

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. J. Sievers)
der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel

**Die Matrix-Metalloproteinase 19 (MMP19) wird in
astrozytären Tumoren hochgradig exprimiert und
beeinflusst die Invasionsfähigkeit der Tumorzellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
Imke Dorothea Lettau
aus Eckernförde

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Mentlein
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Held-Feindt
Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2010
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 03.08.2010

gez Prof. Dr. Dr. Cascorbi

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Hirntumore	1
1.2	Die Familie der MMPs	3
1.3	Die Matrix-Metalloproteinase 19 (MMP19)	5
2	Fragestellung	8
3	Materialien und Methoden	9
3.1	Materialien	9
3.2	Methoden.....	17
3.2.1	Western Blot	17
3.2.2	Realtime-RT-PCR	20
3.2.3	Zellkultur und Stimulationsexperimente	22
3.2.4	Immunhistochemie	22
3.2.5	Migrationsversuche	24
3.2.6	Statistische Methoden.....	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Genexpression.....	27
4.1.1	Expression von MMP19 in Astrozytomen	27
4.1.2	Genexpression von MMP19 in kultivierten Zelllinien	28
4.1.3	Regulation von MMP19	29
4.2	Immunhistochemie.....	30
4.2.1	Vorversuche: Antikörperspezifität.....	31
4.2.2	Untersuchung der Koloalisationen von MMP19	32
4.3	Migrationsversuche.....	36
4.3.1	Vorversuche: Inhibition der MMP19-Expression.....	36
4.3.2	Migration nach MMP19-„Silencing“	38
5	Diskussion	40
5.1	Invasion	40
5.2	Die Rolle von MMP19	41
5.2.1	MMP19 wird in astrozytären Tumoren verstärkt exprimiert.....	42
5.2.2	MMP19 wird von proinflammatorischen Zytokinen induziert	42
5.2.3	MMP19 spielt eine entscheidende Rolle bei der Invasionsfähigkeit von Glioblastomzellen	43
6	Ausblick	44
7	Zusammenfassung	45
A	Literaturverzeichnis	46

B	Abkürzungsverzeichnis	52
C	Abbildungsverzeichnis	53
D	Tabellenverzeichnis.....	54
E	Danksagung	55
F	Lebenslauf.....	56

1 EINLEITUNG

Krebserkrankungen sind in Deutschland nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Die Mortalität der Patienten wird dabei wesentlich von der Tumorzellinvasion in umliegendes Gewebe und Metastasierung bestimmt (Drappatz et al., 2009). Zur Invasion müssen die Tumorzellen umliegende anatomische Barrieren wie Basalmembranen, Interzellularbrücken und extrazelluläre Matrix überwinden (Mignatti und Rifkin, 1993). Auch für Metastasierungsvorgänge ist die Spaltung verschiedener Proteinstrukturen notwendig (Matrisian et al., 1995).

1.1 Hirntumore

Tumore des Gehirns bezeichnen raumfordernde, intrakranielle Neoplasien, die von umgebenden Strukturen wie den Meningen oder hirneigenen Zellen ausgehen können. Primäre Gehirntumore, also von hirneigenem Gewebe ausgehende Tumore, sind eine grundsätzlich seltene Erkrankung und machen an den im Erwachsenenalter diagnostizierten Neoplasien nur etwa 2% aus (Inzidenz: 7 jährliche Neuerkrankungen/ 100 000 Einwohner). Auf Grund ihrer zum Teil sehr schweren Morbidität und hohen Mortalität, stehen sie jedoch im starken Interesse medizinischer Forschung. Astrozytome sind die häufigsten primären Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie gehen von Astrozyten aus, welche den Großteil der Gliazellen ausmachen. Astrozyten sind sternförmig verzweigte Zellen, welche mit ihren Ausläufern ein dreidimensionales Netz um Neurone und an Grenzflächen bilden. Ihnen kommen folgende Aufgaben zu:

- Stützfunktion
- Austauschfunktion zwischen Neuronen und Blutkreislauf (Entgiftung- und Stoffwechselfunktion) (Micevych und Sinchak, 2008)
- Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke
- Bildung von Narbengewebe
- Beteiligung an der Immunantwort des Gehirns

Zur Pathogenese von astrozytären Tumoren ist wenig bekannt, eine genetische Komponente scheint untergeordnete Rolle zu spielen, da die meisten Fälle sporadisch auftreten. Als bekannte Risikofaktoren für die Entstehung astrozytärer Tumore gelten ionisierende Strahlung (Gessi et al., 2008) und eine Punktmutation, die zu einem defekten Enzym (Isocitrat-Dehydrogenase) führt, so dass es zu einem pathologischen Anstieg des

kanzerogenen 2-Hydroxygluterat kommt (Dang et al., 2009). Astrozytäre Tumore werden heute gemäß der WHO-Klassifikation unterteilt und diese berücksichtigt dabei folgende Parameter: Histologie, Zellzahl, Kern- und Zellpleomorphismen, Mitosen/ Mitosefiguren, endotheliale Proliferation, Nekrosen und genetischen Alterationen (Kleihues et al., 2002).

Der Grad I der WHO-Klassifikation bezeichnet gutartige Astrozytome, die ein gut abgrenzbares Wachstum gegenüber dem Hirngewebe aufzeigen. Zumeist sind Kinder und junge Erwachsene betroffen. Eine bösartige Entartung wird nur sehr selten beobachtet (< 1%) und kann kurativ behandelt werden, indem der Tumor vollständig reseziert wird. Ist dies nicht möglich, kann eine anschließende oder alleinige Strahlentherapie ebenfalls zur vollständigen Heilung führen.

Die astrozytären Tumore der Grade II-IV wachsen alle infiltrativ, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und Differenzierung.

Niedrig maligne, in der Regel gut differenzierte Astrozytome werden als Grad II eingeordnet und betreffen meist junge Erwachsene (durchschnittliches Erkrankungsalter 35 Jahre), wobei Männer mit 55%-65% etwas häufiger betroffen sind. Die Inzidenzrate beträgt 0,9 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern und Jahr. Nach einer Therapie, die aus einem chirurgischen Eingriff und einer anschließenden Bestrahlung besteht, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 40-50%.

Das anaplasische Astrozytom, das als Grad III klassifiziert wird, zeichnet sich neben seiner Invasivität durch ein besonders schnelles Wachstum aus. Der Erkrankungsgipfel liegt bei 40 Jahren. Die Therapie besteht aus einer Operation, gefolgt von einer Strahlentherapie. Zusätzlich wird oft eine Chemotherapie eingesetzt. Aufgrund der Aggressivität des Tumors, die zu einer hohen Rezidivrate führt, beträgt das mittlere Überleben nur wenige Jahre.

Das Glioblastom ist mit 70% das häufigste Astrozytom und hat eine sehr schlechte Prognose. Das Erkrankungsalter liegt 45 und 70 Jahren. Bezeichnend für diesen Tumor ist die kurze Krankengeschichte der Patienten, in der sich Symptome erst in einem sehr späten Stadium bemerkbar machen. Die Therapie umfasst die Operation mit nachfolgender lokaler Strahlentherapie. Zusätzlich wird heute meist eine Chemotherapie, entweder direkt nach der Strahlentherapie oder zur Behandlung eines Rezidivtumors eingesetzt. Neuartige Medikamente wie Immunmodulatoren sind in der Erforschung (Salgaller und Liao, 2006). Die Prognose eines Glioblastoms ist dennoch immer infaust und das mittlere Überleben beträgt nur etwa ein Jahr (Nieder et al., 2006).

Die Symptome verschiedener Hirntumore sind grundsätzlich ähnlich: allgemeine Symptome sind durch die intrakranielle Drucksteigerung gekennzeichnet. Klassische

Hirndruckzeichen sind Kopfschmerzen, Erbrechen und eine Stauungspapille und schließlich kann es auch zu einer Einklemmung des Hirnstammes kommen, die zu einer Lähmung des Atemzentrums führt. Fokale Symptome können je nach Lokalisation sehr vielfältig sein und sich z.B. als Paresen und Aphasien äußern. Sie werden ebenfalls zum einen durch den intrakraniellen Druck verursacht, zum anderen auch durch das invasive Wachstum der höhergradigen Tumore.

WHO-Grad	Tumor
I	pilozytisches Astrozytom subependymales Riesenzell-Astrozytom
II	pilomyxoides Astrozytom pleomorphes Xanthoastrozytom diffuses Astrozytom
III	anaplastisches Astrozytom
IV	Glioblastoma multiforme

Tabelle 1: WHO-Gradierung der astrozytären Tumore

1.2 Die Familie der MMPs

Die Fähigkeit in das umliegende Gewebe zu infiltrieren ist eine wesentliche Eigenschaft von höhergradigen astrozytären Tumoren, und macht einen entscheidenden Aspekt ihrer klinischen Malignität aus (Salcman, 1995). Silbergeld et al. beschreiben einzelne Tumorzellen, sogenannte „Guerilla-Zellen“, die vom eigentlichen Tumor mehr als 4-7 cm in das umliegende Gewebe migrieren können. Auf molekularer Ebene wird die Migration vor allem von Proteasen bewältigt, die extrazelluläre Komponenten wie Kollagene, Glykoproteine, Proteoglykane und Glycosaminoglykane als Substrate haben. (Matrisian et al., 1995). Bei Glioblastomen sind dabei vor allem Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), andere Metalloproteinasen und einige Serin-/ Cysteinproteasen zu nennen (Rao, 2003). Die genauere Betrachtung der MMPs scheint also im Hinblick auf die Erforschung und das Verständnis von Hirntumoren besonders lohnenswert. Die Familie der MMPs besteht aus über zwanzig zinkabhängigen Endopeptidasen, deren Vorkommen erstmalig 1962 von Gross und Lapiere beschrieben wurde (Brinckerhoff und Matrisian 2002). Sie kommen sowohl membrangebunden, als auch in sekretorischer Form vor (Brooks et al., 1996) und werden im Wesentlichen in vier Untergruppen eingeteilt: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und MMPs vom Membrantyp (MT-MMP). Alle diese Untergruppen zeichnen sich durch bestimmte Strukturen und Funktionen aus (Nagase und Woessner, 1999).

Protein	MMP	Anmerkung
Kollagenase 1	MMP1	Spielt eine Rolle bei der Reaktion von Keratinozyten auf UVA-Strahlung (Jean et al., 2009).
Kollagenase 2	MMP8	Wirkt wie auch MMP2 an der Cervix von Ratten im Sinne einer Auflockerung während Schwangerschaft und Geburt (Yin et al., 2009).
Kollagenase 3	MMP13	Geringe Substratspezifität → schneller und effektiver EZM-Abau
Kollagenase 4	MMP18, synonym MMP19	
Gelatinase A	MMP2	Eine erhöhte Aktivität wirkt ungünstig auf vaskuläres Remodelling bei hypertonen Erkrankungen (Castro et al., 2009). Spielt eine Rolle bei der Invasivität von Glioblastomen (Lampert et al., 1998).
Gelatinase B	MMP9	Spielt eine Rolle bei der Tumorzellinvasion (Lamar et al., 2008). Schwanzzellen produzieren MMP 9 nach Verletzungen in einer 100-fach erhöhten Konzentration (Chattopadhyay et al., 2009). MMP9 scheint außerdem eine negativ Rolle bei der Entstehung von intestinalen Tumoren zu spielen (Sinnamon et al., 2008). Eine erhöhte Expression führt zu einer Hemmung des Glioblastomwachstums (Lakka et al., 2002).
Stromelysin 1	MMP3	Zersetzt intakte Basalmembranen (Bejarano et al., 1988) Aktiviert u.a. MMP7 und MMP9 in der Pathogenese von Arteriosklerose (Dollery und Libby, 2006).
Stromelysin 2	MMP10	MMP10 kann als Tumormarker bei Karzinomen in der Mundhöhle dienen (Yen et al., 2009).
Stromelysin 3	MMP11	Die Expressionsrate korreliert mit dem Tumorstadium beim Mammakarzinom (Cheng et al., 2009).
MT1-MMP	MMP14	Hohe Expressionsrate in Brustzelltumoren geht mit schlechter Prognose einher (Jiang et al., 2006).
MT2-MMP	MMP15	MMP15 wird im Zellmodell in invasiven Mammakarzinomen überexprimiert (Rizki et al., 2008).
MT3-MMP	MMP16	MMP16 spielt eine Rolle beim vertikalen Wachstum von Melanomen, indem sie Kollagen1 prozessiert (Iida et al., 2001).
MT4-MMP	MMP17	Ebenso wie MMP25 wird MMP17 in verschiedenen Karzinomen überexprimiert (Sohail et al., 2008).
MT5-MMP	MMP24	MMP24 ist ein wichtiger Faktor in der Nozizeption inflammatorischer Schmerzen Folgueres et al., 2009).
MT6-MMP	MMP25	MMP25 aktiviert MMP2 und könnte dementsprechend eine Rolle bei der Tumorinvasion und Metastasierung spielen (Nie und Pei, 2003).
Matrilysin 1	MMP7	Ein hohe Expression verschlechtert die Prognose beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom (Liu et al., 2007).
Matrilysin 2	MMP26	Die Expressionsrate korreliert mit dem Tumorstadium beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom (Li et al., 2009).
Makrophagen-Elastase	MMP12	Wird nahezu ausschließlich von Makrophagen produziert (Shapiro et al., 1993).
Enamelysin	MMP20	Wird von Zahnschmelz produzierenden Zellen gebildet und setzt diesen um (Bartlett et al., 1998).
Epilysin	MMP28	Alle Formen von MMP28 erhöhen die Expressionsrate von MMP19 und TIMP3 (Rodgers et al., 2009).

Tabelle 2: Humane MMPs: Überblick und wichtigste Funktionen

Alle MMPs bestehen aus mehreren Domänen, nämlich immer einem Signalpeptid, einem Propeptid, einer katalytischen Domäne und einer Hemopexin-ähnlichen Domäne, welche mit den TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) interagiert. Das Propeptid enthält ein Cystein, welches erst nach Abspaltung des Propeptids das Zinkatom der katalytischen Domäne frei gibt. Durch diesen so genannten „Cysteine Switch“ gelangt die Protease in einen aktivierbaren Zustand (Van Wart und Birkedal-Hansen, 1990). Diese Aktivierung erfolgt durch verschiedene extrazelluläre Proteasen, auch andere MMPs (Sternlicht und Werb, 2001). Die wesentliche Funktion der MMPs ist die Spaltung verschiedener Komponenten der extrazellulärer Matrix (EZM) aber auch regulatorischer Moleküle (Vu und Werb, 2000). MMPs spielen somit eine entscheidende Rolle in vielen physiologischen Prozessen, z.B. bei der Embryo- und Organogenese (Vu und Werb, 2000) oder bei Vorgängen wie Zellinvasion, Matrixdegeneration und Angiogenese (Brooks et al., 1996). Doch auch bei pathologischen Vorgängen wie Tumorstadium, Invasion und Metastasierung (Stetler-Stevenson et al., 1993) scheinen MMPs eine große Rolle zu spielen, auch wenn diese noch nicht vollständig geklärt ist. Sie beeinflussen außerdem immunologische Vorgänge wie z.B. Entzündungsgeschehen (Konttinen et al., 1999) und T-Zellen in ihrer Fähigkeit in Gewebe einzuwandern (Leppert et al., 1995). Die Kontrolle der MMPs erfolgt über verschiedene endogene Moleküle, insbesondere durch die „Tissue Inhibitors of Metalloproteinases“ (TIMPs), die gewebspezifisch exprimiert werden, und mit unterschiedlichen Intensitäten die verschiedenen MMPs hemmen (Baker et al., 2002).

1.3 Die Matrix-Metalloproteinase 19 (MMP19)

Die MMP19 wird auch als RASI-1 (Rheumatoid arthritis synovium inflamed) oder MMP18 bezeichnet. Sie gehört zu den Proteasen, die als Proform sezerniert und erst extrazellulär aktiviert werden. Sie spaltet Proteine spezifisch an der Stelle Mca-Pro-Leu-Gly-Dpa-Ala-Arg-NH(2) und mit hoher Affinität das Stromelysin-Substrat Mca-Pro-Leu-Ala-Nva-Dpa-Ala-Arg-NH(2). Bekannte Substrate, die von MMP19 degradiert werden sind die Basalmembrankomponenten Kollagen Typ IV, Laminin, Nidogen, Fibronectin, Typ I Gelatin sowie Aggrecan und COMP (cartilage oligomeric matrix protein) (Stracke et al., 2000, Sadowski et al., 2005).

MMP19 ist auf Grund ihres strukturellen Charakters und der chromosomalen Lokalisation in keine der vier klassischen Untergruppen der MMPs eindeutig einzuordnen (Kolb et al., 1997; Pendas et al., 1997; Marchenko und Strongin, 2001). Sie unterscheidet sich außerdem in ihrem Expressionsmuster, da sie in verschiedenen Organen physiologisch und in hohem Ausmaß exprimiert wird. So ist die Expression in Plazenta, Lunge, Thymus, Pankreas, Ovarien, Niere, Milz und Darm nachgewiesen (Pendas et al., 1997). Auf zellulärer Ebene wurde MMP19 in Keratinozyten (Beck et al., 2007), Chondrozyten (Konttinen et al.; 1999),

glatten Muskelzellen (Kolb et al., 1997), Endothelzellen (Kolb et al., 1999), Enterozyten (Bister et al., 2004) und Myoepithelzellen der Mamma (Djonov et al., 2001) nachgewiesen. Zum Vorkommen im Gehirn bzw. in hirneigenen Zellen ist wenig bekannt. MMP19 konnte in entzündetem Hirngewebe in aktivierten Makrophagen, jedoch nur sporadisch in Astrozyten nachgewiesen werden (Sedlacek et al. 1998, Konttinen et al. 1999, van Horssen et al. 2006). Abgesehen von ihrer proteolytischen Aktivität scheint MMP19 auch immunologische Bedeutung zu haben, indem sie die Entwicklung von T-Zellen (positiv) beeinflusst (Beck et al. 2008). Des Weiteren beeinflusst MMP19 den insulin-like growth factor mittels Veränderung eines Bindeproteins (Sadowski et al., 2003) und spielt eine Rolle im Pathomechanismus von Asthma bronchiale (Gueders et al., 2009).

