WHO Grad IV) gehört mit seinem stark infiltrierenden Wachstum und seiner schnellen Rezidivbildung zu den Hirntumoren mit der schlechtesten Überlebensprognose. Die Aufklärung der molekularen Grundlagen dieser Tumorentstehung kann zu möglichen Therapieansätzen beitragen.

In humanen Glioblastomen wurden durch cDNA-Array-Analysen die Gene für die Rezeptorartige Protein-Tyrosinphosphatase β (RPTP β)/Protein-Tyrosinphosphatase ζ (PTP ζ) und deren Liganden Pleiotrophin (PTN) stark überexprimiert gefunden. Beide Moleküle werden in der Entwicklungsphase des zentralen Nervensystems - vor allem bei der Zellmigration - benötigt und sind in embryonalen Zellen hochreguliert. In adulten Zellen geht die Expression dagegen auf ein niedriges bis nicht nachweisbares Niveau zurück. Die in den cDNA-Arrays beobachtete Hochregulation in Tumorzellen lässt darauf schließen, dass PTP ζ und Pleiotrophin eine Rolle bei der Entstehung und/oder Progression von Hirntumoren spielen könnten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von PTP ζ und Pleiotrophin in Astrozytomen verschiedener Malignitätsgrade zu untersuchen, sowie den Einfluss beider Faktoren auf die Gliomzellmigration und -proliferation zu charakterisieren. Im ersten Teil der Arbeit wurde die durch cDNA-Arrays nachgewiesene Hochregulation von PTP ζ auf mRNA-Ebene validiert. PTP ζ ist eine transmembranäre Protein-Tyrosinphosphatase und tritt in drei Haupt-Spleißvarianten auf: einer langen Form PTP ζ -A, einer kurzen Form PTP ζ -B und einer löslichen Form, die Phosphacan genannt wird. In humanen Glioblastomen - nicht jedoch in Normalhirn und niedriggradigen Astrozytomen (WHO Grad II) - waren alle drei Varianten hochreguliert. Am stärksten wurde die kurze Rezeptorform PTP ζ -B überexprimiert, was sich auf Proteinebene bestätigte. Die Expression von PTP ζ beschränkte sich auf die Tumorzellen, in hirneigenen Blutgefäßen wurde PTP ζ dagegen nicht exprimiert. Außerdem konnte die Expression von PTP ζ in drei von zwölf untersuchten humanen Glioblastomzelllinien sowie in einer Rattengliomzelllinie nachgewiesen werden. Pleiotrophin dagegen wurde in allen untersuchten Glioblastomzelllinien sowie auch in kultivierten cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (CMECs) stark exprimiert. Die Hochregulation von Pleiotrophin erfolgte im Gegensatz zu PTP ζ bereits bei niedrigmalignen astrozytären Tumoren (WHO Grad II). Zusätzlich wurde Pleiotrophin in tumoreigenen Blutgefäßen *in situ* exprimiert gefunden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Funktionen von PTP ζ und Pleiotrophin bei der Gliomzellmigration und -proliferation untersucht. Die Migration von Glioblastomzellen konnte chemotaktisch nur schwach, haptotaktisch dagegen stark von Pleiotrophin stimuliert werden. Ein spezifischer Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von PTP ζ hemmte konzentrationsabhängig die Pleiotrophin-induzierte haptotaktische Migration von Rattengliomzellen. Durch RNA-Interferenz konnte in einer humanen Gliomzelllinie die Expression von PTP ζ sowohl transient als auch stabil so stark herab reguliert werden, dass auf RNA- und Proteinebene eine fast vollständige Reduktion der PTP ζ -Expression nachgewiesen werden konnte. Die Pleiotrophin-induzierte haptotaktische Migration von PTP ζ reduziert exprimierenden Zellen war infolgedessen ebenfalls stark inhibiert. Daraus wurde geschlossen, dass die spezifische Interaktion von Pleiotrophin und PTP ζ an der Migration von Gliomzellen beteiligt ist. Möglicherweise wird die Stimulation zur Migration durch eine autokrine Schleife reguliert. Außerdem wurde die Proliferation von Glioblastomzellen mit unterdrückter PTP ζ -Expression sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Die PTP ζ reduziert exprimierende U251-Glioblastomzelllinie war sowohl in ihrer Proliferation *in vitro* als auch in ihrem Wachstum als subkutaner Tumor in Nacktmäusen fast vollständig inhibiert. Demnach kommt PTP ζ offenbar auch eine Rolle bei der Gliomzellproliferation zu.

Die dargestellten Ergebnisse sprechen dafür, dass sowohl PTP ζ als auch Pleiotrophin für die Entstehung und/oder Progression von Gliomen eine wichtige Rolle spielen könnten. Da beide Moleküle in malignen Gliomen hoch exprimiert werden, in normalem Hirngewebe dagegen kaum, erscheint eine Inhibierung der Expression und Funktion von PTP ζ sowie von Pleiotrophin potenziell therapeutisch vielversprechend.

