

**Identifikation  
von migrations- und  
invasionsfördernden Faktoren  
für neurale Vorläuferzellen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Annette Pusch

aus

Köln

Bonn 2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Joachim Kappler

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Alt

Tag der Promotion: 05.10.2009

Erscheinungsjahr: 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2005 bis Dezember 2008  
am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Bonn, Nussallee 11  
unter der Leitung von Herrn PD Dr. Joachim Kappler durchgeführt.

Meinen Eltern  
und meinem Opa

**Inhaltsverzeichnis**

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VI</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>X</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>XI</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Zentrale Nervensystem</b>	<b>1</b>
1.1.1 Myelin und Oligodendrozyten	1
1.1.1.1 Wanderung und Ausdifferenzierung der Oligodendrozyten-Vorläufer	1
1.1.2 Demyelinisierende Erkrankungen des Zentralen Nervensystems	4
1.1.2.1 Metachromatische Leukodystrophie	4
1.1.3 Zellersatz im Zentralen Nervensystem	5
1.1.3.1 Embryonale Stammzellen	6
<b>1.2 Zellmigration</b>	<b>8</b>
1.2.1 Das Zytoskelett	9
1.2.2 Protrusion des Leitsaums	10
1.2.3 Bildung von Adhäsionskontakten und Retraktion des Zellendes	12
1.2.3.1 Hyaluronan als Komponente der Extrazellulären Matrix	14
<b>1.3 Kandidatengene</b>	<b>15</b>
1.3.1 Der Hyaluronanrezeptor CD44	17
1.3.1.1 Struktur des Hyaluronanrezeptors CD44	17
1.3.1.2 Funktionen des Hyaluronanrezeptors CD44	19
1.3.2 Die Src-Tyrosinkinase	23
1.3.2.1 Struktur und Aktivierung der Src-Tyrosinkinase	23
1.3.2.2 Funktionen der Src-Tyrosinkinase	26
1.3.3 Der EGF-Rezeptor	28
1.3.3.1 Struktur und Aktivierung des EGF-Rezeptors	29
1.3.3.2 Der EGF-Rezeptor als Positivkontrolle	31
<b>1.4 Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>32</b>

---

<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte</b>	<b>34</b>
2.1.1	Mikroskope	36
2.1.2	Zentrifugen	37
<b>2.2</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>37</b>
<b>2.3</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>39</b>
<b>2.4</b>	<b>Lösungen, Medien und Puffer</b>	<b>45</b>
2.4.1	Lösungen und Medien für die Zellkultur	45
2.4.1.1	Puffer und Supplemente für die ES-Zellkultur	46
2.4.1.2	Medien für die ES-Zellkultur	49
2.4.2	Lösungen für den Migrationsassay	51
2.4.3	Lösungen und Medien für die Bakterienkultur	52
2.4.4	Lösungen für molekularbiologische Untersuchungen	52
2.4.5	Lösungen für proteinbiochemische Untersuchungen	52
2.4.6	Sonstige Lösungen und Puffer	54
<b>2.5</b>	<b>Eukaryotische Zelllinien</b>	<b>55</b>
<b>2.6</b>	<b>Bakterienstamm</b>	<b>55</b>
<b>2.7</b>	<b>Tiere</b>	<b>56</b>
<b>2.8</b>	<b>Plasmide</b>	<b>56</b>
<b>2.9</b>	<b>Oligonukleotide (Primer)</b>	<b>57</b>
<b>2.10</b>	<b>Antikörper</b>	<b>58</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>60</b>
<b>3.1</b>	<b>Zwei-Photonen-Mikroskopie</b>	<b>60</b>
<b>3.2</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>60</b>
3.2.1	Auftauen von Zellen	61
3.2.2	Zellzahlbestimmung	61
3.2.3	Passagieren von Zellen	61
3.2.4	Einfrieren von Zellen	62
3.2.5	Poly-L-Ornitin/Laminin Beschichtung von Zellkulturgefäßen	62
3.2.6	Gliale Vorläuferzellen	63
3.2.6.1	Prädifferentzierung zu glialen Vorläuferzellen	63
3.2.6.1.1	Auftauen von Feederzellen	63
3.2.6.1.2	Auftauen von embryonalen Stammzellen	64
3.2.6.1.3	Passage auf Gelatine	64
3.2.6.1.4	Herstellen von Embryoidkörpern (EBs)	64