Die Proteinstruktur von MMP19 enthält im Wesentlichen die vier MMP-typischen Domänen: ein Signalpeptid, ein Propeptid, eine katalytische Domäne und eine Hemopexin-ähnliche Domäne. Als Besonderheit befindet sich eine Cysteinstruktur in der katalytischen Domäne (Yang und Kurkinen, 1998) und Abweichungen der Aminosäuresequenz im Propeptid. Trotz der vielen Besonderheiten von MMP19 und der Tatsache, dass sie sich in keine der vier Untergruppen einordnen lässt, hat dieses Enzym die für die MMPs klassischen biochemischen Eigenschaften (Murphy et al., 1999).

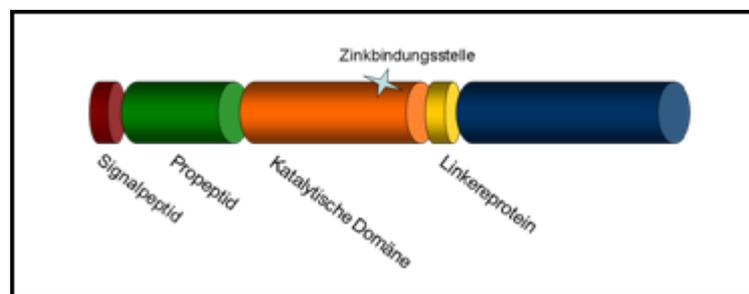


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Matrix Metalloprotease 19

Der Genort, an dem die humane MMP19 kodiert wird, befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 12 (12q14). Er besteht insgesamt aus 7522 Basenpaaren, die für ein Protein aus 508 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 58 kDa kodieren. Dieses Propeptid neigt dazu, sich selbst zu aktivieren, so dass sich schnell aktive Formen der Größen 55 kDa, 45-47 kDa und 28 kDa bilden (Sadowski et al., 2003).

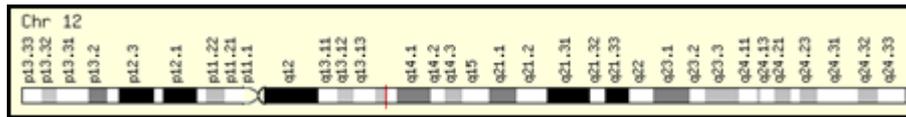


Abbildung 2: Chromosomale Lokalisation der MMP19

Zur Regulation von MMP19 ist bisher wenig bekannt. Die aktive Form von MMP19 wird von den TIMPs-2, -3 und -4, weniger allerdings von dem TIMP-1 gehemmt (Stracke et al. 2000). Die Transkriptionsfaktoren Tst1 und Skn1a beeinflussen in Keratinozyten die Promoterregion von MMP19, so dass die Expressionsrate sinkt (Beck et al., 2009). Im Gegensatz dazu kann MMP28 (Epilysin) die Expressionsrate von MMP19 anscheinend deutlich steigern (Rodgers et al., 2009).

2 FRAGESTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit soll als zentrale Frage geklärt werden, welche Rolle die Matrix-Metalloproteinase in astrozytären Tumoren spielt, da die Kenntnisse hierüber bisher unvollständig sind. Dabei ist von besonderem Interesse, in welchen astrozytären Tumoren MMP19 vorkommt, welche Zellen sie exprimieren, und ob ein Zusammenhang mit der Klassifikation der WHO beobachtet werden kann.

Für funktionelle Versuche soll dann eine Zelllinie astrozytärer Tumoren gesucht werden, welche eine hohe Expressionsrate von MMP19 aufweist. An dieser Zelllinie soll in vitro untersucht werden, welche Zytokine und Wachstumsfaktoren die Expressionsrate beeinflussen.

Schließlich sollen Hinweise darauf gefunden werden, welche Rolle MMP19 beim Abbau verschiedener extrazellulärer Bestandteile spielt und in wie weit die Invasionsfähigkeit der Tumorzellen dadurch beeinflusst wird.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien

Allgemeine Laborchemikalien

Aceton	Roth
Acrylamid/Bis-Lösung 29:1, 30%	Serva
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth
Bradford Reagenz	Bio-Rad Laboratories, USA
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	Merck
DAKO Cytomation Pen	DAKO
DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenyl- Indoldichloridhydrat)	Sigma-Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	
dNTP-Mix	Fermentas
DTT (Dithiotreitol)	Biomol
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck
Entwicklerbad	Tetenal
Ethanol, unvergällt	Roth
Fixierbad	Tetenal
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
Hämalaunlösung	Merck
Immunomount	Thermo Shandon
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Methanol	Roth

3. MATERIALIEN UND METHODEN

Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Page Rulertm	Fermentas
Random Hexamer Primer	Amersham Biosciences, England
Rinderserumalbumin (BSA)	Biomol
Saccharose	Roth
Salzsäure (HCl), 1M	Roth
Sudanschwarz	Merck
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin)	Roth
Triton-X-100	Merck
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Sigma-Aldrich
Trizol	Invitrogen
Tween	Fluka
(Natrium-)Vanadat	Fluka

Antikörper

Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Firma
Anti-CD68	Maus, monoklonal	Immunhistochemie: 1:100	DAKO
Anti-GFAP	Maus, monoklonal	Immunhistochemie: 1:100	DAKO
MIB/ Ki67	Maus, monoklonal	Immunhistochemie: 1:100	DAKO
Anti-MMP19	Kaninchen, polyklonal	Immunhistochemie: 1:500 Western Blot: 1:2000	Abcam
Anti-Pecam	Ziege, polyklonal	Immunhistochemie: 1:100	Santa Cruz

Verwendeter Sekundärantikörper beim Western Blot

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Firma
Anti-Kaninchen-HRP-conjugated	Ziege, polyklonal	1:20 000	DAKO

Verwendete Sekundärantikörper bei der Immunhistochemie

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Firma
Alexa Fluor®488 Anti-Kaninchen-IgG	Ziege, polyklonal	1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor®555 Anti-Maus-IgG	Ziege, polyclonal	1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor®555 Anti-Ziege-IgG	Esel, polyklonal	1:1000	Invitrogen

Enzyme

DNase (RNase frei)	Promega
Reverse Transkriptase	Fermentas

Farbstoffe

CFDASE-Lösung	Invitrogen
SNARF-Lösung	Invitrogen

Geräte

ABI Prism® 7000	Applied Biosystems
SDS Real-Time PCR Gerät	
Axiovert 200 M	Zeiss
Brutschränke	Heraeus
Elektrophoresekammer	Amersham Pharmacia Biotech
Filmkassette Hypercassette™	Amersham Biosciences
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Magnetrührer MR2000	Heidolph
pH-Meter	Knick
Semi-Dry-Blotter Trans Blot® SD	Bio-Rad
Schüttler	Gerhard
Stromquelle für Western Blot	Amersham Pharmacia Biotech

3. MATERIALIEN UND METHODEN

(Powerpack)

Thermocycler T-Gradient	Biometra
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Ultra Thorax	
Tissue Sectioner	Sorvall
UV-Spektrometer U-2000	Hitachi
Vortex-Mixer VF2	Janke & Kunkel, Staufen
Waage	Satorius
Wasserbad	Kötermann

Hemmstoffe

GeneAssist TM siRNA	Applied Biosystem
Workflow Builder	

Kits

ECL Advance TM Western Blotting	Amersham Biosciences
Detection Kit	
TaqMan [®] Universal Master Mix	Applied Biosystems

Lösungen und Puffer

Zellkultur

PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,2

8,0 g NaCl (136 mM)

0,2 g KCl (2,7 mM)

0,24 g KH₂PO₄ (1,8 mM)

1,44 g Na₂HPO₄ (10 mM)

Ad 1 L mit H₂O (bidest), autoklavieren

cDNA-Herstellung

DNase-Puffer pH 8,0

3. MATERIALIEN UND METHODEN

400mM Tris-HCl

100 mM MgSO₄

10mM CaCl₂

Western Blot

Elektrodenpuffer pH 8,2-8,3

15,2 g Tris

72 g Glycin

5 g SDS

Ad 5 L mit H₂O (bidest)

Gelpuffer I pH 8,8

1,5 M Tris/HCl

0,4% SDS

Gelpuffer II pH 6,8

0,5 M Tris/HCl

0,4% SDS

Lysispuffer pH 7,8

50 mM Tris

100 mM NaCl

5 mM EDTA

1% Triton-X-100

2 mM Vanadat (erst kurz vor Gebrauch zugeben)

SDS-Probenpuffer

0,23 g SDS in 7,25 ml H₂O lösen

1,25 ml Gelpuffer I

1 ml Glycerin

20 mM DTT

3. MATERIALIEN UND METHODEN

Transferpuffer pH 9

25 mM Tris

192 mM Glycin

10% Methanol

TBS-T (Tris-Buffered Saline Tween), pH7,5

unsteril

550 mM Tris

150 mM NaCl

1 mM EDTA

0,1% Tween

Medien

Astrozytenmedium: DMEM Gibco BRL Invitrogen

FKS (Foetal Bovine Serum) PAA

OPTI-MEM®I Reduced Gibco BRL Invitrogen

Serum Medium

TaqMan®-Primer-Probes

Alle TaqMan®-Primer-Probes von Applied Biosystems

Primer	ID-Nummer	Sequenz (Probe)
hGAPDH	Hs99999905_m1	GGGCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTT
hMMP19	Hs00275699_g1	GGATCCAGGCTCTCTATGGCAAGAA

Verbrauchsmaterial

Abdeckfolie Sarstedt

Deckgläschen Assistent

Kryoröhrchen CryoTube™ Vials Nunc

Membranen mit 7µm Porengröße Neuro Probe Inc.

Petrischalen Sarstedt

3. MATERIALIEN UND METHODEN

PVDF-Membran Hybond-P	Amersham Biocience
Realtime-PCR-Platten	Sarstedt
Schlauchfolie	Eydam
Whatman-Papier (Western Blot)	Bio-Rad
Zellkulturflaschen	Sarstedt
Zellkulturplatten (6-Well)	TPP
Zellschaber	TPP
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt

Wachstumsfaktoren und Zytokine

Alle eingesetzten Proteine rekombinat und von humaner Sequenz.

Substanz	Firma
EGF	Immunotools, Friesoyte
bFGF	Immunotools, Friesoyte
IGF	Immunotools, Friesoyte
TNF α	Immunotools, Friesoyte
IFN γ	Immunotools, Friesoyte
TGF β	Immunotools, Friesoyte
Interleukin-1 β	Immunotools, Friesoyte
Interleukin-6	Immunotools, Friesoyte
Interleukin-15	Immunotools, Friesoyte
Glutamin	Immunotools, Friesoyte

Zelllinien, Gewebe und Gewebsschnitte, RNA-Sammlung

Bezeichnung	Zellart	Herkunft
HUVEC	Primäre Endothelzellen (Nabelschnur)	PromoCell GmbH, Heidelberg
U118	Gliomazelllinie	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
U138	Gliomazelllinie	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
U343	Gliomazelllinie	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
A761	Gliomazelllinie	Aus Glioblastomen kultiviert, Anatomisches Institut und Neurochirurgie UK-SH, Kiel
A764	Gliomazelllinie	
A767	Gliomazelllinie	
A772	Gliomazelllinie	
THP-1	Monozytäre Zelllinie	National Institutes of Health Bethesda
C28/I2	Chondrozyten-Zelllinie	Dr. Mary B. Goldring, Harvard Institutes of Medicine, Boston

Gewebeproben und Gefrierschnitte

Humane Tumorgewebeproben wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. Janka Held-Feindt aus der Neurochirurgie der Universität Kiel zur Verfügung gestellt. Sie stammen von erforderlichen Resektionen und wurden mit dem Einverständnis der Ethikkommission der Universität Kiel und entsprechend den ethischen Standards der Helsinki-Vereinbarung von 1975 verwendet. Gewebeproben aus Normalhirngewebe stammen aus operativ entfernten hämorrhagischen Regionen. Gefrierschnitte von Glioblastomen und Normalhirn wurden von Dr. Heinz-Hermann Hugo aus der Neurochirurgie der Universität Kiel bereitgestellt.

3.2 Methoden

3.2.1 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Auftrennung von Proteingemischen gekoppelt mit dem Nachweis einzelner Proteine. Dabei wird das Prinzip der Elektrophorese genutzt, das heißt, die Moleküle bewegen sich in einem elektrischen Feld, und zwar je nach Molekulargewicht unterschiedlich schnell. Die Proteine werden dann auf eine Transfermembran übertragen, auf der einzelne Proteine mittels Antikörperreaktion qualitativ und quantitativ sichtbar gemacht werden können.

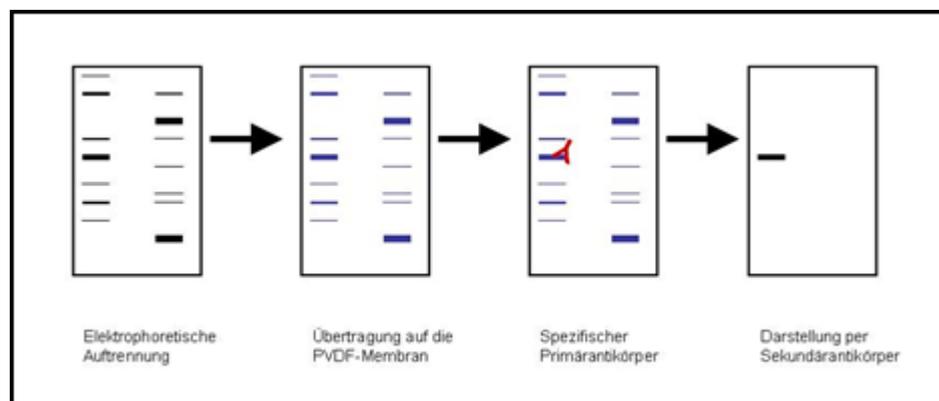


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Methode des Western Blots

Gewinnung von Zelllysaten und –homogenaten

Für den Western Blot müssen Zellen oder Gewebe in Homogenate, bzw. Lysate verarbeitet werden. Dazu werden Zellen auf Kulturflaschen ausgesät, welche dann zur Ernte zweimal mit kaltem PBS gewaschen werden. Nach Zugabe von vorgekühltem Lysispuffer erfolgt eine 30minütige Inkubation auf Eis. Die Zellen werden dann mit einem Zellschaber abgekratzt und in ebenfalls vorgekühlte, sterile Eppendorfgefäße überführt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt von 1200 g und 5 min bei 4°C, danach wird der Überstand in ein neues

Eppendorfgeläß überführt. Nach der sich anschließenden Proteinbestimmung werden je genau 50 µg in 200 µl SDS-Probenpuffer verdünnt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Proben eignen sich nun für den Western Blot oder können bei -20°C eingefroren werden.

Proteinbestimmung nach Bradford

Um den Proteingehalt einer Lösung zu bestimmen, wird diese photometrisch gemessen. Für die Messung werden jeweils 5 µl der Proteinprobe mit 795 µl Wasser (bidest) verdünnt und 200 µl des Bradford-Reagenz wird hinzugegeben. Nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur bestimmt man die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Proteinmenge ergibt sich nach Vergleich mit einer BSA-Standardlösung wie folgt:

$$\text{OD}_{595}(\text{Probe}) / \text{OD}_{595}(\text{Standart}) \times 2 = \text{Proteingehalt in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen anhand des Molekulargewichtes. Die Glasplatten für die Gelelektrophorese werden zunächst mit 70%igem Ethanol gereinigt und in die Gießrahmen eingespannt. Das Trenngel (siehe Tabelle) wird in einem Plastikgefäß vorbereitet, zügig zwischen die Glasplatten gefüllt (ca. 3/4 der Gesamthöhe) und mit Isopropanol überschichtet um eine glatte Abschlußkante zu erzielen und ein Austrocknen zu verhindern. Nach etwa 30 Minuten wird das Isopropanol entfernt, und das Sammelgel (siehe Tabelle) zubereitet und zwischen die Glasplatten bis zum Rand gegeben. Mit Hilfe eines Kammes, der sofort in das noch flüssige Sammelgel gesteckt wird, werden Taschen für die Probenauftragung modelliert. Nachdem diese Taschen mit Hilfe einer sehr dünnen, stumpfen Kanüle mit Wasser gespült wurden, können die Gele in die Elektrophoresekammer gegeben und die Taschen mit je 20 µl Probe befüllt werden. Eine äußere Tasche wird jeweils mit 5-10 µl eines Markers bestückt, der vorgefärbte Proteine bestimmter Größe enthält, und so der späteren Größenbestimmung dient. Sowohl Geltaschen als auch das innere Kompartiment der Kammer werden nun vollständig mit Laufpuffer befüllt. Als Lauffrontmarker wird ein Tropfen einer gesättigten Bromphenolblau-Lösung in die innere Kammer gegeben. Die Gelelektrophorese erfolgt bei max. 400 V für etwa 40 Minuten, bis der Lauffrontmarker unten aus dem Gel läuft.