6 Literatur

- Adamsky K., Schilling J., Garwood J., Faissner A. and Peles E. (2001) Glial tumor cell adhesion is mediated by binding of the FNIII domain of receptor protein tyrosine phosphatase β (RPTP β) to tenascin C. *Oncogene* **20**, 609-618.
- Adamsky K., Arnold K., Sabanay H. and Peles E. (2003) Junctional protein MAGI-3 interacts with receptor tyrosine phosphatase β (RPTP β) and tyrosine-phosphorylated proteins. *J. Cell Sci.* **116**, 1279-1289.
- Aigner A., Fischer D., Merdan T., Brus C., Kissel T. and Czubayko F. (2002) Delivery of unmodified bioactive ribozymes by an RNA-stabilizing polyethylenimine (LMW-PEI) efficiently down-regulates gene expression. *Gene Ther.* **9**, 1700-1707.
- Akbasak A., Toevs C.C. and Laske D.W. (1996) Reconstituted basement membrane (matrigel) enhances the growth of human glioma cell lines in nude mice. *J. Neurooncol.* **27**, 23-30.
- Ariyama T., Hasegawa K., Inazawa J., Mizuno K., Ogimoto M., Katagiri T. and Yakura H. (1995) Assignment of the human protein tyrosine phosphatase, receptor-type, zeta (PTPRZ) gene to chromosome band 7q31.3. *Cytogenet. Cell Genet.* **70**, 52-54.
- Barnea G., Silvennoinen O., Shaanan B., Honegger A.M., Canoll P.D., D'Eustachio P., Morse B., Levy J.B., Laforgia S., Huebner K., Musacchio J.M., Sap J. and Schlessinger J. (1993) Identification of a Carbonic Anhydrase-Like Domain in the Extracellular Region of RPTP γ Defines a New Subfamily of Receptor Tyrosine Phosphatases. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1497-1506.
- Barnea G., Grumet M., Milev P., Silvennoinen O., Levy J.B., Sap J. and Schlessinger J. (1994) Receptor Tyrosine Phosphatase β Is Expressed in the Form of Proteoglycan and Binds to the Extracellular Matrix Protein Tenascin. *J. Biol. Chem.* **469**, 14349-14352.
- Berndt C., Casaroli-Marano R.P., Vilaro S. and Reina M. (2001) Cloning and characterization of human syndecan-3. *J. Cell Biochem.* **82**, 246-259.
- Biernat W., Kleihues P., Yonekawa Y. and Ohgaki H. (1997a) Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**, 180-185.
- Biernat W., Tohma Y., Yonekawa Y., Kleihues P. and Ohgaki H. (1997b) Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* **94**, 303-309.
- Bigner D.D., Brown M.T., Friedman A.H., Coleman R.E., Akabani G., Friedman H.S., Thorstad W.L., McLendon R.E., Bigner S.H., Zhao X.G., Pegram C.N., Wikstrand C.J., Herndon J.E. 2nd, Vick N.A., Paleologos N., Cokgor I., Provenzale J.M. and Zalutsky M.R. (1998) Iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 treatment of patients with recurrent malignant gliomas: phase I trial results. *J. Clin. Oncol.* **16**, 2202-2212.
- Bock O. and Mrowietz U. (2001) Development of a new method of analysing chemotactic deactivation of human neutrophil granulocytes. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **48**, 257-268
- Brady-Kalnay S.M. and Tonks N.K. (1995) Protein tyrosine phosphatases as adhesion receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 650-657.

- Brummelkamp T.R., Bernards R. and Agami R. (2002) A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* **296**, 550-553.
- Camp R., Bacon K., Fincham N., Mistry K., Ross J., Lawlor F., Quinn D. and Gearing A. (1991) Chemotactic cytokines in inflammatory skin disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **305**, 109-118.
- Canoll P.D., Petanceska S., Schlessinger J. and Musacchio J.M. (1996) Three Forms of RPTP- β Are Differentially Expressed During Gliogenesis in the Developing Rat Brain and During Glial Cell Differentiation in Culture. *J. Neurosci. Res.* **44**, 199-215.
- Chauhan A.K., Li Y.S. and Deuel T.F. (1993) Pleiotrophin transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 679-682.
- Chernousov M.A. and Carey D.J. (1993) N-syndecan (Syndecan 3) from Neonatal Rat Brain Binds Basic Fibroblast Growth Factor. *J. Biol. Chem.* **268**, 16810-16814.
- Choudhuri R., Zhang H.T., Donnini S., Ziche M. and Bicknell R. (1997) An Angiogenic Role for the Neurokines Midkine and Pleiotrophin in Tumorigenesis. *Cancer Res.* **57**, 1814-1819.
- Claesson-Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 32023-32026.
- Collis S.J., Swartz M.J., Nelson W.G. and DeWeese T.L. (2003) Enhanced Radiation and Chemotherapy-mediated Cell Killing of Human Cancer Cells by Small Inhibitory RNA Silencing of DNA Repair Factors. *Cancer Res.* **63**, 1550-1554.
- Coussens L.M. and Werb Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-867.
- Czubayko F., Riegel T. and Wellstein A. (1994) Ribozyme targeting elucidates a direct role of pleiotrophin in tumor growth. *J. Biol. Chem.* **269**, 21358-21363.
- Czubayko F., Schulte A.M., Berchem G.J. and Wellstein A. (1996) Melanoma angiogenesis and metastasis modulated by ribozyme targeting of the secreted growth factor pleiotrophin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **33**, 14753-14758.
- von Deimling A., Nagel J., Bender B., Lenartz D., Schramm J., Louis D.N., Wiestler O.D. (1994) Deletion mapping of chromosome 19 in human gliomas. *Int. J. Cancer.* **57**, 676-680.
- Delbei J., Vacherot F., Laaroubi K., Barritault D. and Courty J. (1995) Effect of heparin on bovine epithelial lens cells proliferation induced by heparin afffin regulatory peptide. *J. Cell Physiol.* **164**, 47-54.
- Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D. and Siebert P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6025-6030.
- Elbashir S.M., Lendeckel W. and Tuschl T. (2001a) RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**, 188-200.

- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. and Tuschl T. (2001b) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- Fackelmayer F.O., Dahm K., Renz A., Rampsberger U. and Richter A. (1994) Nucleic acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear matrix protein which binds DNA and RNA *in vivo* and *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* **221**, 749-757.
- Fang W., Hartmann N., Chow D.T., Riegel A.T. and Wellstein A. (1992) Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial cells and is expressed in human cancer. *J. Biol. Chem.* **262**, 25889-25897.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E. and Mello C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Folkman J. and Klagsbrun M. (1987) Angiogenic factors. *Science* **235**, 442-447.
- Folkman J. and Shing Y. (1992) Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 10931-10934.
- Garwood J., Schnädelbach O., Clement A., Schütte K., Bach A. and Faissner A. (1999) DSD-1-Proteoglycan Is the Mouse Homolog of Phosphacan and Displays Opposing Effects on Neurite Outgrowth Dependent on Neuronal Lineage. *J. Neurosci.* **19**, 3888-3899.
- Garwood J., Heck N., Reichardt F. and Faissner A. (2003) Phosphacan Short Isoform, a Novel Non-proteoglycan Variant of Phosphacan/Receptor Protein Tyrosine Phosphatase- β , Interacts with Neuronal Receptors and Promotes Neurite Outgrowth. *J. Biol. Chem.* **278**, 24164-24173.
- Gary S.C., Zerillo C.A., Chiang V.L., Gaw J.U., Gray G. and Hockfield S. (2000) cDNA cloning, chromosomal localization, and expression analysis of human BEHAB/brevican, a brain specific proteoglycan regulated during cortical development and in glioma. *Gene* **256**, 139-147.
- Goldmann T., Otto F. and Vollmer E. (2000) A receptor-type protein tyrosine phosphatase PTP ζ is expressed in human cutaneous melanomas. *Folia Histochem. Cytobiol.* **38**, 19-20.
- Grumet M., Flaccus A. and Margolis R.U. (1993) Functional Characterization of Chondroitin Sulfate Proteoglycans of Brain: Interactions with Neurons and Neural Cell Adhesion Molecules. *J. Cell. Biol.* **120**, 815-824.
- Grumet M., Milev P., Sakurai T., Karthikeyan L., Bourdon M., Margolis R.K. and Margolis R.U. (1994) Interactions with Tenascin and Differential Effects on Cell Adhesion of Neurocan and Phosphacan, Two Major Chondroitin Sulfate Proteoglycans of Nervous Tissue. *J. Biol. Chem.* **269**, 12142-12146.
- Hampton B.S., Marshak D.R. and Burgess W.H. (1992) Structural and functional characterization of full-length heparin-binding growth associated molecule. *Mol. Biol. Cell* **3**, 85-93.
- Harroch S., Palmeri M., Rosenbluth J., Custer A., Okigaki M., Shrager P., Blum M., Buxbaum J.D. and Schlessinger J. (2000) No Obvious Abnormality in Mice Deficient in Receptor Protein Tyrosine Phosphatase β . *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7706-7715.

- Harroch S., Furtado G.C., Brueck W., Rosenbluth J., Lafaille J., Chao M., Buxbaum J.D. and Schlessinger J. (2002) A critical role for the protein tyrosine phosphatase receptor type Z in functional recovery from demyelinating lesions. *Nat. Genet.* **32**, 411-414.
- Hermanson M., Funa K., Koopmann J., Maintz D., Waha A., Westermark B., Heldin C.H., Wiestler O.D., Louis D.N., von Deimling A. and Nister M. (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**, 164-171.
- Hoch R.V. and Soriano P. (2003) Roles of PDGF in animal development. *Development* **130**, 4769-4784.
- Imai S., Kaksonen M., Raulo E., Kinnunen T., Fages C., Meng X., Lakso M. and Rauvala H. (1998) Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J. Cell Biol.* **143**, 1113-1128.
- Kadomatsu K. and Muramatsu T. (2004) Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett.* **204**, 127-143.
- Katoh-Semba R. and Oohira A. (1993) Core Proteins of Soluble Chondroitin Sulfate Proteoglycans Purified From the rat Brain Block the Cell Cycle of PC12D Cells. *J. Cell. Physiol.* **156**, 17-23.
- Kawachi H., Tamura H., Watakabe I., Shintani T., Maeda N. and Noda M. (1999) Protein tyrosine phosphatase ζ /RPTP β interacts with PSD-95/SAP90 family. *Mol. Brain Res.* **72**, 47-54.
- Kawachi H., Fujikawa A., Maeda N. and Noda M. (2001) Identification of GIT1/Cat-1 as a substrate molecule of protein tyrosine phosphatase ζ/β by the yeast substrate-trapping system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6593-6598.
- Kikuchi A. (2003) Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci.* **94**, 225-229.
- Kim M., Jiang L.H., Wilson H.L., North R.A. and Surprenant A. (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X₇ receptor signalling complex. *EMBO J.* **20**, 6347-6358.
- Kinnunen T., Raulo E., Nolo R., Maccarana M., Lindahl U. and Rauvala H. (1996) Neurite outgrowth in brain neurons induced by heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) depends on the specific interaction of HB-GAM with heparin sulfate at the cell surface. *J. Biol. Chem.* **271**, 2243-2238.
- Kinnunen T., Kaksonen M., Saarinen J., Kalkkinen N., Peng H.B. and Rauvala H. (1998) Cortactin-Src Kinase Signaling Pathway Is Involved in N-syndecan-dependent Neurite Outgrowth. *J. Biol. Chem.* **273**, 10702-10708.
- Kipp, M., Gohring, F., Ostendorp, T., van Drunen, C.M., van Driel, R., Przybylski, M. and Fackelmayer, F.O. (2000) SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA. *Mol. Cell Biol.* **20**, 7480-7489.
- Kleihues P. and Cavenee W.K. (2000) World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. IARC Press, Lyon.