3.2.6.1.5	Plattieren der EBs und Transfer zu ITSFn	65
3.2.6.1.6	Transfer in N3FL-Medium	66
3.2.6.1.7	Transfer in N3EFL-Medium	67
3.2.6.2	Kultivieren von glialen Vorläuferzellen	67
3.2.6.3	Ausdifferenzieren von neuronalen Vorläuferzellen	68
3.2.7	Transfektion	69
3.2.7.1	Transfektion mit ExGen 500	69
3.2.7.2	Nucleofektion® mit Amaxa	71
3.2.8	Fixieren, Gegenfärben und Eindeckeln von Kulturzellen	72
3.2.9	Immunfluoreszenzfärbung von Kulturzellen	73
3.2.9.1	Standardprotokoll (Blockieren mit Gelatine)	73
3.2.9.2	Färben von Hyaluronan mit HK2-GFP	74
3.2.9.3	Gliale Markerfärbung	74
3.2.9.4	Proliferationsnachweis mit Bromdesoxyuridin (BrdU)	75
3.2.10	Migrationsassay in der 96-well-Platte	76
3.2.10.1	Bestimmen des relativen Migrationsindex (RDI)	77
3.2.10.2	Manuelle Pfadbestimmung	77
3.2.11	Sliceinvasionsassay	78
3.2.11.1	Immunfluoreszenzfärbung der transplantierten Zellen	78
3.2.11.2	Auswertung der Sliceinvasion	79
3.2.11.2.1	Messung der maximalen Invasionstiefe	80
3.2.11.2.2	Grauwertberechnung	80
3.2.12	Messen der Zellfortsätze	81
<b>3.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>82</b>
3.3.1	Transformation von Prokaryotischen Zellen	82
3.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	82
3.3.2.1	Plasmid-Midipräparation	82
3.3.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	83
3.3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	84
3.3.5	Sequenzierung	85
3.3.6	Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	86
<b>3.4</b>	<b>Proteinanalyse</b>	<b>87</b>
3.4.1	Proteinbestimmung	87
3.4.2	Präparation der Zellen zur Proteinisolierung	87
3.4.2.1	Gewinnung des Gesamtzellsats	88
3.4.2.2	Gewinnung der Proteine aus den Zellkulturüberständen	88
3.4.2.3	Subzelluläre Fraktionierung	88
3.4.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	89

---

3.4.4	Western Blot im Semi Dry Verfahren	90
3.4.5	Antigennachweis mittels alkalischer Phosphatasereaktion	91
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>92</b>
<b>4.1</b>	<b>Zellmigrationsexperimente</b>	<b>92</b>
4.1.1	Etablierung eines Migrationstests in 96-well-Kulturschalen mit B35-Neuroblastomzellen	92
4.1.2	Zellmigrationsexperimente mit glialen Vorläuferzellen (N3EFL-Zellen)	97
4.1.2.1	Optimierung des Migrationstests für N3EFL-Zellen	97
4.1.2.2	<i>Screening</i> nach N3EFL-zellmigrationsbeeinflussenden Faktoren	100
4.1.3	Zellmigrationsexperimente mit B35-Neuroblastomzellen	109
<b>4.2</b>	<b>Zellinvasionsexperimente</b>	<b>120</b>
4.2.1	Hyaluronan im Hippocampus	120
4.2.2	Zellinvasionsexperimente mit B35-Neuroblastomzellen	121
4.2.3	Zellinvasionsexperimente mit glialen Vorläuferzellen (N3EFL-Zellen)	129
<b>4.3</b>	<b>Weitere Charakterisierung migrations- und invasionsfördender Kandidatengene</b>	<b>132</b>
4.3.1	Endogene Expression von Src und CD44	132
4.3.2	Zellmorphologische Veränderung durch Überexpression relevanter Kandidatengene <i>in vitro</i>	138
4.3.3	Differenzierungs- und Proliferationseinfluss relevanter Kandidatengene	143
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>149</b>
<b>5.1</b>	<b>Die Zelllinien</b>	<b>149</b>
<b>5.2</b>	<b>Der Zellmigrations- und invasionsassay</b>	<b>151</b>
5.2.1	Das primäre <i>screening</i> – die Analyse der Zellmigration	151
5.2.2	Das sekundäre <i>screening</i> – die Analyse der Zellinvasion	155
<b>5.3</b>	<b>Die Kandidatengene</b>	<b>159</b>
5.3.1	Die Kandidatengene im <i>screening</i>	159
5.3.2	Differenzierungs- und Proliferationseinfluss der Kandidatengene	160
5.3.3	Das Kandidatengen CD44	162
5.3.3.1	Expression von CD44(-GFP)	162
5.3.3.2	Auswirkungen der CD44-GFP-Überexpression auf die B35-Zellen	164
5.3.3.3	Auswirkungen der CD44-GFP-Überexpression auf die N3EFL-Zellen	166
5.3.3.4	Schlussfolgerungen aus den CD44-Experimenten	168
5.3.4	Das Kandidatengen Src	169