	Trenngel 10%	Sammelgel 4,5%
Gelpuffer I	2,6 ml	
Gelpuffer II		2.6 ml
Acrylamid+Bis-Lösung	3,35 ml	1,7 ml
Wasser (bidest)	4,05 ml	5,8 ml
APS (10%)	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl

Proteintransfer („Semi-Dry Blot“)

Die im Gel aufgetrennten Proteine werden mittels Semi-Dry Blot-Technik auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese PVDF-Membran wird zunächst auf Gelgröße zugeschnitten und für etwa 5 Minuten in 100% Methanol aktiviert, damit sie den Puffer aufzunehmen kann. Danach wird die Membran ebenso wie vier „Blotting“papiere (Whatman-Papiere) in dem Transferpuffer äquilibriert (ca. 10 min auf Schüttler). Für den Aufbau im „Blotting“apparat ergibt sich nun folgende Reihenfolge: Auf die sich unten befindende Anode werden zwei Whatman-Papiere gelegt, darauf die PVDF-Membran, darüber das SDS-Gel (nur das Trenngel). Über das Gel werden wiederum zwei Whatman-Papiere gelegt, bevor die Kathode den Aufbau abschließt. Die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgt bei einer maximalen Spannung von 25 V. Nach 60 Minuten wird der Stromfluss beendet.

Proteindetektion

Um die aufgetrennten und geblotteten Proteine darzustellen, werden zwei Antikörper verwendet. Der Primärantikörper bindet an das gesuchte Protein, der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und sorgt für eine Reaktion, in der Licht emittiert wird. Um zu verhindern, dass die Antikörper an unspezifischen Proteinbindungsstellen reagieren, wird zunächst eine Blockierung durchgeführt: Die Membran wird in ein Gefäß mit Blockierungslösung (2,5% ECL Advance™ blocking agent in TBS-T) gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Der Primärantikörper wird in 5%iger BSA-Lösung verdünnt. Jede Membran wird mit einem Milliliter dieser Lösung in eine Schlauchfolie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Membranen dreimal mit TBS-T für 10 Minuten gewaschen. Der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper wird in TBS-T verdünnt und für ein Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Die Detektion wird mit Hilfe des ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit durchgeführt. Es enthält zwei Komponenten: Das Substrat Luminol für die Meerretticheroxidase und Phenole. Das Luminol wird in Gegenwart von Wasserstoffperoxid oxidiert und gerät so in einen energetisch höheren Zustand. Bei der Rückkehr in den

ursprünglichen Zustand wird Energie in Form von Licht frei gesetzt, welches dann einen sensiblen Film belichtet. Die Phenole verstärken und verlängern diesen Effekt. Die beiden Komponenten des Kits werden in gleichem Verhältnis zueinander gemischt und gleichmäßig auf den „Blots“ verteilt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur, werden die „Blots“ in dünne Folie geschlagen und überschüssige Flüssigkeit wird herausgestrichen. Die „Blot“membranen werden nun in eine Filmkassette gelegt und fest geklebt. In der Dunkelkammer wird ein sehr sensitiver Film für ca. zwanzig Sekunden aufgelegt. Er wird danach im Entwicklerbad für einige Minuten entwickelt, im Wassertank kurz gespült und fixiert.

3.2.2 Realtime-RT-PCR

Die Realtime-RT-PCR (Realtime-Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) dient der indirekten Quantifizierung der mRNA-Menge eines bestimmten Gens. Damit lassen sich Aussagen zur Expressionsrate in verschiedenen Zellen oder Geweben machen.

Isolierung der RNA

Um die unten beschriebene Realtime-RT-PCR durchführen zu können, muss zunächst die zu untersuchende mRNA aus dem Gewebe bzw. den Zellen isoliert werden. Dazu werden etwa 50-100 mg Gewebe jeweils mit 1ml Trizol versetzt, „gepottert“ und bei 4 °C und 800 g etwa 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird überführt und mit 200 µl Chloroform und 1 ml Trizol versehen. Nach kurzem Schütteln werden die Proben bei Raumtemperatur 2-3 Minuten inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 4 °C und 1200 g. Durch die Zentrifugation bilden sich drei Phasen: eine untere Phenol- und Chloroformhaltige rote Phase, eine weiße Zwischenphase und eine farblose wässrige Phase, die sich oben befindet. Diese wässrige Phase, die die RNA enthält, wird abgezogen, die anderen beiden Phasen verworfen. Nach Überführung in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß wird der wässrige Überstand mit 500 µl Isopropanol versetzt, kurz geschwenkt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Proben mit einem Vortex-Mixer gemischt und erneut 10 Minuten bei 4 °C und 1200g zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und die RNA als gelartiges Pellet an der Wand des Eppendorfgefäßes mit 1 ml Ethanol versehen. Es wird mit einem Vortex-Mixer gemischt und 5 Minuten bei 7600 g und 4 °C zentrifugiert. Danach wird der Überstand wieder verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur dehydriert. Das trockene Pellet wird dann in RNase freiem Wasser gelöst (je nach Pelletgröße etwa 50 µl). Diese RNA-Lösung wird zum Abschluss 10 Minuten bei 58 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wird zur Bestimmung des RNA-Gehaltes ein Absorptionsspektrum von 240-300 nm gegen Wasser bidest im Photometer gemessen (Verdünnung 1:100). Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei 260 nm, wobei eine Absorption von $A_{260\text{ nm}}=1$ einer RNA-Konzentration

von 41,2 µl/ml entspricht (Sambrook et al., 1989). Die Reinheit der Probe ergibt sich aus dem Quotienten OD260/ OD280; er sollte über 1,8 liegen.

Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA

Um die isolierte RNA bei der PCR einzusetzen, muss sie zunächst in DNA umgewandelt werden. Dies ist mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase möglich. Es werden jeweils Proben mit genau 1 µg RNA-Gehalt mit RNase freiem Wasser auf 7 µl aufgefüllt. Zur Entfernung von eventuellen DNA-Verunreinigungen werden zunächst 1 µl DNase-Puffer (400mM Tris-HCl, 100 mM MgSO₄, 10mM CaCl₂, pH 8) und 1 µl DNase (1 unit/µl) hinzugegeben, dieser Ansatz wird 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Unmittelbar danach wird 1 µl EDTA-Lösung (20 mM) hinzugegeben und die Proben für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt, um so die DNase zu inaktivieren und die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen. Die Proben werden danach in Eis abgekühlt und nach Zugabe von 0,2 µg Randomhexamerprimer 5 min bei 70 °C inkubiert. Abermals unter Eiskühlung werden nun je Probe ein Mastermix aus 4 µl 5x Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl, 259 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT, pH 8), 2µl dNTP-Mix (10 mM) und 1µl Wasser hinzugegeben und anschließend 5 min bei 25 °C inkubiert. Schließlich wird jeweils 1 µl Reverse Transkriptase hinzugegeben und im Thermocycler wie folgt inkubiert: 10 Minuten bei 25 °C, 60 Minuten bei 42 °C und 10 Minuten bei 70 °C. Die so generierte cDNA wird bis zur Durchführung der RT-PCR bei -20 °C gelagert.

Realtime-PCR

		Dauer	Temperatur
Initiation	1. Inkubation	2 min	50°C
Initiation	2. Aktivierung	10 min	95°C
40 Zyklen	3. Denaturierung	15 sec	95°C
40 Zyklen	4. Annealing	1 min	60°C

Tabelle 3: Abfolge der Realtime-PCR

Auswertung:

Die so genannte TaqMan®-Sonde ist eine Detektionssonde, also ein kurzes DNA-Stück, das sich während eines PCR-Zyklus an den cDNA-Strang bindet. Die Fluoreszenz des 5'-Endes bleibt zunächst durch einen sogenannten Quencher am 3'-Ende unterdrückt und kommt erst zum Tragen, wenn die Taq-DNA-Polymerase die Sonde spaltet. Somit erhöht sich nach jedem DNA-Syntheszyklus die Intensität der Fluoreszenz, die sich somit proportional zur DNA-Konzentration verhält. Der CT-Wert (Threshold Cycle) gibt an, nach wie vielen Zyklen die Fluoreszenz einen gewissen Schwellenwert überschritten hat. Er ist

also umso größer, je niedriger die Konzentration der cDNA ist. Da sich im optimalen Fall die Fluoreszenz nach jedem Zyklus verdoppelt, zeigt ein CT-Wert, der um eine Einheit geringer ist, die doppelte Menge an ursprünglicher cDNA bzw. mRNA an. Bezieht man den CT-Wert eines Gens auf ein bestimmtes Referenzgen, lassen sich Aussagen zur relativen Genexpression treffen (relative Quantifizierung). Als Referenz dient hier das „housekeeping“-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches sich durch eine recht konstante Expression auszeichnet. Aus den Ergebnissen der Mehrfachbestimmungen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet. Es ergibt sich:

$$\Delta\text{CT-Wert(Gen)} = \text{CT (Gen)} - \text{CT (GAPDH)}.$$

3.2.3 Zellkultur und Stimulationsexperimente

Humane Gliomazellen der Linie U343 werden ausgesät und schließlich in 37 °C warmem DMEM-Medium gewaschen (dreimal 20 Minuten). Die Stimulation erfolgt mit rekombinanten Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die mit einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt werden, sowie einer 5 mM Glutamatlösung ebenfalls in DMEM. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C wird das Medium abgenommen und die Zellen lysiert. Die RNA wird isoliert und mittels RT-PCR quantifiziert.

Methoden der Zellkultur werden nach üblichen Standardverfahren durchgeführt: Die Astrozytenzellen werden in entsprechendem Medium (10% FKS in DMEM), 5% CO₂-Druck und gesättigter Luftfeuchtigkeit in unterschiedlich großen Flaschen kultiviert. Bei vollständiger Konfluenz werden die Zellen subkultiviert oder für Versuche ausgesät. Zur Bestimmung der Zellzahl werden je 30 µl Zellsuspension und Trypanblau in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und in ihr die Zellzahl bestimmt.

3.2.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis bestimmter Proteine in Gewebe. Dazu wurde in diesem Fall eine indirekte Immunhistochemie durchgeführt. Das heißt, ein erster Antikörper (Primärantikörper) richtet sich gegen das zu untersuchende Antigen und ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper), der fluoreszierende Eigenschaft besitzt, richtet sich gegen die Spezies, aus der der Primärantikörper stammt.

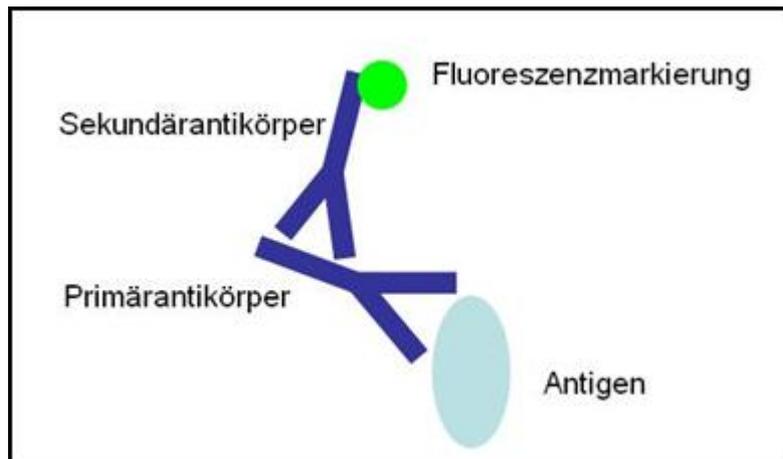


Abbildung 4: Prinzip der indirekten Immunreaktion

Als Material dienen verschiedene Gewebsschnitte, die zunächst auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet werden. Dann erfolgt eine Fixierung von 10 Minuten in einem eiskalten Aceton/Methanol-Gemisch (1:1). Anschließend wird dreimal 10 Minuten mit TBS-T gespült. Für die Blockierung von Eigenfluoreszenz des Gewebes folgt eine Blockierung mit Sudanschwarz. Dazu wird zunächst in 20%igem und dann in 70%igem Ethanol für jeweils 2 Minuten inkubiert. Anschließend wird das in 70%igem Ethanol gelöste Sudanschwarz für 10 Minuten auf die Proben gegeben, und danach mit 70%igem Ethanol so lange gewaschen, bis sich keine Farbwolken mehr lösen. Der Übergang zu TBS-T erfolgt wiederum über einen Schritt in 20%igem Ethanol für 2 Minuten. Es wird dreimal für 10 Minuten in TBS-T gespült, bevor die Schnitte zur Blockierung von unspezifischen Bindungen mit 0,1% BSA/ 0,2% Glycin in TBS mindestens eine Stunde inkubiert werden. Bei der Färbung von Normalhirnschnitten wird die Blockierungslösung zusätzlich mit Saccharose versehen. Die Primärantikörper werden in TBS-T verdünnt (alle 1:100, außer MMP19 1:500) und je 100 µl auf einen Schnitt gegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag werden die Schnitte dreimal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, anschließend wird der ebenfalls in TBS-T verdünnte Sekundärantikörper (1:1000) aufgetragen. Die Inkubation erfolgt in einer feuchten Kammer für eine Stunde bei 37 °C. Alle nun folgenden Schritte werden in Dunkelheit durchgeführt um ein frühzeitiges Verblässen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Nach einmaligem Waschen mit TBS-T erfolgen zwei Waschschrte mit TBS, jeweils für 10 Minuten. Anschließend wird zur Färbung der Kerne für 30 Minuten mit verdünntem DAPI (1:30 000 in PBS) inkubiert. Es schließen sich erneut drei kurze Waschungen mit TBS und eine mit destilliertem Wasser an. Abschließend werden die Schnitte mit Immunomount eingedeckelt und bei Dunkelheit und 4°C gelagert. Sie können mit einem speziellen Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

3.2.5 Migrationsversuche

Um die Bedeutung bestimmter Gene und deren Proteinprodukte abschätzen zu können, werden diese Gene beeinflusst, und die so entstandenen unterschiedlichen Zelltypen oder Klone in ihrem Verhalten beobachtet. Für diese Arbeit wurden Zellen mit einer hohen Expressionsrate von MMP19 (U118-Zellen) mit dem Verfahren der transienten Transfektion so verändert, dass sie MMP19 nur noch in einem sehr geringen Ausmaß exprimieren konnten. Das Verhalten der so entstandenen Zellen wurde sowohl an beschichteten Membranen als auch in Gewebe beobachtet und mit den nicht transfizierten Zellen verglichen.

Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion ist eine Methode, Stoffe in lebende Zellen zu schleusen, die die Expression bestimmter Proteine manipulieren können. In diesem Fall wird Si-RNA eingesetzt, wodurch den Zellen vorübergehend die Fähigkeit entzogen wird, ein bestimmtes Protein (MMP19) zu exprimieren. Für die Transfektion kommt das Prinzip der lipidvermittelten Einschleusung durch die Zellmembran zum Tragen, bei der die zu transfizierende RNA mit kationischen Lipiden einen Komplex bildet, und von der Zelle aufgenommen wird. Die Si-RNA wird genau wie 3 µl Lipofektin mit je 1 ml OPTI-MEM®-Medium in eine 6-Lochplatte gegeben und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem beide Ansätze vereinigt wurden, werden diese Transfektionsansätze wiederum 15 Minuten stehen gelassen und danach auf die in kleinen Flaschen angewachsenen Zellen gegeben. Die Transfektion erfolgt bei 37 °C über 24 Stunden. Danach können die Zellen entweder zur RNA-Isolierung in Trizol gegeben oder für Migrationsversuche weiter verwendet werden.

Mikrochemotaxis

Um zu untersuchen, wie gut verschiedene Zellen bestimmte Substrate zersetzen können und wie dies ihre Fähigkeit zur Migration beeinflusst, werden Versuche in einer so genannten Boyden-Kammer durchgeführt. Diese Kammer besteht aus zwei Acrylblöcken mit jeweils 48 Vertiefungen. Zwischen diese beiden Blöcke wird eine Membran gespannt, so dass zwei Kompartimente entstehen. Bei der Membran handelt es sich um eine Polycarbonat-Membran mit einem Porendurchmesser von 7µm. Sie wird zur Vorbereitung für 20 Minuten in Eisessig entfettet, mit destilliertem Wasser gespült und anschließend unter sterilen Bedingungen getrocknet. Zur Beschichtung dienen verschiedene Extrazellulärsubstanzen, die zunächst mit A-Medium verdünnt (1:3) und dann für 1 bis 2 Stunden auf die Membranen gegeben werden. In das untere Kompartiment der Boyden-Kammer wird A-Medium mit 10% FCS gegeben, das als chemotaktischer Stimulus dient. Es wird jeweils so viel Volumen eingesetzt, dass

beim anschließenden Auflegen der Membran keine Luftblasen entstehen können (28,5µl). Nachdem die Filtermembran, mit der beschichteten Seite nach oben gewandt, aufgelegt ist, folgen die Silikondichtung und der obere Acrylblock. Die Kammer wird nun mit Hilfe von Schrauben fixiert und für 30 Minuten bei 37 °C äquilibriert. Die für den Versuch vorbereiteten Zellen werden in DMEM mit Glutamin so verdünnt, dass jeweils 100 000 Zellen in einem Volumen von 50 µl in die oberen Vertiefungen gegeben werden können. Die Inkubation der vollständig befüllten Kammer erfolgt bei 37 °C für 1,5 Stunden. Danach wird die Membran entnommen und für 15 Minuten in 100%igem Methanol fixiert. Anschließend folgt eine kurze Spülung mit destilliertem Wasser und eine 30minütige Färbung in Hämalaunlösung, welche vorher filtriert wird. Die Membranseite, an der sich keine Zellen befinden, wird mit Wasser benetzt, dann werden die Membranen getrocknet und mit Gelatine und Deckgläschen auf Objektträgern fixiert. Die Auswertung erfolgt am Computer: Die Objektträger werden gescannt und mit Hilfe des Computerprogramms PCBAS wird die Farbintensität jedes einzelnen „Spots“, der von den Zellen erzeugt wurde, bestimmt. Die Farbintensität entspricht dabei der Menge der Zellen, die an der Unterseite der Membran angelangt sind, und macht somit quantitative Aussagen möglich.