- Kleihues P. and Ohgaki H. (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-Oncol.* **1**, 44-51.
- Koolman J. and Röhm K.H. (1998) Tumore. in: Taschenatlas der Biochemie, *Georg Thieme Verlag Stuttgart*, 2nd ed., 378f.
- Krueger N.X., Streuli M. and Saito H. (1990) Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *EMBO J.* **9**, 3241-3252.
- Krueger N.X. and Saito H. (1992) A human transmembrane protein-tyrosine-phosphatase, PTP ζ , is expressed in brain and has an N-terminal receptor domain homologous to carbonic anhydrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7417-7421.
- Kuo M.D., Oda Y., Huang J.S. and Huang S.S. (1990) Amino acid sequence and characterization of a heparin-binding neurite-promoting factor (p18) from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **265**, 18749-18752.
- Kuo M.D., Huang S.S. and Huang J.S. (1992) Characterization of heparin-binding growth-associated factor receptor on NIH 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 188-194.
- Laaroubi K., Delbe J., Vacherot F., Desgranges P., Tardieu M., Jaye M., Barritault D. and Courty J. (1994) Mitogenic and *in vitro* angiogenic activity of human recombinant heparin affinity regulatory peptide. *Growth Factors* **10**, 89-98.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lakka S.S., Gondi C.S., Yanamandra N., Olivero W.C., Dinh D.H., Gujrati M. and Rao J.S. (2004) Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* **23**, 4681-4689.
- Lamszus K., Schmidt N.O., Jin L., Laterra J., Zagzag D., Way D., Witte M., Weinand M., Goldberg I.D., Westphal M. and Rosen E.M. (1998) Scatter factor promotes motility of human glioma and neuromicrovascular endothelial cells. *Int. J. Cancer* **75**, 19-28.
- Lamszus K., Schmidt N.O., Ergün S. and Westphal M. (1999) Isolation and culture of human neuromicrovascular endothelial cells for the study of angiogenesis *in vitro*. *J. Neurosci. Res.* **55**, 370-381.
- Levy J.B., Canoll P.D., Silvennoinen O., Barnea G., Morse B., Honegger A.M., Huang J.T., Cannizzaro L.A., Park S.H., Druck T., Huebner K., Sap J., Ehrlich M., Musacchio J.M. and Schlessinger J. (1993) The Cloning of a Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatase Expressed in the Central Nervous System. *J. Biol. Chem.* **268**, 10573-10581.
- Li Y.S., Milner P.G., Chauhan A.K., Watson M.A., Hoffman R.M., Kodner C.M., Milbrandt J. and Deuel T.F. (1990) Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science* **250**, 1690-1694.
- Li Y.S., Hoffman R.M., Le Beau M.M., Espinosa 3rd R., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Copeland N.G. and Deuel T.F. (1992a) Characterization of the human pleiotrophin gene. Promoter region and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* **267**, 26011-26016.

- Li Y.S., Gurrieri M. and Deuel T.F. (1992b) Pleiotrophin gene expression is highly restricted and is regulated by platelet-derived growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 427-432.
- Libermann T.A., Nusbaum H.R., Razon N., Kris R., Lax I., Soreq H., Whittle N., Waterfield M.D., Ullrich A. and Schlessinger J. (1985) Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* **313**, 144-147.
- Maeda N., Hamanaka H., Shintani T., Nishiwaki T. and Noda M. (1994) Multiple receptor-like protein tyrosine phosphatases in the form of chondroitin sulfate proteoglycan. *FEBS Lett.* **354**, 67-70.
- Maeda N., Hamanaka H., Oohira A. and Noda M. (1995) Purification, characterization and developmental expression of a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, 6B4 proteoglycan/phosphacan. *Neurosci.* **67**, 23-35.
- Maeda N., Nishiwaki T., Shintani T., Hamanaka H. and Noda M. (1996) 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase RPTP β / ζ binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J. Biol. Chem.* **272**, 21446-21452.
- Maeda N. and Noda M. (1998) Involvement of Receptor-like Protein Tyrosine Phosphatase ζ /RPTP β and Its Ligand Pleiotrophin/Heparin-binding Growth-associated Molecule (HB-GAM) in Neuronal Migration. *J. Cell Biol.* **142**, 203-216.
- Maeda N., Ichihara-Tanaka K., Kimura T., Kadomatsu K., Muramatsu T. and Noda M. (1999) A Receptor-like protein-tyrosine Phosphatase PTP ζ /RPTP β Binds a Heparin-binding Growth Factor Midkine. *J. Biol. Chem.* **274**, 12474-12479.
- Maeda N., He J., Yajima Y., Mikami T., Sugahara K. and Yabe T. (2003) Heterogeneity of the Chondroitin Sulfate Portion of Phosphacan/6B4 Proteoglycan Regulates Its Binding Affinity for Pleiotrophin/Heparin Binding Growth-associated Molecule. *J. Biol. Chem.* **278**, 35805-35811.
- Maehama T. and Dixon J.E. (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 13375-13378.
- Malerczyk C., Schulte A.M., Czubayko F., Bellon L., Macejak D., Riegel A.T. and Wellstein A. (2005) Ribozyme targeting of the growth factor pleiotrophin in established tumors: a gene therapy approach. *Gene Therapy* **12**, 339-346.
- Manabe R., Kovalenko M., Webb D.J. and Horwitz A.R. (2002) GIT1 functions in a motile, multi-molecular signaling complex that regulates protrusive activity and cell migration. *J. Cell Sci.* **115**, 1497-1510.
- Maurel P., Rauch U., Flad M., Margolis R.K. and Margolis R.U. (1994) Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2512-2516.