5.3.4.1	Expression von Src(-GFP)	169
5.3.4.2	Auswirkungen der Src-GFP-Überexpression auf die B35-Zellen	169
5.3.4.3	Auswirkungen der Src-GFP-Überexpression auf die N3EFL-Zellen	173
5.3.4.4	Schlussfolgerungen aus den Src-Experimenten	174
5.3.5	EGFR als Positivkontrolle	175
<b>6</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK</b>	<b>177</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>180</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>181</b>
	<b>EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>197</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>198</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>199</b>
	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>201</b>

**Abkürzungsverzeichnis****Tabelle 1: Abkürzungen**

Bedeutungen für Materialien sind den Tabellen in Kapitel 2 zu entnehmen

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
abs.	absolut
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ADP	Adenosin-diphosphat
AMAP1/ASAP1	auch „DDEF1“ genannt: <i>development and differentiation enhancing factor 1</i>
AP	Alkalische Phosphatase
AREG	<i>amphiregulin</i>
Arf GAP	Arf GTPase aktivierendes Protein
ARP2/3	<i>actin-related proteins 2/3</i>
ASA	Arylsulfatase A
BD	Becton Dickinson
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
Blk	<i>B lymphocyte kinase</i>
BPA	Anzahl schwarzer Pixel
BTC	<i>betacellulin</i>
C	Gesamtzelllysat
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i>
CD44s	Standardform von CD44
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
Chk	Csk homologe Kinase
CNP	cyclische Nukleotid-Phosphodiesterase
CSF1R	<i>colony-stimulating factor-1 receptor</i>
Csk	c-Src Tyrosinkinase
c-Src	zelluläre Src
C-terminal	carboxyterminal
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EPGN	<i>epigen</i>

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
EREG	<i>epiregulin</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase(s)</i>
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
Exone (v1-v10)	Variable Exone 1-10
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Fokale Adhäsions Kinase(n)
F-Aktin	filamentöses Aktin
FGFR	Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor
Fgr	<i>Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog</i>
FTP	<i>filopodium tip complex</i>
GAG	Glykosaminoglykan(e)
G-Aktin	Globuläres Aktin
GalC	Galactocerebrosid
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GD	Gangliosid
GDB-Domäne	GTPase Protein Bindungsdomäne
GDP	Guanosin Biphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
GPI-verankert	Glycosylphosphatidylinositol-verankert
GTP	Guanosin Triphosphat
GTPasen	<i>Rho family small guanosine triphosphate (GTP)-binding proteins</i>
HA	Hyaluronan (Hyaluronsäure)
HBEGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
Hck	<i>hemopoietic cell kinase</i>
HGFR	<i>hepatocyte growth factor/scatter factor receptor</i>

Abkürzung	Bedeutung
Hyal	Hyaluronidase
iA	im Allgemeinen
ICC	Immunzytochemie
iPS	induzierbare pluripotente Stammzellen
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
ITSFn	ITS-Medium mit Fibronectin
JM	Juxtamembran
L	lösliche Fraktion
Lck	<i>leukocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
Lsg.	Lösung
Lyn	<i>v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog</i>
LYVE1	<i>lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1</i>
M	Membranfraktion
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	Myelin-basisches Protein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Micro	Mikrosomen
Mio.	Millionen
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
MTOC	<i>microtubule organizing center</i>
N	Kernfraktion
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NG2/AN2 <sup>+</sup>	ein Proteoglykan
NS-Zellen	Neurale Stammzellen
N-terminal	aminoterminal
OPC	Oligodendrozyten-Precursor-Zelle
ORF	<i>open reading frame</i>

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR	<i>plateled-derived growth factor receptor</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP(2)	Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKN <sub>γ</sub>	Proteinkinase N-γ
PLP	Proteolipid-Protein
ppm	<i>parts per million</i>
PSA	<i>polysialic acid</i>
PTEN	PIP <sub>3</sub> Phosphatase
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RDI	relativer Migrationsindex
RhoA	<i>Ras homolog gene family</i> , Mitglied A
RhoB	<i>Ras homolog gene family</i> , Mitglied B
RhoG	<i>Ras homolog gene family</i> , Mitglied G
RNAi	<i>RNA</i> Inteferenz
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinasen
SCF	Stammzellfaktor
SCFR	Stammzellfaktor Rezeptor
Ser	Serin
SFK	<i>Src family of protein tyrosine kinases</i>
SH	Src-Homologie
Shp2 (PTPN11)	Protein Tyrosinphosphatase
siRNA	<i>short-interference RNA</i>
Src	Src-Tyrosinkinase, abgeleitet vom Rous Sarcoma Virus
SVZ	subventrikuläre Zone
tech.	technisch(es)
TGFA	<i>transforming growth factor-a</i>
Tks5/Fish	<i>tyrosine kinase substrate 5</i>