Färben von Zellen

Um Zellen und ihr Verhalten in Gewebe zu differenzieren und zu beurteilen, kommt wie schon bei der Immunhistochemie die Methode der Immunfluoreszenz zum Tragen. Dafür müssen die eingesetzten Zellen zunächst gefärbt werden. Zu Beginn werden die Zellen ausgezählt, anschließend wird die Zellzahl auf 2×10^7 / ml in PBS eingestellt. Die Farbstoffe werden wie folgt angesetzt: 500 µg Farbstoff werden in 80 µl DMSO (roter Farbstoff) bzw 90 µl DMSO (grüner Farbstoff) gelöst und je 10 µl Aliquot in 10 ml PBS gegeben. Jeweils gleich große Volumen an Farbstofflösung und Zelllösung werden zusammen bei 37 °C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wird im Verhältnis 1:1 FKS hinzu gegeben und bei 1000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend entfernt und das entstandene Pellet resuspendiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Danach wird die Lösung in eine T25-Flasche überführt und für mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Flaschenboden wird anschließend abgeschabt und die Zellsuspension in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Zum Ausspülen der Flasche werden 5 ml 10%-AB-Medium in die Flasche pipettiert und dann zu der Zellsuspension in das Röhrchen gegeben. Nachdem abermals bei 1000 g für 10 Minuten zentrifugiert wurde, wird der Überstand verworfen und das Pellet in 10%-AB-Medium aufgenommen. Die so gefärbten Zellen können nun für Migrationsversuche in Gewebe verwendet werden.

Migration in Gewebe

Um die Bedeutung von MMP19 abschätzen zu können, werden transfizierte Zellen und Kontrollzellen auf Hirngewebe von Mäusen gegeben und ihre Einwanderung beobachtet. Um sie unterscheiden zu können, werden sie zuvor mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Die Herstellung der Gehirnschnitte (750 µm) erfolgt mittels des „Tissue Sectioners“. Die Gehirnschnitte werden dann in mit 0,5 ml DMEM auf Zellkulturplatten überführt und mit gleichen Mengen Zellsuspension versetzt. Die Inkubation erfolgt bei 37° C und regelmäßigem Mediumwechsel über 48 Stunden. Die Versuche werden beendet, indem die Zellen mit einem eiskalten Aceton/Methanol-Gemisch (1:1) für 10 Minuten fixiert werden. Die Blockierung der Eigenfluoreszenz erfolgt wie oben beschrieben mit Sudanschwarz. Danach wird gründlich mit TBST gewaschen, um eventuell aufliegende Zellen zu entfernen. Die Auswertung erfolgt per Fluoreszenzmikroskop, indem die angewachsenen Zellen in den jeweiligen Schnitten gezählt werden.

3.2.6 Statistische Methoden

Zur Beurteilung der unterschiedlichen Messwerte werden Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen errechnet und angegeben. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wird ein zweiseitiger „Students-t-Test“ durchgeführt und die Signifikanz wie folgt deklariert: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

4 ERGEBNISSE

4.1 Genexpression

Im ersten Teil der Arbeit soll untersucht werden, ob und wo MMP19 in Hirntumoren und im Normalhirn exprimiert wird.

4.1.1 Expression von MMP19 in Astrozytomen

Es werden jeweils acht verschiedene Gewebeproben, die aus Astrozytomen der Grade I-III stammen, auf ihren Gehalt an MMP19-RNA untersucht und mit sechzehn Proben aus Glioblastomen sowie mit acht Proben gesunden Gehirngewebes verglichen. Alle Proben stammen von unterschiedlichen Patienten. Dazu werden Gewebekomponenten hergestellt und die RNA wird isoliert. Es werden jeweils 10 ng RNA in der Realtime-RT-PCR eingesetzt und Dreifachbestimmungen des CT-Wertes (Threshold Cycle) durchgeführt. Die Expressionsraten von MMP19 wird jeweils auf die Expressionsrate der GAPDH der jeweiligen Probe bezogen. Dadurch ergibt sich ein Δ CT-Wert für den gilt:

$$\Delta\text{CT-Wert (MMP19)} = \text{CT (MMP19)} - \text{CT (GAPDH)}$$

Da der CT-Wert im Bereich des logarithmischen Anstieges gemessen wird, entspricht ein absoluter Unterschied von 3,3 einem relativen Unterschied einer 10fach unterschiedlichen Expression. In Abbildung 3.1 sind die unterschiedlichen Δ CT-Werte und die Mittelwerte der jeweiligen WHO-Grade dargestellt.

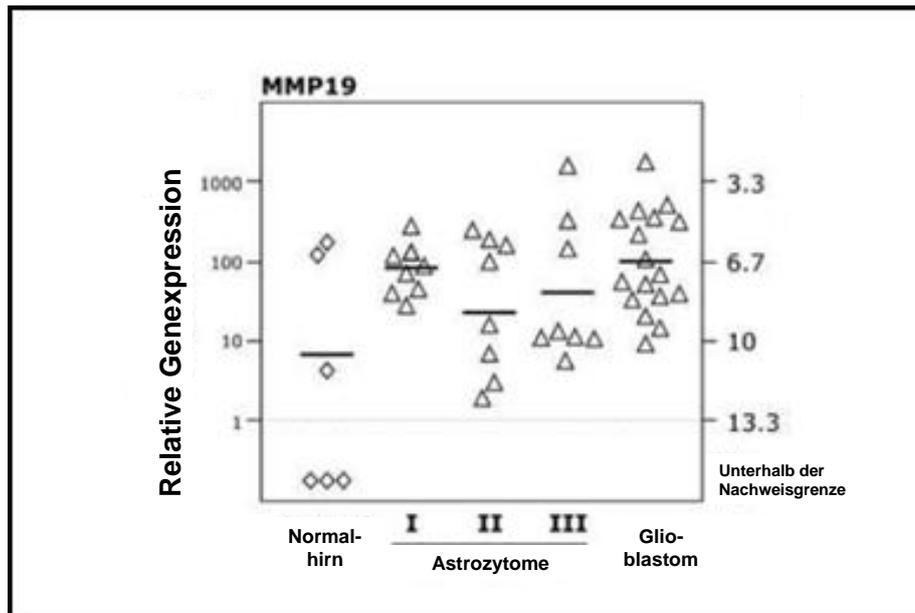


Abbildung 5: Genexpression von MMP19 in Astrozytomen, Glioblastomen und gesundem Hirngewebe.

Dargestellt sind die Δ CT-Werte der einzelnen Gewebeprobe, die daraus berechnete relative Expression sowie deren Mittelwerte. Die Werte der Glioblastome und der Astrozytome der Grade I und III unterscheiden sich deutlich von denen des gesunden Hirngewebes ($p < 0,05$), hier lag die Expressionsrate zum Teil unter der Nachweisgrenze.

In Astrozytomen aller WHO-Grade kann eine hohe Expression von MMP19 nachgewiesen werden. In gesundem, tumorfreiem Gewebe liegt die Expressionsrate hingegen in einigen Proben unterhalb der Nachweisgrenze. Eine Korrelation von MMP19-Expressionsrate und WHO-Grad kann dabei nicht gezeigt werden, jedoch gehören die Proben mit den höchsten Expressionsraten zu den Glioblastomen, welche dem Astrozytom Grad IV entsprechen.

4.1.2 Genexpression von MMP19 in kultivierten Zelllinien

Um Aussagen zur Quantität der Expression in verschiedenen Zelllinien machen zu können, werden verschiedene Glioblastomlinien und kultivierte Zellen aus soliden Tumoren mittels Realtime-RT-PCR analysiert. Es soll so bestimmt werden, welche Zelllinie sich im Weiteren für in vitro-Versuche eignet. Des Weiteren wird die Expressionsrate in Endothelzellen, Monozyten und Chondrozyten untersucht, in denen ein Vorkommen von MMP19 beschrieben ist (Kolb et al., 1999; Sedlacek et al., 1998). Die ermittelten Δ CT-Werte und die Standardabweichung sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

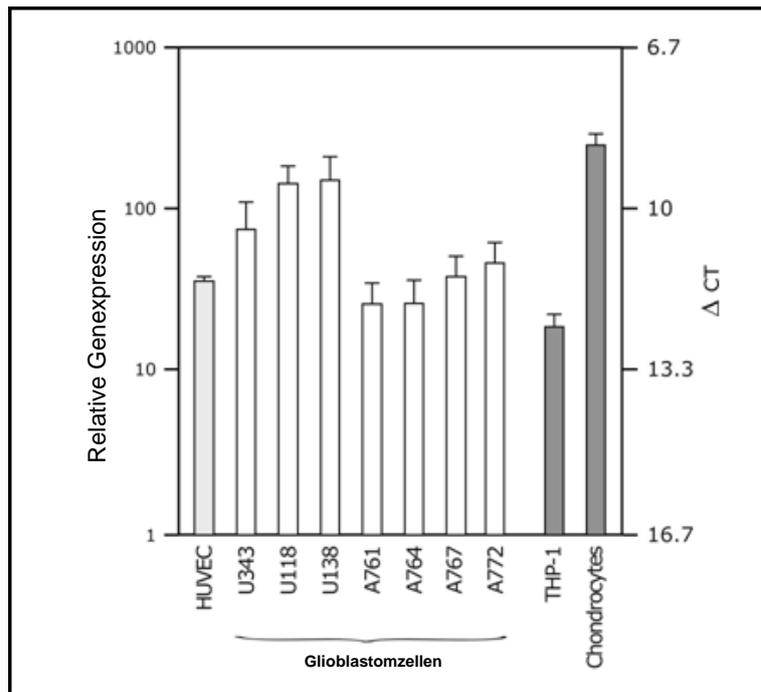


Abbildung 6: Relative Genexpression von MMP19 in verschiedenen humanen Zelllinien.

Dargestellt sind die Δ CT-Werte und die relative Expression als Mittelwerte mit Standardabweichungen aus jeweils drei Messungen. MMP19 wird in allen Glioblastomlinien auf hohem Niveau exprimiert, In allen Proben liegt die Expression höher als in THP-1-Monozyten, aber nicht so hoch wie in Chondrozyten. HUVEC= human umbilical vein endothelial cells

Die Versuche zeigen, dass MMP19-mRNA in allen Zellen nach 40 Zyklen detektierbar ist. Die Expressionsrate von MMP19 in den verschiedenen Glioblastomlinien ist dabei in etwa zu vergleichen mit der Expression in Endothelzellen (HUVEC). In einigen Zelllinien, wie z.B. U118 ist sie noch deutlich höher; diese Zelllinie wird im Weiteren für in vitro-Versuche benutzt. Der höchste Wert kann in den Chondrozyten nachgewiesen werden.

4.1.3 Regulation von MMP19

Um mehr über die Regulation der Expression von MMP19 zu erfahren, wird der Einfluss von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren untersucht. Dazu werden U118-Zellen in serumfreien Medium mit 0,1% BSA 24 Stunden mit EGF, bFGF, IGF, TNF α , IFN γ , TGF β , Il-1 β , Il-6, Il-15 und Glu stimuliert.

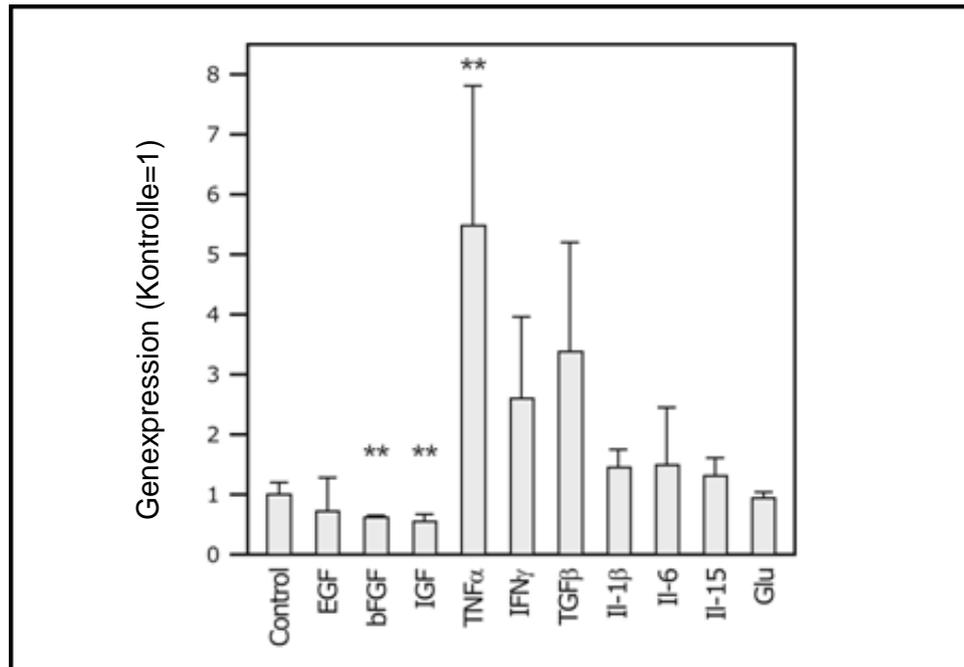


Abbildung 7: Effekte von Zytokinen und Wachstumsfaktoren.

Expressionsrate von MMP19 nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren (24 Stunden, Konzentration 10 ng/ mL, außer Glu: 5 mmol/ L). Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils drei oder fünf (Control, TGF β , IFN γ) unterschiedlichen Kulturen und die entsprechenden Standardabweichungen. Die relativen Genexpressionen und Signifianzen beziehen sich auf die Kontrolle.

Die verschiedenen Peptide werden jeweils in einer Konzentration von 10 nmol eingesetzt. Es werden je vier unabhängige Proben untersucht und eine RNA-Menge von 10 ng eingesetzt. Die Versuche zeigen, dass EGF, bFGF und IGF keinen positiven Einfluss auf die Expression von MMP19 haben, sie scheinen im Gegenteil die Expression zu supprimieren (** $p < 0,01$). Im Gegensatz dazu führt eine Stimulation mit TNF α zu einer Steigerung der Expression um das mehr als 5fache (** $p < 0,01$). Die Erhöhung der Expressionsrate bei Stimulation mit IFN γ und TGF β liegt dagegen in nicht signifikanter Höhe, ebenso bei den Interleukinen und Glutamin.

4.2 Immunhistochemie

Nachdem die ersten Versuche gezeigt haben, dass MMP19 in astrozytären Tumoren auf hohem Niveau exprimiert wird, sollen nun in situ-Färbungen von MMP19 in Tumor- und Normalhirnschnitten angefertigt werden. Dazu wird die Methode der indirekten Immunfluoreszenz angewendet, und Primärantikörper werden gegen MMP19 und zellspezifische Proteine verwendet. Dazu werden Dreifachfärbungen von Gefrierschnitten angefertigt, da in der Arbeitsgruppe im Rahmen früherer Fragestellungen gezeigt wurde, dass diese gequetschten Präparaten vorzuziehen sind. Zur Auswertung werden die

gefärbten Schnittpräparate mithilfe der konfokalen Lasermikroskopie betrachtet und fotografiert.

4.2.1 Vorversuche: Antikörperspezifität

Antikörperspezifität in verschiedenen Geweben, bzw. Zelllinien

Im Vorfeld der immunhistochemischen Versuche wird mittels Western Blot untersucht, ob der eingesetzte Primärantikörper spezifisch an MMP19 reagiert, und ob sowohl die Proform als auch die niedermolekularen anderen Formen dargestellt werden. Um die Gewebeproben der Glioblastome und des gesunden Hirngewebes zu untersuchen, werden Homogenate hergestellt; für die Untersuchung der Zelllinien werden Lysate verwendet. Der MMP19-Antikörper wird in einer Konzentration von 1:2000 verwendet, der Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1: 20 000. In dem Western Blot lässt sich erkennen, dass sich in der Probe des gesunden Gehirngewebes keine Form von MMP19 nachweisen lässt. Sie kann als Negativkontrolle betrachtet werden. In den Gewebeproben der Glioblastome ist eine starke Bande in Höhe der MMP19-Proform zu erkennen. Ob diese tatsächlich auf eine hohe Expressionsrate der Gliomzellen selbst zurück zu führen ist, oder auf die starke Vaskularisierung des Tumors, soll im Folgenden noch geklärt werden. In den Zelllinien sind verschiedene aktive kleinere Formen zu erkennen.