- Meng K., Rodriguez-Pena A., Dimitrov T., Chen W., Yamin M., Noda M. and Deuel T.F. (2000) Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of β -catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase β/ζ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2603-2608.
- Menon P.M., Gutierrez J.A. and Rempel S.A. (2000) A study of SPARC and vitronectin localization and expression in pediatric and adult gliomas: high SPARC secretion correlates with decreased migration on vitronectin. *Int. J. Oncol.* **17**, 683-893.
- Mentlein R. and Held-Feindt J. (2002) Pleiotrophin, an angiogenic and mitogenic growth factor, is expressed in human gliomas. *J. Neurochem.* **83**, 747-753.
- Mentlein R. and Held-Feindt J. (2003) Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumour therapy? *Naturwissenschaften* **90**, 385-394.
- Milev P., Friedlander D.R., Sakurai T., Karthikeyan L., Flad M., Margolis R.K. Grumet M. and Margolis R.U. (1994) Interactions of the Chondroitin Sulfate Proteoglycan Phosphacan, the Extracellular Domain of a Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatase, with Neurons, Glia, and Neural Cell Adhesion Molecules. *J. Cell Biol.* **127**, 1703-1715.
- Milev P., Meyer-Puttlitz B., Margolis R.K. and Margolis R.U. (1995) Complex-type Asparagine-linked Oligosaccharides on Phosphacan and Protein-tyrosine Phosphatase- ζ/β Mediate Their Binding to Neural Cell Adhesion Molecules and Tenascin. *J. Biol. Chem.* **270**, 24650-24653.
- Milev P., Fischer D., Häring M., Schulthess T., Margolis R.K. Chiquet-Ehrismann R. and Margolis R.U. (1997) The Fibrinogen-like Globe of Tenascin-C Mediates Its Interactions with Neurocan and Phosphacan/Protein-tyrosine Phosphatase- ζ/β . *J. Biol. Chem.* **272**, 15501-15509.
- Milev P., Chiba A., Häring M., Rauvala H., Schachner M., Ranscht B., Margolis R.K. and Margolis R.U. (1998) High Affinity Binding and Overlapping Localization of Neurocan and Phosphacan/Protein-tyrosine Phosphatase- ζ/β with Tenascin-R, Amphoterin, and the Heparin-binding Growth-associated Molecule. *J. Biol. Chem.* **273**, 6998-7005.
- Milner P.G., Li Y.S., Hoffman R.M., Kodner C.M., Siegel N.R. and Deuel T.F. (1989) A novel 17 K_d heparin-binding growth factor (BGF-8) in bovine uterus: purification and N-terminal amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 1096-1103.
- Momand J., Zambetti G.P., Olson D.C., George D. and Levine A.J. (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**, 1237-1245.
- Moon R.T., Kohn A.D., De Ferrari G.V. and Kaykas A. (2004) WNT and β -Catenin signalling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Gen.* **5**, 689-699.
- Müller S., Kunkel P., Lamszus K., Ulbricht U., Lorente G.A., Nelson A.M., von Schack D., Chin D.J., Lohr S.C., Westphal M. and Melcher T. (2003) A role for Receptor Tyrosine Phosphatase ζ in glioma cell migration. *Oncogene* **22**, 6661-6668.
- Nagata S., Saito R., Yamada Y., Fujita N. and Watanabe K. (2001) Multiple variants of receptor-type protein tyrosine phosphatase β are expressed in the central nervous system of *Xenopus*. *Gene* **262**, 81-88.

- Nakagawara A., Milbrandt J., Muramatsu T., Deuel T.F., Zhao H., Cnaan A. and Brodeur G.M. (1995) Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastoma. *Cancer Res.* **55**, 1792-1797.
- Nakanishi T., Kadomatsu K., Okamoto T., Tomoda Y., Muramatsu T. (1997) Expression of midkine and pleiotrophin in ovarian tumors. *Obstet. Gynecol.* **90**, 285-290.
- Neel B.G. and Tonks N.K. (1997) Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 193-204.
- Nishiwaki T., Maeda N. and Noda M. (1998) Characterization and Developmental Regulation of Proteoglycan-Type Protein Tyrosine Phosphatase ζ /RPTP β Isoforms. *J. Biochem.* **123**, 458-467.
- Nolo R., Kaksonen M., Raulo E. and Rauvala H. (1995) Co-expression of heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) and N-syndecan (syndecan-3) in developing rat brain. *Neurosci. Lett.* **191**, 39-42.
- Norman S.A., Golfinos J.G. and Scheck A.C. (1998) Expression of a receptor protein tyrosine phosphatase in human glial tumors. *J. Neuro-Oncology* **36**, 209-217.
- Pannifer A.D.B., Flint A.J., Tonks N.K. and Barford D. (1998) Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by X-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* **273**, 10454-10462.
- Peles E., Nativ M., Campbell P.L., Sakurai T., Martinez R., Lev S., Clary D.O., Schilling J., Barnea G., Plowman G.D., Grumet M. and Schlessinger J. (1995) The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase β is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell* **82**, 251-60.
- Peles E., Schlessinger J. and Grumet M. (1998) Multi-ligand interactions with receptor-like protein tyrosine phosphatase β : implications for intercellular signaling. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 121-124.
- Powers C., Aigner A., Stoica G.E., McDonnell K. and Wellstein A. (2002) Pleiotrophin Signaling through Anaplastic Lymphoma Kinase Is Rate-limiting for Glioblastoma Growth. *J. Biol. Chem.* **277**, 14153-14158.
- Premont R.T., Claing A., Vitale N., Freeman J.L.R., Pitcher J.A., Patton W.A., Moss J., Vaughan M. and Lefkowitz R.J. (1998) β_2 -Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14082-14087.
- Pringle N., Collarini E.J., Hart I.K., Raff M.C. and Richardson W.D. (1991) Platelet-derived growth factor in central nervous system gliogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **633**, 160-168.
- Qi M., Ikematsu S., Maeda N., Ichihara-Tanaka K., Sakuma S., Noda M., Muramatsu T. and Kadomatsu K. (2001) Haptotactic Migration Induced by Midkine. *J. Biol. Chem.* **276**, 15868-15875.

- Ranjan M. and Hudson L.D. (1996) Regulation of Tyrosine Phosphorylation and Protein Tyrosine Phosphatases during Oligodendrocyte Differentiation. *Mol. Cell. Neurosci.* **7**, 404-418.
- Ratcliffe C.F., Qu Y., McCormick K.A., Tibbs V.C., Dixon J.E., Scheuer T. and Catterall W.A. (2000) A sodium channel signaling complex: modulation by associated receptor protein tyrosine phosphatase β . *Nat. Neurosci.* **3**, 437-444.
- Raulo E., Julkume I., Merenmies J., Pihlaskari R. and Rauvala H. (1992) Secretion and biological activities of heparin-binding growth-associated molecule neurite outgrowth-promoting and mitogenic actions of the recombinant and tissue-derived protein. *J. Biol. Chem.* **267**, 11408-11416.
- Raulo E., Chernousov M.A., Carey D.J., Nolo R.J. and Rauvala H. (1994) Isolation of a neuronal cell surface receptor of Heparin Binding Growth-Associated Molecule (HB-GAM). *J. Biol. Chem.* **269**, 12999-13004.
- Rauvala H. (1989) An 18-K_d heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO J.* **8**, 2933-2941.
- Rapraeger A.C., Krufka A. and Olwin B.B. (1991) Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* **252**, 1705-1708.
- Revest J.M., Faivre-Sarraillh C., Maeda N., Noda M., Schachner M. and Rougon G. (1999) The interaction between F3 immunoglobulin domains and protein tyrosine phosphatases ζ/β triggers bidirectional signalling between neurons and glial cells. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 1134-1147.
- Reyes-Mugica M., Rieger-Christ K., Ohgaki H., Ekstrand B.C., Helie M., Kleinman G., Yahanda A., Fearon E.R., Kleihues P. and Reale M.A. (1997) Loss of DCC expression and glioma progression. *Cancer Res.* **57**, 382-386.
- Roskams T., De Vos R., David G., Van Damme B and Desmet V. (1998) Heparan sulphate proteoglycan expression in human primary liver tumours. *J. Pathol.* **185**, 290-297.
- Salter M.W. and Wang Y.T. (2000) Sodium channels develop a tyrosine phosphatase complex. *Nat. Neurosci.* **3**, 417-419.
- Sakurai T., Friedlander D.R. and Grumet M. (1996) Expression of Polypeptide Variants of Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase β : The Secreted Form, Phosphacan, Increases Dramatically During Embryonic Development and Modulates Glial Cell Behavior *In vitro*. *J. Neurosci. Res.* **43**, 694-706.
- Sakurai T., Lustig M., Nativ M., Hemperly J.J., Schlessinger J., Peles E. and Grumet M. (1997) Induction of Neurite Outgrowth through Contactin and Nr-CAM by Extracellular Regions of Glial Receptor Tyrosine Phosphatase β . *J. Cell Biol.* **136**, 907-918.
- Schlegel U., Weller M. and Westphal M. (eds.) (2003) Neuroonkologie. 2nd ed., *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart.
- Schmidt N.O., Westphal M., Hagel C., Ergün S., Stavrou D., Rosen E.M. and Lamszus K. (1999) Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor /scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis. *Int. J. Cancer* **84**, 10-18.

- Schulte A.M., Lai S., Kurtz A., Czubyko F., Riegel A.T. and Wellstein A. (1996) Human trophoblast and choriocarcinoma expression of the growth factor pleiotrophin attributable to germ-line insertion of an endogenous retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14759-14764.
- Schulte-Herrmann R., Marian B. and Bursch W. (1994) Tumorpromotion. in: Marquardt H., Schäfer S.G. (eds.) *Lehrbuch der Toxikologie. BI-Wiss.-Verl. Leipzig, Mannheim, Wien, Zürich*, 148-177.
- Seddon A.P., Hulmes J.D., Decker M.M., Kovcsdi I., Fairhurst J.L., Backer J. Dougher-Vermazen M. and Bohlen P. (1994) Refolding and characterization of human recombinant heparin-binding neurite-promoting factor. *Protein Exp. Purif.* **5**, 14-21.
- Sehgal A. (1998) Molecular changes during the genesis of human gliomas. *Semin. Surg. Oncol.* **14**, 3-12.
- Sellin J.H., Umar S., Xiao J. and Morris A.P. (2001) Increased β -Catenin Expression and Nuclear Translocation Accompany Cellular Hyperproliferation *in Vivo*. *Cancer Res.* **61**, 2899-2906.
- Serrano M., Hannon G.J. and Beach D. (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704-707.
- Shintani T., Watanabe E., Maeda N. and Noda M. (1998) Neurons as well as astrocytes express proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase ζ /RPTP β : analysis of mice in which the PTP ζ /RPTP β gene was replaced with the LacZ gene. *Neurosci. Lett.* **247**, 135-138.
- Shintani T., Maeda N. and Noda M. (2001) Receptor-Like Protein Tyrosine Phosphatase γ (RPTP γ), But Not PTP ζ /RPTP β , Inhibits Nerve-Growth-Factor-Induced Neurite Outgrowth in PC12D Cells. *Dev. Neurosci.* **23**, 55-69.
- Shitara K., Yamada H., Watanabe K., Shimonaka M. and Yamaguchi Y. (1994) Brain-specific Receptor-type Protein-tyrosine Phosphatase RPTP β Is a Chondroitin Sulfate Proteoglycan *in Vivo*. *J. Biol. Chem.* **269**, 20189-20193.
- Shiroo M., Goff L., Biffen M., Shivnan E. and Alexander D. (1992) CD45-tyrosine phosphatase-activated p59fyn couples the T-cell antigen receptor to pathways of diacylglycerol production, protein-kinase-C activation and calcium influx. *EMBO J.* **11**, 4887-4897.
- Sieh M., Bolen J.B. and Weiss A. (1993) CD45 specifically modulates binding of Lck to a phosphopeptide encompassing the negative regulatory tyrosine of Lck. *EMBO J.* **12**, 315-321.
- Souttou B., Juhl H., Hackenbruck J., Röckseisen M., Klomp H.J., Raulais D., Vigny M. and Wellstein A. (1998) Relationship between serum concentrations of the growth factor pleiotrophin and pleiotrophin-positive tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 1468-1473.
- Stefanik D.F., Rizkalla L.R., Soi A., Goldblatt S.A. and Rizkalla W.M. (1991) Acidic and basic fibroblast growth factors are present in glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* **51**, 5760-5765.
- Sternlicht M.D. and Werb Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 463-516.