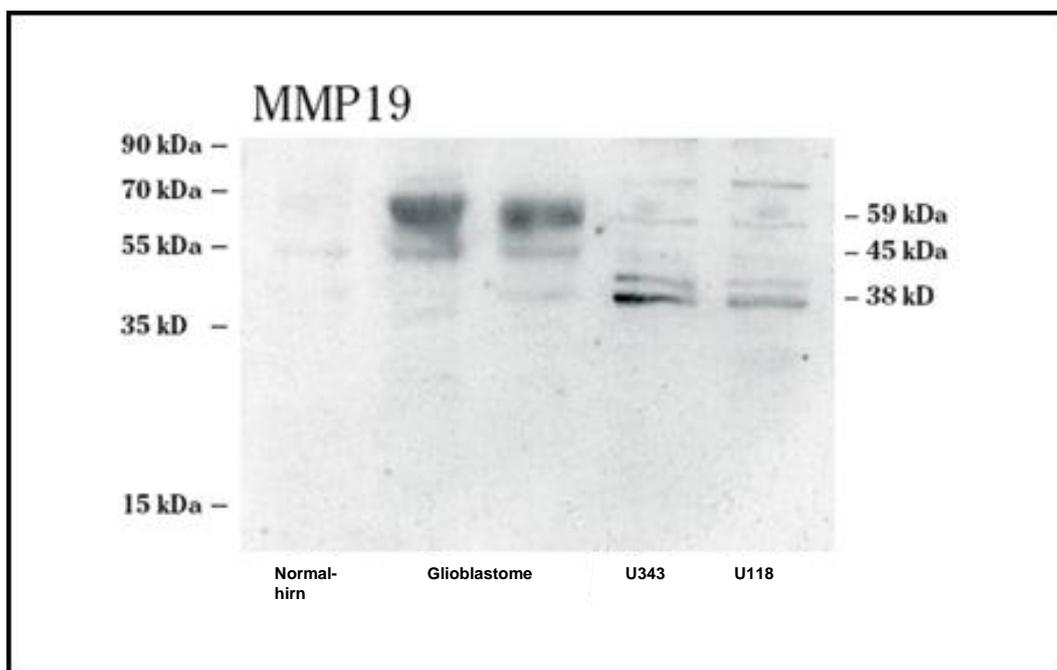


Abbildung 8: Nachweis verschiedener MMP19-Formen in unterschiedlichen Geweben, bzw. Zelllinien mittels „Western Blot“

Die Auftrennung erfolgte in einem 10% SDS-Gel. Anti-MMP19 wurde als primärer Antikörper verwendet, zur Detektion der Banden wurde ein HRP-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen Sekundärantikörper eingesetzt.

Spezifität der Sekundärantikörper

Die Spezifität der Sekundärantikörper wird in einem Vorversuch überprüft, in dem ein Glioblastomschnitt lediglich mit den Sekundärantikörpern ohne vorherige Reaktion mit den Primärantikörpern gefärbt wird. Es wird zusätzlich eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt. Die Färbung zeigt keinerlei Reaktionen der Sekundärantikörper, so dass von einer hohen Spezifität auszugehen ist.

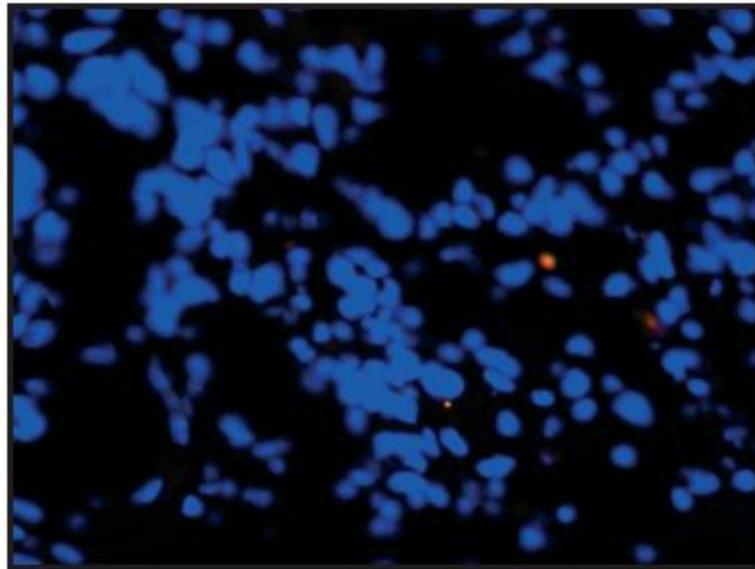


Abbildung 9: Kontrollfärbung an einem Glioblastomschnitt

Eingesetzt werden lediglich die Sekundärantikörper, um eine unspezifische Reaktion auszuschließen. Es ist zu erkennen, dass der Sekundärantikörper keine unspezifischen Bindungen eingeht. In der Abbildung ist die Kernfärbung mit DAPI zu sehen. Vergrößerung 1:400

4.2.2 Untersuchung der Kollokalisierungen von MMP19

Um mehr über die Lokalisation von MMP19 zu erfahren werden Gefrierschnitte von Normalhirn und Glioblastomen doppelt gefärbt. Es werden je ein Primärantikörper gegen MMP19, der mit dem Sekundärantikörper grün gefärbt wird, und ein Primärantikörper gegen ein anderes zellspezifisches Antigen, welcher dann rot gefärbt wird, eingesetzt. Außerdem wird stets eine Kernfärbung mit DAPI (blau) durchgeführt. Der Zellmarker GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) entspricht einem Protein der Klasse III und markiert ein Intermediärfilament, das Astrozyten in ihren Zellausläufern besitzen. Abbildung 3.5 zeigt einen für GFAP stark positiven Normalhirnschnitt, MMP19 ist in diesem Schnitt nicht anfärbbar. Es wird in gesundem Hirngewebe von den Astrozyten nicht exprimiert.

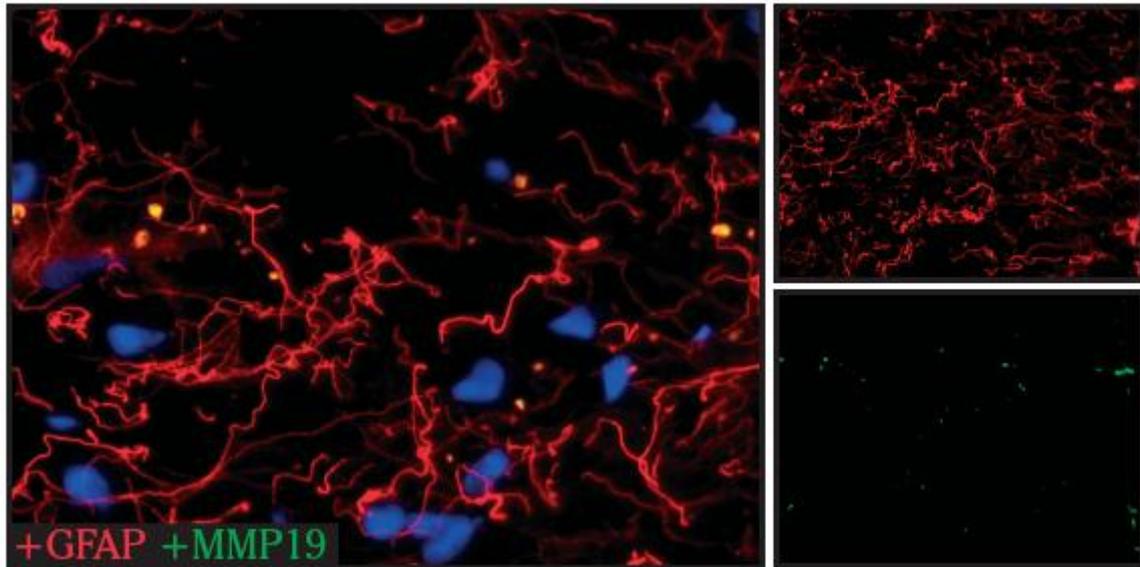


Abbildung 10: MMP19 und GFAP in Normalhirn

Immunfluoreszenzdoppelfärbung von GFAP (rot) und MMP19 (grün), sowie Kernfärbung (blau) an einem Normalhirnschnitt, Vergrößerung 1:400, MMP19 ist kaum detektierbar in GFAP-positiven Regionen.

Endothelzellen sind in situ positiv für den Zellmarker PECAM (Platelet/ Endothelial Cell Adhesion Molecule). Da Endothelzellen in den in vitro-Versuchen eine relativ hohe Expressionsrate von MMP19 aufweisen, wird ein Normalhirnschnitt mit Primärantikörpern gegen PECAM und MMP19 gefärbt. In Abbildung 3.6 ist ein Gefäßanschnitt dargestellt, der eine Kolokalisation der beiden Proteine zeigt. Da MMP19 ein sekretorisches Molekül ist, ist es extrazellulär lokalisiert und wird diffus dargestellt.

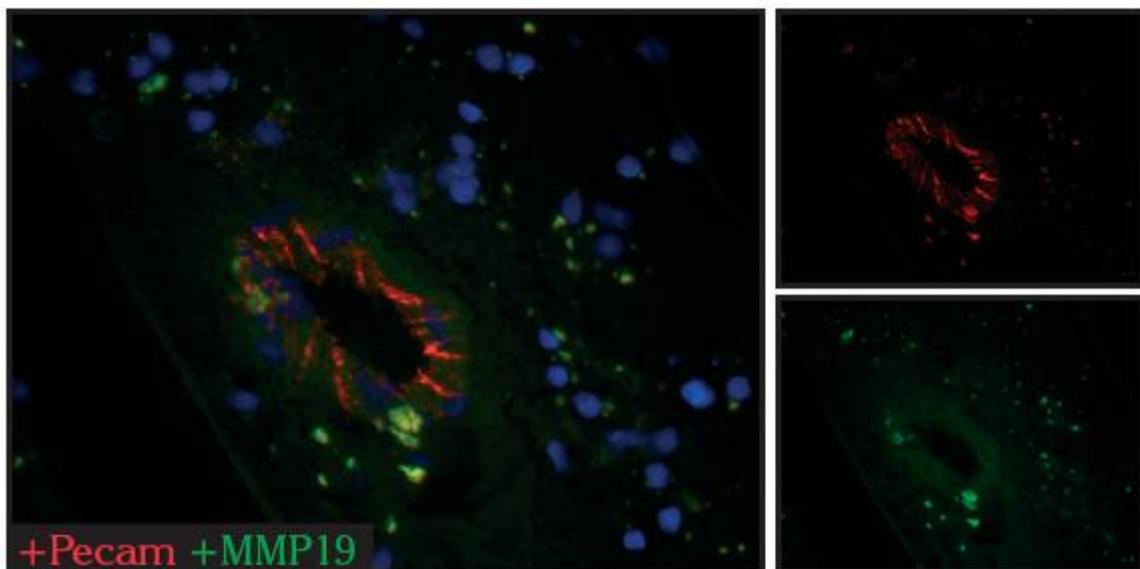


Abbildung 11: MMP19 und PECAM in Normalhirn

Immunfluoreszenzdoppelfärbung von PECAM (rot) und MMP19 (grün), sowie Kernfärbung (blau) an einem Normalhirnschnitt, Vergrößerung 1:400, MMP19 ist diffus kolokalisiert mit PECAM-positiven Endothelzellen.

Insgesamt zeigt sich wie auch schon in den Versuchen zur Expression, dass MMP19 in gesundem astrozytären Gewebe nicht vorkommt. Das Enzym ist in gesundem Hirngewebe lediglich an Zellen nicht neuronalen Ursprungs wie den Endothelzellen nachzuweisen. In den Gefrierschnitten aus Glioblastomen wurden zunächst dieselben Zellmarker eingesetzt wie bei der Analyse der Normalhirnschnitte. Die Färbungen (Abbildungen 3.7 und 3.8) zeigen, dass MMP19 ubiquitär in den Tumorarealen vorkommt.

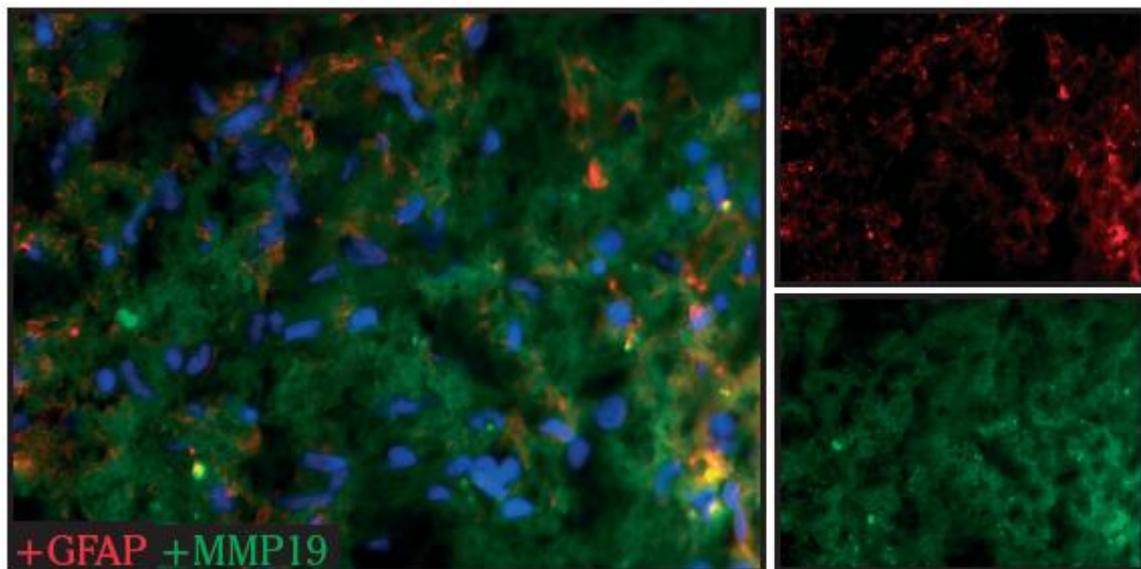


Abbildung 12: MMP19 und GFAP in einem Glioblastom

Immunfluoreszenzdoppelfärbung von GFAP (rot) und MMP19 (grün), sowie Kernfärbung (blau) an einem Glioblastomschnitt, Vergrößerung 1:400, MMP19 ist diffus überall in den GFAP-positiven Regionen zu finden.

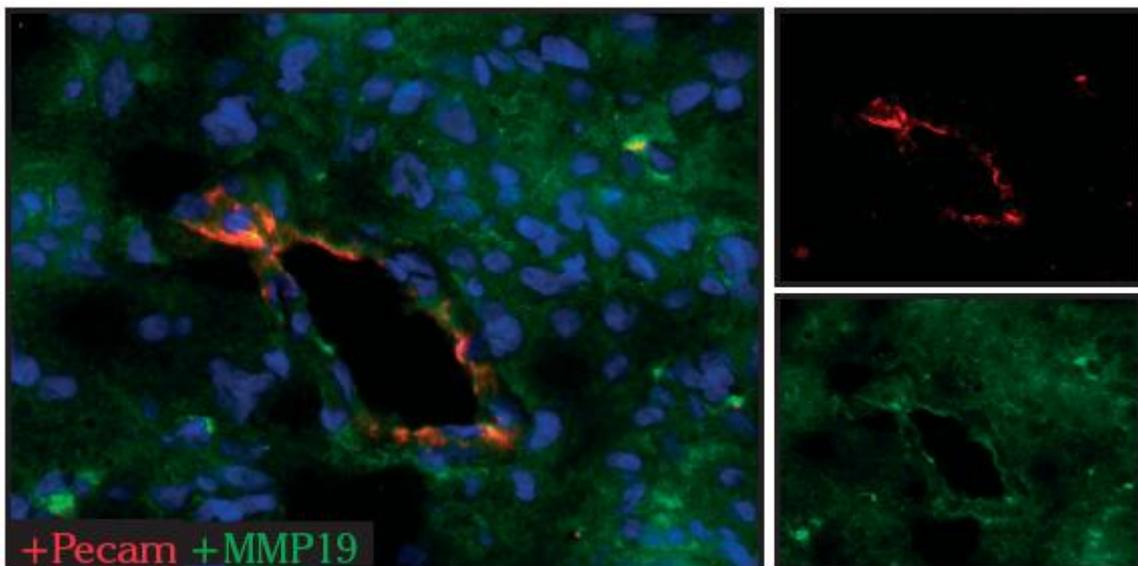


Abbildung 13: MMP19 und PECAM in einem Glioblastom

Immunfluoreszenzdoppelfärbung von PECAM (rot) und MMP19 (grün), sowie Kernfärbung (blau) an einem Glioblastomschnitt, Vergrößerung 1:400, MMP19 ist in Glioblastomen sowohl an PECAM-positiven Endothelzellen als auch im umliegenden PECAM-negativen Gewebe nachzuweisen.

MiB-1 (Made in Borstel, synonym Kiel-67) ist ein Zellmarker, der an proliferierenden Kernen positiv ist, nicht jedoch an Zellen, die sich in der G0-Phase befinden. Er wird deshalb als Marker für proliferierende Tumorzellen genutzt. Abbildung 3.9 zeigt einen Glioblastomschnitt mit mehreren MiB-1 positiven Zellen und gleichzeitig wieder ein großflächiges Vorkommen von MMP19. Sowohl proliferierende Zellen als auch solche, die für MiB-1 negativ sind, scheinen MMP19 zu produzieren.

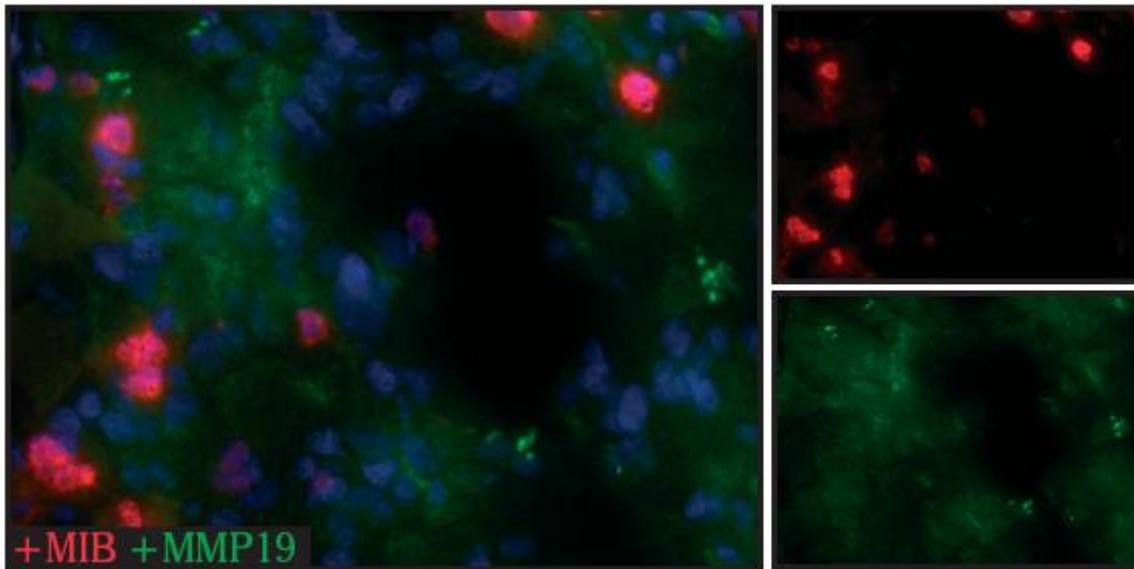


Abbildung 14: : MMP19 und MiB-1 in einem Glioblastom

Immunfluoreszenzdoppelfärbung von MiB-1 (rot) und MMP19 (grün), sowie Kernfärbung (blau) an einem Glioblastomschnitt, Vergrößerung 1:400, MMP19 findet sich diffus in der Nähe von proliferierenden Tumorzellen und in Bereichen, die umliegend MiB-negativ gefärbt sind.

Da eine Bedeutung von MMP19 in entzündlichen Prozessen beschrieben ist, soll die Lokalisation von MMP19 und Immunzellen in Glioblastomen untersucht werden. Es wurde eine Doppelfärbung von MMP19 und CD-68 (Cluster of Differentiation) durchgeführt, da CD-68 ein lysosomales Protein aktiver Makrophagen, bzw. Mikrogliazellen ist. Die Färbung zeigt, dass in Glioblastomen sowohl CD-68 positive als auch negative Zellen positiv für MMP19 sind.

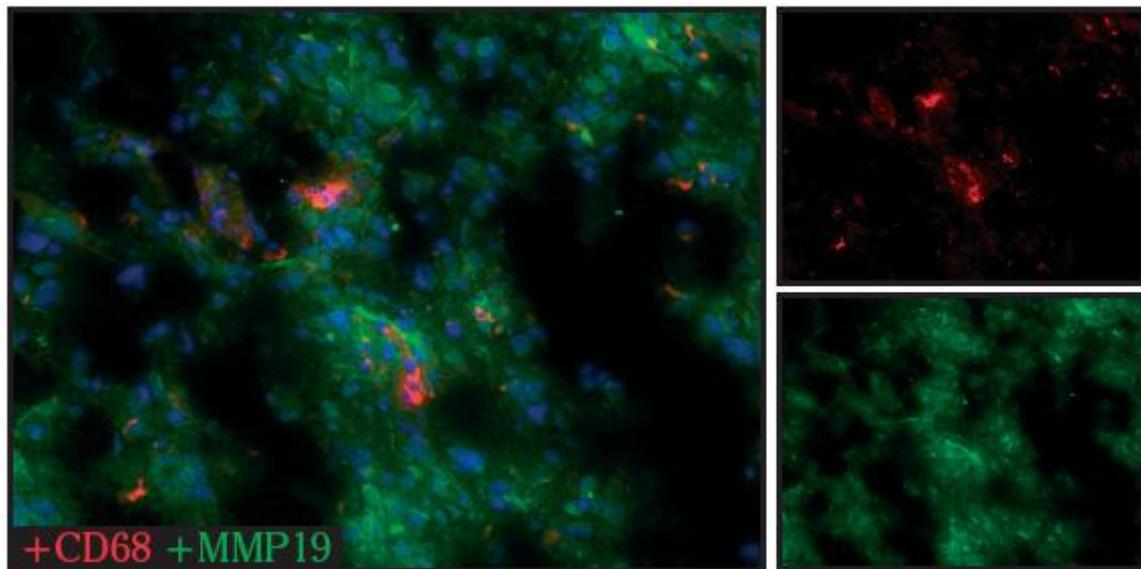


Abbildung 15: MMP19 und CD-68 in einem Glioblastom

Immunfluoreszenzdoppelfärbung von CD-68 (rot) und MMP19 (grün), sowie Kernfärbung (blau) an einem Glioblastomschnitt, Vergrößerung 1:200, MMP19 findet sich nicht nur diffus in dem gesamten Tumorgewebe sondern auch an CD-68 positiven Makrophagen, bzw. Mikrogliazellen.

4.3 Migrationsversuche

Nachdem zunächst Vorkommen, Regulation und Lokalisation von MMP19 untersucht wurden, sollen funktionelle Versuche zeigen, welche Relevanz das Vorkommen von MMP19 für Glioblastomzellen hat. Da die U118-Zelllinien eine besonders hohe Expressionsrate zeigen, werden sie in allen folgenden Versuchen eingesetzt.

4.3.1 Vorversuche: Inhibition der MMP19-Expression

Die transiente Transfektion mit spezifischen Sonden ermöglicht, die Expression von MMP19 vorübergehend zu vermindern. Dazu wird sogenannte siRNA eingesetzt, als Kontrolle dienen Zellen, die mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Weil für MMP19 kommerziell mehrere ungetestete siRNAs angeboten werden, werden zunächst drei verschiedene auf ihre Effektivität geprüft (Abbildung 3.12) und danach die optimale Konzentration bestimmt (Abbildung 3.13). Nach der Transfektion wird dazu eine RNA-Isolierung mit anschließender RT-PCR durchgeführt. Dargestellt sind die Δ CT-Werte und die Standardabweichungen.

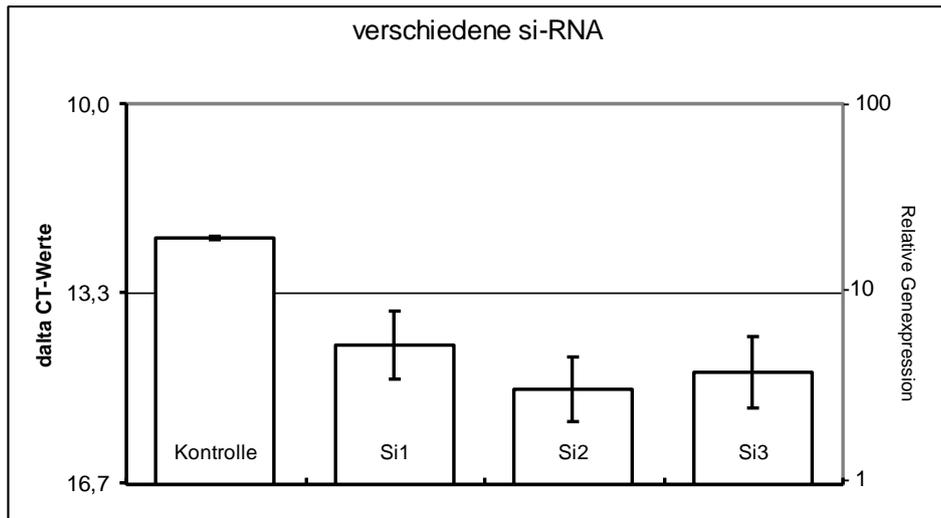


Abbildung 16: Effektivität verschiedener si-RNA

Dargestellt ist die relative Genexpression nach transientser Transfektion (Δ CT-Werte und Standardabweichungen). Als Kontrolle diente eine mit einer unspezifischen Kontroll-si-RNA transfizierte Zelllinie. Die Transfektion erfolgte bei Konzentrationen von 100 μ M und über 24 Stunden.

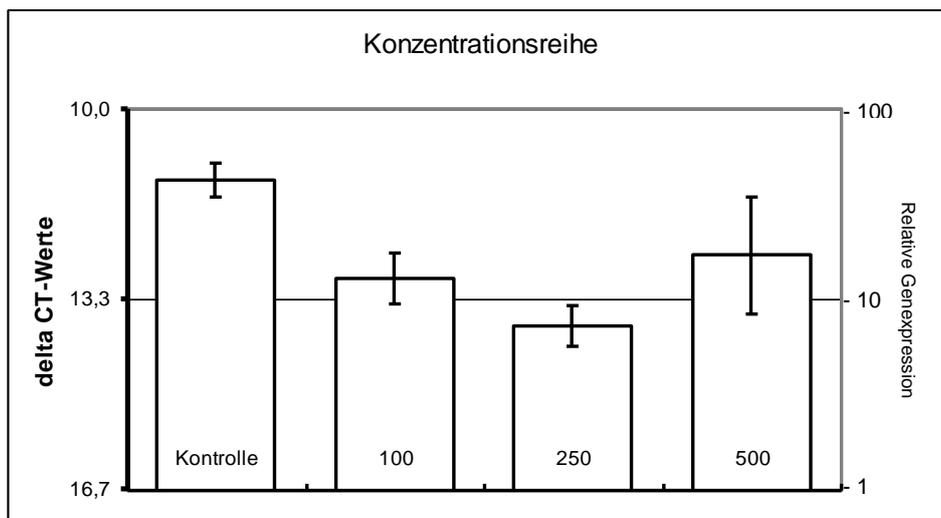


Abbildung 17: Effektivität verschiedener Konzentrationen (in μ M)

Dargestellt ist die relative Genexpression nach transientser Transfektion (Δ CT-Werte und Standardabweichungen). Als Kontrolle diente eine mit einer unspezifischen Kontroll-si-RNA transfizierte Zelllinie.

Die Versuche zeigen, dass die in der Abbildung 3.12 mit „2“ bezeichneten si-RNA die größte Effektivität besitzt. Sie kann die Expression etwa um den Faktor zehn verringern. In einem zweiten Versuch wird nur diese si-RNA in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, wobei sich eine Konzentration von 250 μ M als optimal erweist. Diese Bedingungen werden in den folgenden Migrationsversuchen eingehalten.

4.3.2 Migration nach MMP19-„Silencing“

Migration durch verschiedene Extrazellulärmatrix-Bestandteile

Membranen mit einer Porengröße von 7 μm werden mit verschiedenen Substanzen extrazellulärer Matrix beschichtet. Dann werden jeweils die gleiche Menge an mit spezifischer si-RNA- und mit einer unspezifischen Kontroll-si-RNA transfizierte Zellen über 1-2 Stunden in die Boydenkammer gegeben. Eine längere Dauer hat dazu geführt, dass jeweils alle Zellen an die Unterseite der Membran wanderten und kein Unterschied auszumachen war. Die Abbildung zeigt, dass bei dem Kontrollversuch mit einer unbeschichteten Membran kein Unterschied festzustellen ist. Bei allen anderen Beschichtungen sind deutliche Unterschiede zu erkennen: Zellen, die kein bzw. wenig MMP19 exprimieren können, wandern schlechter durch die beschichteten Membranen. Matrigel enthält eine Mischung verschiedener Proteine, die in der Extrazellulärmatrix unterschiedlicher Gewebe, insbesondere in Basalmembranen, vorkommen. Ebenso stellt Laminin einen wichtigen, aber Gewebe-unspezifischen Bestandteil von Basalmembranen dar, wohingegen Brevican eine spezifische Komponente der Extrazellulärmatrix des zentralen Nervensystems ist.

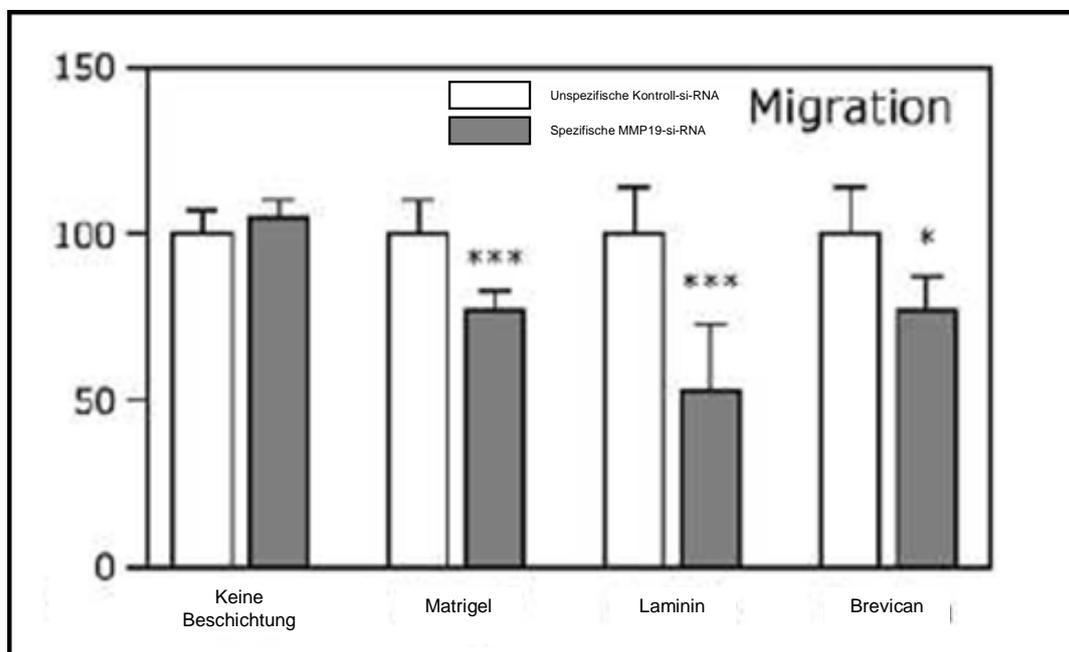


Abbildung 18: Mikrochemotaxisversuch in der Boydenkammer

Dargestellt ist die relative Menge an Zellen, die die jeweilige Membran durchwanderten. Als Kontrolle diente eine mit einer unspezifischen Kontroll-si-RNA transfizierte Zelllinie. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Einzelversuche (unbeschichtet und Matrigel jeweils 15, Laminin und Brevican jeweils fünf). MMP19-„Silencing“ reduziert die Migration durch Matrigel, Laminin und Brevican.

Migration in Gewebe

Um die Fähigkeit, in Hirngewebe einzuwachsen zu können, zu beurteilen, werden Glioblastomzellen mit normal hoher Expression von MMP19(C) und wiederum transfizierte Zellen (Si-MMP19) eingesetzt. Diese werden in gleicher Menge auf 750 µm dicke Schnitte eines frisch entnommenen Mäusegehirns gegeben. Nach drei Tagen, in denen regelmäßige Mediumwechsel stattfinden, so dass die Zellen vital bleiben, wird das Gewebe sehr gründlich gewaschen und fixiert. Anschließend wird am konfokalen Mikroskop die Zahl der eingewachsenen Zellen festgestellt. Dabei ist zu beobachten, dass tendenziell die Kontrollzellen besser in das Gewebe einwachsen können als die transfizierten Zellen.

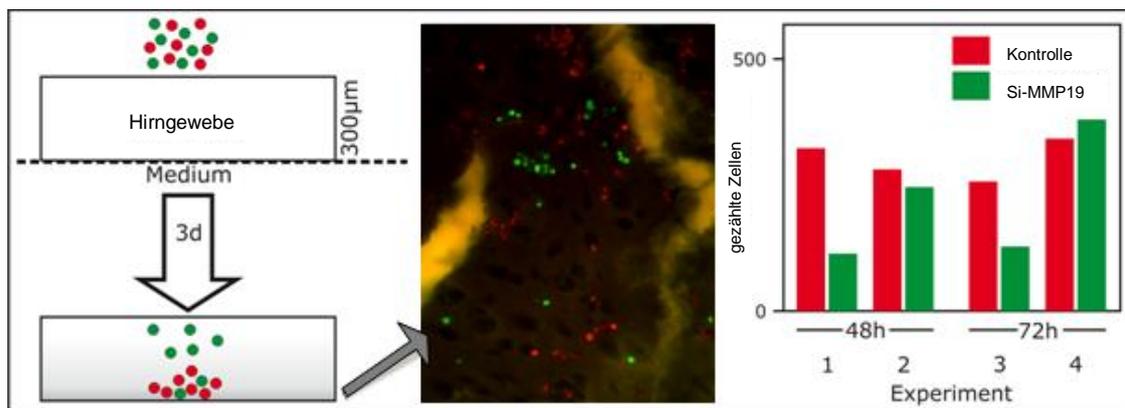


Abbildung 19: Migrationsversuch an Gehirngewebe

Die MMP19-si-transfizierten Zellen wurden grün, die mit der Kontroll-si-RNA transfizierten Zellen rot gefärbt. Nach 48 und 72 Stunden wurden die Gewebe fixiert und die Zellen in den einzelnen Präparaten mittels konfokalem Mikroskop betrachtet (Vergrößerung 1:200) und gezählt. Die absoluten Zahlen vier unabhängiger Experimente sind angegeben und lassen erkennen, dass die Zellen, die kaum MMP19 exprimieren, schlechter in dem Gewebe einwachsen.