- Stoica G.E., Kuo A., Aigner A., Sunitha I., Souttou B., Malerczyk C., Caughey D.J., Wen D., Karavanov A., Riegel A.T. and Wellstein A. (2001) Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J. Biol. Chem.* **276**, 16772-16779.
- Tamura M., Gu J., Matsumoto K., Aota S., Parsons R. and Yamada K.M. (1998) Inhibition of Cell Migration, Spreading, and Focal Adhesions by Tumor Suppressor PTEN. *Science* **280**, 1614-1617.
- Tamura M., Gu J., Tran H. and Yamada K.M. (1999) PTEN Gene and Integrin Signaling in Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 1820-1828.
- Tanaka M., Maeda N., Noda M. and Marunouchi T. (2003) A Chondroitin Sulfate Proteoglycan PTP ζ /RPTP β Regulates the Morphogenesis of Purkinje Cell Dendrites in the Developing Cerebellum. *J. Neurosci.* **23**, 2804-2814.
- Thomaidou D., Coquillat D., Meintanis S., Noda M., Rougon G. and Matsas R. (2001) Soluble forms of NCAM and F3 neuronal cell adhesion molecules promote Schwann cell migration: identification of protein tyrosine phosphatases ζ/β as the putative F3 receptors on Schwann cells. *J. Neurochem.* **78**, 767-778.
- Tohma Y., Gratas C., Biernat W., Peraud A., Fukuda M., Yonekawa Y., Kleihues P. and Ohgaki H. (1998) PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **57**, 684-689.
- Tonks N.K. and Neel B.G. (1996) From Form to Function: Signaling by Protein Tyrosine Phosphatases. *Cell* **87**, 365-368.
- Tonks N.K. and Neel B.G. (2001) Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 182-195.
- Tsutsui J., Kadomatsu K., Matsubara S., Nakagawara A., Hamnoue M., Takao S., Shimazu H., Ohi Y. and Muramatsu T. (1993) A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res.* **53**, 1281-1285.
- Tuschl T. (2001) RNA Interference and Small Interfering RNAs. *ChemBiochem.* **2**, 239-245.
- Tuschl T. (2002) The siRNA user guide. Online-Anleitung zur Auswahl von siRNAs und zur Transfektion in Säugerzellen. <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/sirna.htm>
- Ulbricht U., Brockmann M.A., Aigner A., Eckerich C., Müller S., Fillbrandt R., Westphal M. and Lamszus K. (2003) Expression and function of the receptor protein tyrosine phosphatase ζ and its ligand pleiotrophin in human astrocytomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 1265-1275.
- Van Haastert P.J.M. and Devreotes P.N. (2004) Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **5**, 626-634.
- Vanderwinden J.M., Mailleux P., Schiffmann S.N. and Vanderhaeghen J.J. (1992) Cellular distribution of the new growth factor pleiotrophin (HB-GAM) mRNA in developing and adult rat tissue. *Anat. Embryol.* **186**, 387-406.

- Watanabe K., Sato K., Biernat W., Tachibana O., von Ammon K., Ogata N., Yonekawa Y., Kleihues P. and Ohgaki H. (1997) Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin. Cancer Res.* **3**, 523-530.
- Watanabe K., Tachibana O., Sata K., Yonekawa Y., Kleihues P. and Ohgaki H. (1996) Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* **3**, 217-224.
- Webb D.J., Parsons J.T. and Horwitz A.F. (2002) Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells - over and over and over again. *Nature Cell Biol.* **4**, E97-E100.
- Weber D., Klomp H.J., Czubayko F., Wellstein A. and Juhl H. (2000) Pleiotrophin can be rate-limiting for pancreatic cancer cell growth. *Cancer Res.* **60**, 5284-5288.
- Wellstein A., Fang W.J., Khatri A., Lu Y., Swain S.S., Dickson R.B., Sasse J., Riegel T. and Lippman M.E. (1992) A heparin-binding growth factor secreted from breast cancer cells homologous to a developmentally regulated cytokine. *J. Biol. Chem.* **267**, 2582-2587.
- Wessel D., Flügge U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergent and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141-143.
- Westphal M., Hänsel M., Nausch H., Rohde E. und Herrmann H.D. (1990) Culture of brain tumors on an extracellular matrix derived from bovine corneal endothelial cells and cultured human glioma cell. In *Methods in Molecular Biology* Vol. 5: Animal Cell Culture. Pollard J.W. und Walker J.M. (eds.) Humana Press, Clifton, New Jersey, 113-131.
- Westphal M., Hansel M., Hamel W., Kunzmann R., Holzel F. (1994) Karyotype analyses of 20 human glioma cell lines. *Acta Neurochir (Wien)* **126**, 17-26.
- Westphal M. and Herrmann H.D. (1999) Hirntumoren. *Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.*
- Wong A.J., Ruppert J.M., Bigner S.H., Grzeschik C.H., Humphrey P.A., Bigner D.S. and Vogelstein B. (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 2965-2969.
- Yamada H., Watanabe K., Shimonaka M. and Yamaguchi Y. (1994) Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family. *J. Biol. Chem.* **269**, 10119-10126.
- Yamakawa T., Kurosawa N., Kadomatsu K., Matsui T., Itoh K., Maeda N., Noda M. and Muramatsu T. (1999) Levels of expression of pleiotrophin and protein tyrosine phosphatase ζ are decreased in human colorectal cancers. *Cancer Lett.* **135**, 91-96.
- Yano H., Hara A., Takenaka K., Nakatani K., Shinoda J., Shimokawa K., Yoshimi N., Mori H. and Sakai N. (2000) Differential expression of beta-catenin in human glioblastoma multiforme and normal brain tissue. *Neurol. Res.* **22**, 650-656.
- Yeh H.J., He Y.Y., Xu J., Hsu C.Y. and Deuel T.F. (1998) Upregulation of pleiotrophin gene expression in developing microvasculature, macrophages, and astrocytes after acute ischemic brain injury. *J. Neurosci.* **18**, 3699-3707.

- Zechner D., Fujita Y., Hulsken J., Müller T., Walther I., Taketo MM., Crenshaw E.B., Birchmeier W. and Birchmeier C. (2003) β -Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev. Biol.* **258**, 406-418.
- Zetter B. R. (1987) Assay of capillary endothelial cell migration. *Methods Enzymol.* **147**, 135-144.
- Zhang H., Kelly G., Zerillo C., Jaworski D.M. and Hockfield S. (1998) Expression of a Cleaved Brain-Specific Extracellular Matrix Protein Mediates Glioma Cell Invasion *In vivo*. *J. Neurosci.* **18**, 2370-2376.
- Zhang H., Webb D.J., Asmussen H. and Horwitz A.F. (2003) Synapse formation is regulated by the signaling adaptor GIT1. *J. Cell Biol.* **161**, 131-142.
- Zhang N., Zhong R., Wang Z.Y. and Deuel T.F. (1997) Human breast cancer growth inhibited *in vivo* by a dominant negative pleiotrophin mutant. *J. Biol. Chem.* **272**, 16730-16736.
- Zhang N. and Deuel T. (1999) Pleiotrophin and midkine, a family of mitogenic and angiogenic heparin-binding growth and differentiation factors. *Curr. Opin. Hematol.* **6**, 44-56.
- Zhang N., Yeh H.J., Zhong R., Li Y.S. and Deuel T.F. (1999) A dominant-negative pleiotrophin mutant introduced by homologous recombination leads to germ-cell apoptosis in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6734-6738.
- Zhao Z., Manser E., Loo T. and Lim L. (2000) Coupling of PAK-Interacting Exchange Factor PIX to GIT1 Promotes Focal Complex Disassembly. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6354-6363.
- Zheng X.M., Wang Y. and Pallen C.J. (1992) Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase. *Nature* **359**, 336-339.

7 Abkürzungsverzeichnis

ALK	anaplastische Lymphomkinase
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT	Annealing-Temperatur
bp	base pairs (Basenpaare)
BCA	bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
bidest.	bidestilliert
BSA	bovines Serum-Albumin
C-ABC	Chondroitinase ABC
CAH	Carboanhydrase
CAM	cell adhesion molecule
Cat-1	cool-associated, tyrosin-phosphorylated 1
cDNA	complementary DNA
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Chapsyn	channel-associated protein of synapses
CMEC	cerebral microvascular endothelial cells
CS	Chondroitinsulfat
CSPG	Chondroitinsulfat-Proteoglykan
Cy3	cyanine 3
DAB	diaminobenzidine tetrahydrochloride
DCC	deleted in colorectal cancer
DEP1	density enhanced phosphatase-1/PTP ϵ
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dlg	<i>Drosophila</i> discs-large protein
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAK	focal adhesion kinase
FITC	fluorescein isothiocyanate
FCS	fetal calf serum
FGF-2	fibroblast growth factor-2
FNIII	fibronectin type III
GBM	<i>Glioblastoma multiforme</i>
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein
Git1	G protein-coupled receptor kinase-interactor 1
GLEPP1	glomerular epithelial protein 1/PTP θ
GPI	glycosylphosphatidylinositol
HB-GAM	heparin-binding growth-associated molecule
HCl	Salzsäure
HGF/SF	hepatocyte growth factor/scatter factor

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IF	Immunfluoreszenz
Ig	immunoglobulin
IHC	Immunhistochemie
kDa	kilo-Dalton
LAR	leukocyte antigen related
LiCl	Lithiumchlorid
LOH	loss of heterozygosity
mAb	monoclonal antibody
MAGI-3	membrane-associated guanylate kinase inverted orientation
MAM	meprin/A5-protein/PTP μ
MDM2	mouse double minute 2
MET	HGF-/SF-Rezeptor
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MS	Multiple Sklerose
NB	Northern Blot
N-CAM	neural cell adhesion molecule
NCE-G	Neurochirurgie Eppendorf-Gliom
NaCl	Natriumchlorid
Ng-CAM	neuron glia cell adhesion molecule
NZY ⁺	NZ amine, Yeast extract
pAb	polyclonal antibody
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	Peroxidase/Anti-Peroxidase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PDZ	PSD-95/Dlg-A/Zo-1
PG	Proteoglykan
PMSF	phenylmethylsulphonylfluoride
PSD	postsynaptische Dichte
PSI	Phosphacan Short Isoform
PTEN	phosphatase and tensin homology
PTN	Pleiotrophin
PTP	protein tyrosine phosphatase
PTPase	Protein-Tyrosinphosphatase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
rpm	rounds per minute
RPTP	receptor type/receptor-like protein tyrosine phosphatase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion
SAF-A	scaffold attachment factor A
SAP1	stomach cancer-associated protein-tyrosine phosphatase-1
SAP	synapse-associated protein

SH3	src homology 3
SDS	sodium dodecyl sulfate
siRNA	small interfering RNA
SPARC	secreted protein acidic and rich in cysteine
SSC	sodium chloride/sodium citrate buffer
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TBS	tris buffered saline
TCF/Lef	T-Cell factor/lymphoid-enhancing factor
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	tetramethylrhodamine isothiocyanate
UTR	nicht translatierte Region
vWF	von Willebrandt-Faktor
WB	Western Blot
WHO	World Health Organisation
Zo-1	Zona occludens protein-1

Herzlich danken möchte ich...

... Herrn Prof. Dr. M. Westphal für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Mittel sowie für die Betreuung und Begutachtung dieser Dissertation.

... Frau PD Dr. K. Lamszus für die Themenstellung, die ausgezeichnete Betreuung während der Arbeit und konstruktive aufbauende Kritik, die die Arbeit in die richtige Richtung wies.

... Herrn Prof. Dr. L. Renwantz am Zoologischen Institut der Universität Hamburg für die Übernahme der weiteren Begutachtung meiner Dissertation.

... Regina Fillbrandt für die unermüdliche und aufopfernde Unterstützung und Bereitschaft, mich in allen Lebenslagen zu unterstützen. Ohne ihre tatkräftige und stets zuverlässige Hilfe im Labor wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

... allen Mitarbeiterinnen im Labor: Dr. Bettina Wagner und Dr. Carmen Eckerich sowie Svenja Zapf, Hildegard Meißner, Dorothea Zirkel und Katharina Hansen für die angenehme Arbeitsatmosphäre, technische Unterstützung, methodische Diskussionen und nicht zuletzt für die Pausen mit Heißgetränken.

... Dr. Frank O. Fackelmayer, Dr. Achim Aigner und Dr. Dr. Sabine Müller, die für zahlreiche Experimente Material zur Verfügung stellten sowie Sker Freist für Hilfestellung bei den fotografischen Arbeiten.

... meinen Eltern und Schwiegereltern, die für die nötige Ruhe in brenzligen Situationen sorgten, immer eine Rückzugsmöglichkeit boten und mir in jeder Form Unterstützung gewährten.