5 DISKUSSION

5.1 Invasion

Bei den meisten Karzinomerkrankungen spielen Tumorinvasion und Metastasierung eine große Rolle für die Morbidität und Mortalität der Patienten. Metastasen sind in 90% der Tumorerkrankungen die Todesursache der Patienten und nicht der Primärtumor selbst (Gupta und Massague 2006; Molloy und van 't Veer 2008). Dementsprechende Vorgänge und Pathomechanismen stehen im starken Interesse medizinisch-wissenschaftlicher Forschung (Friedl und Wolf, 2003). Bei astrozytären Tumoren, insbesondere dem Glioblastom, spielen die Zellinvasion in umliegendes Gewebe, der dadurch entstehende zerebrale Schaden und die Erhöhung des intrakraniellen Druckes die entscheidenden Rollen im Krankheitsverlauf (Claes et al., 2007). Für Tumorwachstum und Zellinvasion müssen verschiedene Substanzen wie EZM-Bestandteile, Basalmembranen und Zelladhäsionsproteine degradiert werden. Dies wird von verschiedenen Proteasen bewältigt. Bei Glioblastomen scheinen sekretorische Proteasen wie MMP2 (Gelatinase A), MMP7 (Matrilysin), MMP9 (Gelatinase B), ADAMTS4/5 und Urokinase, die Membrantyp-Proteasen MMP14 und MMP15 sowie ADAM8 und ADAM19 entscheidene Rollen für diese invasiven Prozesse zu spielen. (Forsyth et al. 1999; Held-Feindt et al. 2006; Rao 2003; Wildeboer et al. 2006). Neue Therapieansätze in der Tumorforschung konzentrieren sich unter anderem auf proteolytische Enzyme wie Metalloproteinasen und deren Inhibitoren (TIMPS), damit die Zellmigration und –invasion herabgesetzt werden können. Eine veränderte Expression von MMPs im Rahmen einer Tumorerkrankung ist nicht erstaunlich, da viele Promotoren von MMP-Genen Bindungsstellen für Protoonkogene aufweisen (Giambernardi et al. 1998). Die therapeutischen Möglichkeiten bei höhergradigen Hirntumoren sind sehr eingeschränkt und meist nur palliativer Art. Deshalb ist es insbesondere bei Glioblastom wichtig zu verstehen, welche Enzyme an pathologischen Prozessen beteiligt sind, und welche klinische Bedeutung dies haben könnte. Nach der Entdeckung von Metalloproteinasen in Karzinomen und ihrer Bedeutung in Vorgängen wie Metastasierung und Zellinvasion wurden Breitband-MMP-Inhibitoren entwickelt, die bei fortgeschrittenen Erkrankungsstadien eingesetzt wurden. Die Ergebnisse dieser klinischen Studien entsprachen allerdings nicht den Erwartungen, da durch MMPs außer der Zellmigration offensichtlich auch andere wesentliche Prozesse beeinflusst werden, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht bedacht wurden. So wirkte sich die unspezifische Hemmung auf den Krankheitsverlauf auch negativ aus, weil z.B. Fernmetastasen früher auftraten und positiv wirkende Apoptosevorgänge gehemmt wurden (Coussens et al., 2002; Della Porta et al., 1999; Folgueras et al., 2004; Krüger et al., 2001).

In Zukunft wird es also wichtig sein, die Bedeutung einzelner Proteasen genau zu verstehen, um mit einer selektiven Therapie gezielte Vorgänge positiv beeinflussen zu können.

5.2 Die Rolle von MMP19

MMP19 stellt ein relativ neues Mitglied der Familie der MMPs dar, und ihre Bedeutung in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen ist bisher noch unzureichend geklärt. Sie wird in den verschiedensten Geweben exprimiert, insbesondere jedoch von Epithelien, Endothelien und mesenchymalen Zellen, oftmals in der Nähe der Basalmembran. Dementsprechend stellen Bestandteile der Basalmembran wie Kollagen Typ IV, Laminin, Nidogen, Nascin-C-Isoform und Fibronectin wesentliche Substrate von MMP19 dar. Des Weiteren werden Extrazellulärsubstanzen wie das Proteoglykan Aggrecan und hormonelle Proteine wie das Insulin-like-Growth-Faktor-binding-Protein-3 hydrolisiert. (Stracke et al. 2000; Titz et al. 2004; Sadowski et al. 2005). Abgesehen von den direkten proteolytischen Wirkungen wurde gezeigt, dass MMP19 essentiell für die Entwicklung von T-Zellen im Thymus und die T-Zell-vermittelte Immunantwort der Haut ist (Beck et al. 2008). Bisher ist nicht bekannt, ob diese immunmodulierenden Effekte von MMP19 von der proteolytischen Aktivität, adhäsiven oder nicht-hydrolytischen Wirkungen bedingt werden.

In Karzinomen zeigen sich für MMP19 eine komplizierte Regulation und verschiedene Funktionen. Im Mammakarzinom wird MMP19 beispielsweise herunter reguliert: Während in gutartigen Läsionen Tumorzellen und ihre umliegenden Endothelzellen deutlich immunreaktiv für MMP19 sind, führt die Entdifferenzierung in ein invasives Karzinom zum Verlust von MMP19 (Djonov et al. 2001). Auch im Kolonkarzinom wird ein Verschwinden von MMP19 beschrieben (Bister et al. 2004). Und Mäuse mit einem MMP19-Defizit zeigen nach Implantation von malignen Keratinozyten eine frühere Angiogenese der Tumoren. Andererseits wurde MMP19 in einigen Zelllinien von Mammakarzinomen mit einer erhöhten Invasivität in Verbindung gebracht (Oxmann et al. 2008, Hegedüs et al. 2008). Außerdem korreliert die Höhe der Expressionsrate von MMP19 in Squamosa-Zell-Karzinomen des Oropharynx mit der lymphatischen oder systemischen Metastasierung (Velinov et al., 2008).

Für Hirntumore gibt es, was MMPs und insbesondere MMP19 betrifft, sehr unterschiedliche Berichte: Während auf der einen Seite eine geringe Expressionsrate beschrieben wird (Lampert et al. 1998), zeigen Stojic et al. 2008 mit immunhistochemischen Methoden einen Anstieg von MMP19 in astrozytären Tumoren, der in Korrelation zum Tumorgrad steht.

5.2.1 MMP19 wird in astrozytären Tumoren verstärkt exprimiert

Zum Vorkommen von MMP19 wurden die oben beschriebenen Expressionsstudien durchgeführt. Sie haben gezeigt, dass MMP19 in den verschiedenen astrozytären Tumoren auf hohem Niveau exprimiert wird, wobei die Werte in den Tumoren der einzelnen Grade zum Teil stark schwanken. Dabei ist zu bedenken, dass in der WHO-Klassifikation verschiedene Tumore mit unterschiedlichen Eigenschaften zusammengefasst werden, da sie eine klinische Einteilung darstellt und im Wesentlichen eine Aussage zur Prognose macht. Ein weiterer Grund könnte die Herkunft der Tumore aus verschiedenen Hirnregionen sein, ebenso wie das Vorkommen von Nekrosen oder unterschiedlich ausgeprägter Vaskularisation. In Gewebe, das aus gesundem Hirn stammt, lag die Expressionsrate zum Teil unter der Nachweisgrenze, so dass auch der Anteil gesunden Gewebes am Tumorrand einen sehr starken Einfluss auf die Höhe des Vorkommens von MMP19 in der jeweiligen Probe hat. Der Nachweis von MMP19 in gesundem Hirngewebe hingegen kann wiederum dadurch begründet sein, dass es sich um stark vaskularisiertes Gewebe handelt. Außerdem sei angemerkt, dass nicht bekannt ist, woher die Resektate genau stammten und ob bei den jeweiligen Patienten neuronale Erkrankungen bestanden. So könnte z.B. eine Multiple Sklerose eine hohe Expressionsrate von MMP19 ebenso erklären (von Horssen et al., 2006) wie ein Resektat, das aus einer Hirnblutung stammt (Sedlacek et al., 1998).

In den Versuchen mit kultivierten Zelllinien zeigte sich eine konstant hohe Expressionsrate von MMP19 in allen Glioblastomlinien. Sie entspricht in etwa der Rate in Endothelzellen, in denen ein deutliches Vorkommen von MMP19 bereits beschrieben ist. Die Monozytenzelllinien THP-1 zeigte eine geringere Expressionsrate als die Glioblastome und nur in Chondrozyten war diese noch etwas höher. Diese Daten legen wiederum nahe, dass die hohen Werte in den soliden Tumoren nicht nur auf eine verstärkte Versorgung mit Blutgefäßen oder entzündliche Prozesse zurückzuführen sind, sondern dass tatsächlich die Tumorzellen astrozytären Ursprungs MMP19 exprimieren.

In den immunhistochemischen Untersuchungen an Tumoren und gesundem Hirngewebe konnte ebenfalls gezeigt werden, dass MMP19 ubiquitär in astrozytären Tumoren anfärben ist. Im Gegensatz dazu zeigte sich in gesundem astrozytärem Gewebe lediglich das bereits erwartete Vorkommen an Blutgefäßen, das auch in den Tumoren nachzuweisen war.

5.2.2 MMP19 wird von proinflammatorischen Zytokinen induziert

Um einen Einblick in die möglichen Ursachen der Überexpression von MMP19 zu erhalten, wurden Gliomzellen mit unterschiedlichen Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimuliert. Den deutlichsten Effekt hatte dabei TNF α , ein proinflammatorisches Zytokin, das

die Genexpression von MMP19 auf das mehr als fünffache anstiegen ließ. Ein verstärktes Vorkommen in Herden multipler Sklerose wird auch von an Horssen et al. beschrieben, so dass anzunehmen ist, dass entzündliche Vorgänge einen wesentlichen Einfluss auf die Expression von MMP19 haben.

5.2.3 MMP19 spielt eine entscheidende Rolle bei der Invasionsfähigkeit von Glioblastomzellen

In den Mikrochemotaxisversuchen und den Versuchen an Hirnschnitten konnte beobachtet werden, dass Zellen, die kein oder wenig MMP19 exprimieren können, schlechtere Möglichkeit zur Invasion besitzen. Sie wandern zum einen langsamer durch beschichtete Membranen und können sich zum anderen schlechter in Hirngewebe ansiedeln. MMP19 scheint also sowohl einen Einfluss auf die Fähigkeit der Invasion an sich zu haben, als auch darauf, wie schnell diese Invasion von statten geht. In den Mikrochemotaxisversuchen wurden dabei sowohl das Matrigel, welches einen Proteinmix aus verschiedenen Basalmembranbestandteilen beinhaltet, als auch Laminin, was ebenfalls ein Basalmembranbestandteil ist, denaturiert. Diese Substanzen sind bereits als Substrate von MMP19 bekannt und beschrieben und die statistische Signifikanz der Experimente ist sehr hoch. Doch gleichzeitig wurde auch Brevican signifikant langsamer durchdrungen, wenn wenig oder kein MMP19 exprimiert wurde. Brevican ist ein spezifischer Extrazellulärmatrixbestandteil des zentralen Nervensystems, so dass MMP19 insbesondere bei Hirntumoren eine wichtige Rolle bei der Invasion zu spielen scheint. Die Werte müssen allerdings auch kritisch betrachtet werden, da es sich bei der Methode der transienten Transfektion um eine sehr fehleranfällige handelt, und der Effekt über die Zeit nachlässt. Es ist in Zukunft also darüber nachzudenken, ob Versuche, die auf einer stabilen Transfektion beruhen, vielleicht besser geeignet sind, den Effekt von MMP19 zu untersuchen. Abschließend ist zu sagen, dass der Einfluss von MMP19 auf die Invasionsfähigkeit von Tumorzellen sicher das interessanteste Ergebnis dieser Arbeit ist. Insbesondere die spezifische Denaturierung von hirneigenen Extrazellulärsubstanzen wie Brevican und Hirngewebe in situ durch MMP19 ist eine wichtige Erkenntnis, die helfen kann, den invasiven Charakter astrozytärer Tumore zu verstehen und vielleicht in Zukunft zu kontrollieren.

6 AUSBLICK

Da die Anzahl der Versuche zur Migration in Gewebe sehr klein ist, besteht hier weiterhin Forschungsbedarf, um den angezeigten Trend, dass MMP19 hierbei eine entscheidende Rolle spielt, zu bestätigen. Weiterhin ist zu überlegen, ob nach einer stabilen Transfektion vielleicht Tumorzellen in ein Tiermodell implantiert werden sollten, um in vivo-Beobachtungen treffen zu können. Hier könnte auch untersucht werden, ob selektive Hemmstoffe für MMP19 ein invasives Wachstum verhindern oder zumindest verlangsamen können.

Die Frage, ob selektive Hemmstoffe in der Klinik Anwendung finden können, muss offen bleiben, da, wie oben erläutert, bisherige Studien sehr enttäuschend verlaufen sind. Dennoch sei angemerkt, dass gerade beim Glioblastom auch palliative Therapieansätze, die eventuell ein Wachstum verlangsamen könnten, weiterhin erforscht werden müssen, da es zurzeit keinen kurativen Therapieansatz gibt.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Astrozytäre Tumore führen aufgrund ihres schnellen und invasiven Wachstums zu einer hohen Morbidität und Mortalität betroffener Patienten. Die Matrix-Metalloproteinase 19 (MMP19) ist eine sekretorische Proteinase, die Bestandteile der Extrazellulärmatrix hydrolysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ihr Vorkommen in Gehirngewebe, in astrozytären Tumoren unterschiedlicher Grade sowie verschiedener Tumorzelllinien mittels RT-PCR, Western-Blot und immunhistochemischen Färbungen untersucht und funktionelle Versuche mit Zellen vorgenommen, deren Expressionsraten durch Transfektion vermindert worden waren (MMP19-silenced). MMP19 konnte dabei in gesundem Hirngewebe nur an Endothelzellen nachgewiesen werden, zeigte jedoch hohe Expressionsraten in malignen Zellen (in vitro) und astrozytären Tumoren (in situ). An kultivierten Glioblastom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Expression von MMP19 durch proinflammatorische Zytokine gesteigert wurde. In Transwell-Versuchen zeigte sich, dass Zellen, deren Expressionsrate vermindert worden war, deutlich langsamer durch Beschichtungen von Laminin, Basallamina und Brevican migrierten als entsprechend unbehandelte Zellen. Sie konnten auch schlechter in Gewebsschnitte von Gehirn einwachsen. Die Versuche zeigten insgesamt, dass MMP19 in astrozytären Tumoren hochgradig exprimiert wird und eine wesentliche Rolle bei der Fähigkeit zur Invasion in hirneigene extrazelluläre Matrix spielt.

A LITERATURVERZEICHNIS

- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. **Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities.** J Cell Sci. 2002;115:3719-27.
- Bartlett JD, Ryu OH, Xue J, Simmer JP, Margolis HC. **Enamelysin mRNA displays a developmentally defined pattern of expression and encodes a protein which degrades amelogenin.** Connect Tissue Res. 1998;39:101-9; discussion 141-9.
- Beck IM, Müller M, Mentlein R, Sadowski T, Mueller MS, Paus R, Sedlacek R. **Matrix metalloproteinase-19 expression in keratinocytes is repressed by transcription factors Tst-1 and Skn-1a: implications for keratinocyte differentiation.** J Invest Dermatol. 2007;127:1107-14.
- Beck IM, Rückert R, Brandt K, Mueller MS, Sadowski T, Brauer R, Schirmacher P, Mentlein R, Sedlacek R. **MMP19 is essential for T cell development and T cell-mediated cutaneous immune responses.** PLoS ONE. 2008;3:e2343.
- Bejarano PA, Noelken ME, Suzuki K, Hudson BG, Nagase H. **Degradation of basement membranes by human matrix metalloproteinase 3 (stromelysin).** Biochem J. 1988;256:413-9.
- Bister VO, Salmela MT, Karjalainen-Lindsberg ML, Uria J, Lohi J, Puolakkainen P, Lopez-Otin C, Saarialho-Kere U. **Differential expression of three matrix metalloproteinases, MMP-19, MMP-26, and MMP-28, in normal and inflamed intestine and colon cancer.** Dig Dis Sci 2004;49:653-61.
- Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M and Fielding JW **Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial.** Br J Cancer. 2002;86:1864-70.
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. **Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince.** Nature Rev Mol Cell Biol. 2002;3:207-214.
- Brooks PC, Strömblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresh DA. **Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3.** Cell. 1996;85:683-93.
- Castro MM, Rizzi E, Prado CM, Rossi MA, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. **Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling.** Matrix Biol. 2009 Dec 4(Epub)
- Chattopadhyay S, Shubayev VI. **MMP-9 controls Schwann cell proliferation and phenotypic remodeling via IGF-1 and ErbB receptor-mediated activation of MEK/ERK pathway.** Glia. 2009;57:1316-25.
- Cheng CW, Yu JC, Wang HW, Huang CS, Shieh JC, Fu YP, Chang CW, Wu PE, Shen CY. **The clinical implications of MMP-11 and CK-20 expression in human breast cancer.** Clin Chim Acta. 2010;411:234-41.
- Claes A, Idema AJ, Wesseling P. **Diffuse glioma growth: a guerilla war.** Acta Neuropathol 2007;114:443-58.
- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. **Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations.** Science. 2002;295:2387-92.
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD,

- Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM. **Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate.** *Nature.* 2009;462:739-44.
- Della Porta P, Soeltl R, Krell HW, Collins K, O'Donoghue M, Schmitt M, Krüger A. **Combined treatment with serine protease inhibitor aprotinin and matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat (BB-94) does not prevent invasion of human esophageal and ovarian carcinoma cells in vivo.** *Anticancer Res.* 1999;19:3809-16.
- Djonov V, Högger K, Sedlacek R, Laissue J, Draeger A. **MMP-19: cellular localization of a novel metalloproteinase within normal breast tissue and mammary gland tumours.** *J Pathol* 2001;195:147-155.
- Dollery CM, Libby P. **Atherosclerosis and proteinase activation** *Cardiovasc Res.* 2006;69:625-35.
- Drappatz J, Norden AD, Wen PY. **Therapeutic strategies for inhibiting invasion in glioblastoma.** *Expert Rev Neurother.* 2009;9:519-34.
- Evans JD, Stark A, Johnson CD, Daniel F, Carmichael J, Buckels J, Imrie CW, Brown P, Neoptolemos JP. **A phase II trial of marimastat in advanced pancreatic cancer.** *Br J Cancer.* 2001;85:1865-70.
- Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C. **Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies.** *Int J Dev Biol.* 2004;48:411-24.
- Folgueras AR, Valdés-Sánchez T, Llano E, Menéndez L, Baamonde A, Denlinger BL, Belmonte C, Juárez L, Lastra A, García-Suárez O, Astudillo A, Kirstein M, Pendás AM, Fariñas I, López-Otín C. **Metalloproteinase MT5-MMP is an essential modulator of neuro-immune interactions in thermal pain stimulation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:16451-6.
- Forsyth PA, Wong H, Laing TD, Rewcastle NB, Morris DG, Muzik H et al. **Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas.** *Br J Cancer* 1999;79:1828-35.
- Gessi M, Maderna E, Guzzetti S, Cefalo G, Massimino M, Solero CL, Finocchiaro G, Pollo B. **Radiation-induced glioblastoma in a medulloblastoma patient: A case report with molecular features.** *Neuropathology.* 2008;28:633-9.
- Giambernardi TA, Grant GM, Taylor GP, Hay RJ, Maher VM, McCormick JJ, Klebe RJ. **Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells.** *Matrix Biol.* 1998;16:483-96.
- Gueders MM, Hirst SJ, Quesada-Calvo F, Paulissen G, Hacha J, Gilles C, Gosset P, Louis R, Foidart JM, Lopez-Otin C, Noël A, Cataldo DD. **MMP-19 Deficiency Promotes Tenascin-C Accumulation and Allergen-induced Airway Inflammation.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009 Oct 20 (Epub).
- Gupta GP, Massagué J. **Cancer metastasis: building a framework.** *Cell.* 2006;127:679-95.
- Hegedüs L, Cho H, Xie X, Eliceiri GL **Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness.** *J Cell Physiol.* 2008;216:480-5.
- Held-Feindt J, Paredes EB, Blömer U, Seidenbecher C, Stark AM, Mehdorn HM, Mentlein R. **Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas.** *Int J Cancer* 2006;118:55-61.

van Horsen J, Vos CM, Admiraal L, van Haastert ES, Montagne L, van der Valk P, de Vries HE. **Matrix metalloproteinase-19 is highly expressed in active multiple sclerosis lesions.** *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006;32:585-93.

Iida J, Pei D, Kang T, Simpson MA, Herlyn M, Furcht LT, McCarthy JB. **Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan regulates matrix metalloproteinase-dependent human melanoma invasion into type I collagen.** *J Biol Chem.* 2001;276:18786-94.

Jean C, Blanc A, Prade-Houdellier N, Ysebaert L, Hernandez-Pigeon H, Al Saati T, Haure MJ, Coluccia AM, Charveron M, Delabesse E, Laurent G. **Epidermal growth factor receptor/beta-catenin/T-cell factor 4/matrix metalloproteinase 1: a new pathway for regulating keratinocyte invasiveness after UVA irradiation.** *Cancer Res.* 2009;69:3291-9.

Jiang WG, Davies G, Martin TA, Parr C, Watkins G, Mason MD, Mansel RE. **Expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP in human breast cancer and its impact on invasiveness of breast cancer cells.** *Int J Mol Med.* 2006;17:583-90.

Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. **The WHO classification of tumors of the nervous system.** *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61:215-25; discussion 226-9.

Konttinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J, Kinne RW, Santavirta S, Sorsa T, López-Otín C, Takagi M. **Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis.** *Annals of rheumatic diseases* 1999;58:691-7.

Krüger A, Soeltl R, Sopov I, Kopitz C, Arlt M, Magdolen V, Harbeck N, Gänzbacher B, Schmitt M. **Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis.** *Cancer Res.* 2001;61:1272-5.

Lakka SS, Rajan M, Gondi C, Yanamandra N, Chandrasekar N, Jasti SL, Adachi Y, Siddique K, Gujrati M, Olivero W, Dinh DH, Kouraklis G, Kyritsis AP, Rao JS. **Adenovirus-mediated expression of antisense MMP-9 in glioma cells inhibits tumor growth and invasion.** *Oncogene.* 2002;21:8011-9.

Lamar JM, Pumiglia KM, DiPersio CM. **An immortalization-dependent switch in integrin function up-regulates MMP-9 to enhance tumor cell invasion.** *Cancer Res.* 2008;68:7371-9.

Lampert K, Machein U, Machein MR, Conca W, Peter HH, Volk B. **Am J Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors.** *Pathol.* 1998;153:429-37.

Leppert D, Hauser SL, Kishiyama JL, An S, Zeng L, Goetzl EJ. **Stimulation of matrix metalloproteinase-dependent migration of T cells by eicosanoids.** *FASEB J.* 1995;9:1473-81.

Li L, Mei TH, Zhou XD, Zhang XG. **Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase (MMP)-26 protein in non-small cell lung cancer.** *Chin J Cancer.* 2009;28:60-3.

Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Yokomise H, Ueno M, Kadota K, Urushihara M, Huang CL. **Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer.** *Lung Cancer.* 2007;58:384-91.

Marchenko GN, Strongin AY. **MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors.** *Gene* 2001;265:87-93.

- Micevych P, Sinchak K. **Abstract Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain.** Mol Cell Endocrinol. 2008;290:44-50.
- Mignatti P, Rifkin DB. **Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion.** Physiol Rev. 1993;73:161-95.
- Molloy T, van 't Veer LJ. **Recent advances in metastasis research.** Curr Opin Genet Dev. 2008;18:35-41.
- Murphy G, Knäuper V, Cowell S, Hembry R, Stanton H, Butler G, Freije J, Pendás AM, López-Otín C. **Evaluation of some newer matrix metalloproteinases.** Ann N Y Acad Sci. 1999;878:25-39.
- Nagase H, Woessner JF Jr. **Matrix metalloproteinases.** J Biol Chem. 1999;274:21491-4.
- Nie J, Pei D. **Direct activation of pro-matrix metalloproteinase-2 by leukolysin/membrane-type 6 matrix metalloproteinase/matrix metalloproteinase 25 at the asn(109)-Tyr bond.** Cancer Res. 2003;63:6758-62.
- Nieder C, Adam M, Grosu AL. **Combined modality treatment of glioblastoma multiforme: the role of temozolomide.** Rev Recent Clin Trials. 2006;1:43-51.
- Oxmann D, Held-Feindt J, Stark AM, Hattermann K, Yoneda T, Mentlein R. **Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype.** Oncogene. 2008;27:3567-75.
- Pendás AM, Knäuper V, Puente XS, Llano E, Mattei MG, Apte S, Murphy G, López-Otín C. **Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution.** J Biol Chem. 1997;272:4281-6.
- Rao JS. **Abstract Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases.** Nat Rev Cancer. 2003;3:489-501.
- Rizki A, Weaver VM, Lee SY, Rozenberg GI, Chin K, Myers CA, Bascom JL, Mott JD, Semeiks JR, Grate LR, Mian IS, Borowsky AD, Jensen RA, Idowu MO, Chen F, Chen DJ, Petersen OW, Gray JW, Bissell MJ. **A human breast cell model of preinvasive to invasive transition.** Cancer Res. 2008;68:1378-87.
- Rodgers UR, Kevorkian L, Surridge AK, Waters JG, Swingler TE, Culley K, Illman S, Lohi J, Parker AE, Clark IM **Expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-28.** Matrix Biol. 2009;28:263-72.
- Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Ludwig A, Proksch E, Titz B, Sedlacek R. **Matrix metalloproteinase 19 processes the laminin 5 gamma 2 chain and induces epithelial cell migration.** Cell Mol Life Sci 2005;62:870-80.
- Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Sedlacek R. **Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3.** Mol Biol Cell 2003;14:4569-80.
- Salcman M. **Glioblastoma and malignant astrocytomas.** In: Kaye AH, Laws ER, eds. Brain Tumours: An Encyclopaedic Approach. New York, NY: Churchill Livingstone 1995: 449-477.
- Salgaller ML, Liao LM. **Current status of clinical trials for glioblastoma.** Rev Recent Clin Trials. 2006;1:265-81.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1989.

- Sedlacek R, Mauch S, Kolb B, Schätzlein C, Eibel H, Peter HH, Schmitt J, Krawinkel U. **Abstract Matrix metalloproteinase MMP-19 (RASI-1) is expressed on the surface of activated peripheral blood mononuclear cells and is detected as an autoantigen in rheumatoid arthritis.** Immunobiology. 1998;198:408-23.
- Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. **Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages.** J Biol Chem. 1993;268:23824-9
- Silbergeld DL, Chicoine MR. **Isolation and characterization of human malignant glioma cells from histologically normal brain.** J Neurosurg. 1997;86:525-31.
- Sinnamon MJ, Carter KJ, Fingleton B, Matrisian LM. **Matrix metalloproteinase-9 contributes to intestinal tumourigenesis in the adenomatous polyposis coli multiple intestinal neoplasia mouse.** Int J Exp Pathol. 2008;89:466-75.
- Sohail A, Sun Q, Zhao H, Bernardo MM, Cho JA, Fridman R. **MT4-(MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer.** Cancer Metastasis Rev. 2008;27:289-302.
- Sternlicht MD, Werb Z. **How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.** Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:463-516.
- Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE Jr. **Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis.** FASEB J. 1993;7:1434-41.
- Stojic J, Hagemann C, Haas S, Herbold C, Kühnel S, Gerngras S, Roggendorf W, Roosen K, Vince GH. **Expression of matrix metalloproteinases MMP-1, MMP-11 and MMP-19 is correlated with the WHO-grading of human malignant gliomas.** Neurosci Res. 2008;60:40-9.
- Stracke JO, Fosang AJ, Last K, Mercuri FA, Pendas AM, Llano E, Perris R, Di Cesare PE, Murphy G, Knauper V. **Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP).** FEBS Lett 2000;478:52-56.
- Stracke JO, Hutton M, Stewart M, Pendás AM, Smith B, López-Otin C, Murphy G, Knäuper V. **Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme.** J Biol Chem. 2000;275:14809-16.
- Titz B, Dietrich S, Sadowski T, Beck C, Petersen A, Sedlacek R. **Activity of MMP-19 inhibits capillary-like formation due to processing of nidogen-1.** Cell Mol Life Sci 2004;61:1826-33.
- Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. **The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87:5578-82.
- Velinov N, Aebersold D, Haeni N, Hlushchuk R, Mishev G, Weinstein F, Sedlacek R, Djonov V. **Matrix metalloproteinase-19 is a predictive marker for tumor invasiveness in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma.** Int J Biol Markers. 2007;22:265-73. Erratum in: Int J Biol Markers. 2008;23:64.
- Vu TH, Werb Z. **Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology.** Genes Dev. 2000;14:2123-33.
- Wildeboer D, Naus S, Amy Sang QX, Bartsch JW, Pagenstecher A. **Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness.** J Neuropathol Exp Neurol 2006;65:516-27.

Yang M, Kurkinen M. **Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP, from chicken embryo fibroblasts. CMMP, Xenopus XMMP, and human MMP19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain.** J Biol Chem. 1998;273:17893-900.

Yen CY, Chen CH, Chang CH, Tseng HF, Liu SY, Chuang LY, Wen CH, Chang HW. **Matrix metalloproteinases (MMP) 1 and MMP10 but not MMP12 are potential oral cancer markers.** Biomarkers. 2009;14:244-9.

Yin CY, Mao QX, Luo JH. **Dynamic expression of matrix metalloproteinases 2 and 8 in rat cervix.** Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2009;29:2205-7.

B ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
cDNA	copy Desoxyribonucleic Acid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EGF	Epidermal Growth Factor
EZM	Extrazellulärmatrix
Glu	Glutaminsäure
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
MMP	Matrix Metallo Proteinase
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
PVDF	Polyvinylidifluorid
RNA	Ribonucleic Acid
siRNA	small inhibiting Ribonucleic Acid
TGF β	Transforming Growth Factor β
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
WHO	World Health Organization
GBM	Glioblastoma multiforme
ZNS	Zentrales Nervensystem

C ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Matrix Metalloprotease 19.....	6
Abbildung 2: Chromosomale Lokalisation der MMP19.....	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Methode des Western Blots	17
Abbildung 4: Prinzip der indirekten Immunreaktion.....	23
Abbildung 5: Genexpression von MMP19 in Astrozytomen, Glioblastomen und gesundem Hirngewebe.....	28
Abbildung 6: Relative Genexpression von MMP19 in verschiedenen humanen Zelllinien.....	29
Abbildung 7: Effekte von Zytokinen und Wachstumsfaktoren.....	30
Abbildung 8: Nachweis verschiedener MMP19-Formen in unterschiedlichen Geweben, bzw. Zelllinien mittels „Western Blot“	31
Abbildung 9: Kontrollfärbung an einem Glioblastomschnitt	32
Abbildung 10: MMP19 und GFAP in Normalhirn.....	33
Abbildung 11: MMP19 und PECAM in Normalhirn.....	33
Abbildung 12: MMP19 und GFAP in einem Glioblastom.....	34
Abbildung 13: MMP19 und PECAM in einem Glioblastom.....	34
Abbildung 14: : MMP19 und MiB-1 in einem Glioblastom	35
Abbildung 15: MMP19 und CD-68 in einem Glioblastom	36
Abbildung 16: Effektivität verschiedener si-RNA.....	37
Abbildung 17: Effektivität verschiedener Konzentrationen (in μM)	37
Abbildung 18: Mikrochemotaxisversuch in der Boydenkammer	38
Abbildung 19: Migrationsversuch an Gehirngewebe.....	39

D TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: WHO-Gradierung der astrozytären Tumore 3
Tabelle 2: Humane MMPs: Überblick und wichtigste Funktionen..... 4
Tabelle 3: Abfolge der Realtime-PCR.....21

E DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf Mentlein für die Bereitstellung des Themas und die exzellente Betreuung während ihrer Erstellung. Er hat stets ein offenes Ohr für meine Anliegen gehabt und mir die Freude an wissenschaftlichem Arbeiten vermittelt. Des Weiteren danke ich meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Martina Burmester, Miriam Lemmer, Kirsten Hattermann und Daniel Oxmann, die mir die Arbeit sehr erleichtert haben, in dem sie mir Rat und Tat zur Seite standen. Ich danke auch Frau Prof. Dr. Janka Held-Feindt und Herrn Dr. Heinz-Hermann Hugo aus der Neurochirurgie der Universitätsklinik Kiel für die Bereitstellung des Materials. Ebenfalls danke ich Jan Kieksee, Hanna Timm und natürlich Clemens Franke für das Beseitigen aller Schwierigkeiten, die ich mit meinem Computer, mit Grafiken und dem Formatieren dieser Arbeit hatte. Ein besonderer Dank gilt auch Merit Bretschneider, die mich in den letzten Jahren und bei dieser Arbeit nicht nur fachlich sondern insbesondere als Freundin begleitet hat. Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die ich mein Studium nicht hätte meistern können, und die mich auch während dieser Arbeit stets liebevoll unterstützt haben.

F LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name: Imke Lettau
Geburtsdaten: 26.05.1984 in Eckernförde
Anschrift: Weißenburgstraße 39
24114 Kiel
Kontakt: (0431) 3109600
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig

Hochschulstudium

11/2009 Abschluss des Medizinstudiums an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/2008- 07/2009 Praktisches Jahr
10/2003 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schulbildung

2003 Allgemeine Hochschulreife
1994-2003 Helene-Lange-Gymnasium Rendsburg
1990-1994 Grundschule Owschlag

Publikation

Originalarbeit: Lettau I, Hattermann K, Held-Feindt J, Brauer R, Sedlacek R, Mentlein R (2010) **Matrix Metalloproteinase-19 is Highly Expressed in Astroglial Tumors and Promotes Invasion of Glioma Cells.** J Neuropathol Exp Neurol 65, in press.

Poster/ Abstract Lettau I, Hattermann K, Held-Feindt J, Sedlacek R, Mentlein R (2010) **Matrix Metalloproteinase-19 is Highly Expressed in Astroglial Tumors and Promotes Invasion of Glioma Cells.** Ann. Anat., in press.