Abkürzung	Bedeutung
ts	temperatursensitiv
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
Ü	Proteine aus dem Zellkulturüberstand
Ü.N.	über Nacht
Verd.	Verdünnung
vergl.	vergleiche
v-Src	virale Src
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
WB	Western Blot
Yes1	<i>v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1</i>
Yrk	<i>Yes related kinase</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\gamma$ EF	Mitotisch inaktivierte embryonale Fibroblasten

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Reifungsprozess der Oligodendrozyten (de Castro und Bribian (2005))	3
Abbildung 2: Der Zyklus der Zellmigration und diverse Einflussfaktoren (Ridley <i>et al.</i> (2003))	9
Abbildung 3: Molekularer Aufbau von Hyaluronan (Jiang <i>et al.</i> (2007))	14
Abbildung 4: Die Struktur des CD44-Proteins (Nagano und Saya (2004))	19
Abbildung 5: Struktur von c-Src und der Mutante ts LA29 v-Src (Frame <i>et al.</i> (2002), modifiziert)	25
Abbildung 6: Aktivierung von c-Src (Martin (2001), modifiziert)	25
Abbildung 7: Die Domänen des EGF-Rezeptors (Ferguson (2008))	29
Abbildung 8: Mechanismen der EGF-Rezeptoraktivierung (Ferguson (2008))	30
Abbildung 9: Differenzierung neuraler Vorläuferzellen (Glaser <i>et al.</i> (2007))	68
Abbildung 10: Sliceinvasionstest: Aufnahmefelder im Hippocampus (Scheffler <i>et al.</i> (2003), modifiziert)	79
Abbildung 11: B35-Zelldichte für eine optimale Transfektionseffizienz	94
Abbildung 12: Transfektion der B35-Zellen mit Kandidatengenkonstrukten und pEGFP	96
Abbildung 13: Migration bei unterschiedlichen N3EFL-Zelldichten in einer 96-well-Platte	98
Abbildung 14: Analyse des relativen Migrationsindexes von N3EFL-Zellen	101
Abbildung 15: Repräsentatives Beispiel für die manuelle Pfadbestimmung	102
Abbildung 16: Manuelle Pfadbestimmung der N3EFL-Zellmigration nach Überexpression von Kandidatengen und Supplementzugaben	104
Abbildung 17: Statistik der Migration von EGFR-GFP-überexprimierenden N3EFL-Zellen	107

Abbildung 18: Statistik der Migration von Src-GFP-überexprimierenden N3EFL-Zellen	108
Abbildung 19: Manuelle Pfadbestimmung der B35-Zellmigration nach Überexpression von Kandidatengenen	110
Abbildung 20: Statistik der Migration von CD44-GFP-überexprimierenden B35-Zellen	111
Abbildung 21: Statistik der Migration von Src-GFP-überexprimierenden B35-Zellen	112
Abbildung 22: Segmentgeschwindigkeiten von Kandidatengen-überexprimierenden B35-Zellen	114
Abbildung 23: Kumulative Darstellung der Segmentgeschwindigkeiten von Kandidatengen-überexprimierenden B35-Zellen	115
Abbildung 24: Inhibition der B35-Zellmigration durch PP2	118
Abbildung 25: Hyaluronan im Hippocampus von P9 Ratten	121
Abbildung 26: Übersichtsaufnahmen der Hippocampuschnitte nach Transplantation von B35-Zellen	123
Abbildung 27: Morphologie transplanteder B35-Zellen	124
Abbildung 28: Lokalisation von CD44-GFP in Zellfortsätzen transplanteder B35-Zellen	125
Abbildung 29: Invasionstiefenverteilungen von Kandidatengen-überexprimierenden B35-Zellen	127
Abbildung 30: Maximale Invasionstiefe von Kandidatengen-überexprimierenden B35-Zellen	128
Abbildung 31: Verbesserung der Transfektionseffizienz bei N3EFL-Zellen durch Nucleofektion	130
Abbildung 32: Maximale Invasionstiefe von Kandidatengen-überexprimierenden N3EFL-Zellen	131
Abbildung 33: Western Blot Analyse von Src (-GFP) in B35-Zellen	133
Abbildung 34: Western Blot Analyse von CD44 (-GFP) in B35-Zellen	134
Abbildung 35: Western Blot Analyse von Src (-GFP) in N3EFL-Zellen	136
Abbildung 36: Western Blot Analyse von CD44 (-GFP) in N3EFL-Zellen	137
Abbildung 37: Morphologie nach Src-GFP-Überexpression in B35-Zellen	139
Abbildung 38: Immunofluoreszenzfärbung von Src-GFP-überexprimierenden B35-Zellen	140
Abbildung 39: Zellfortsatzinduktion nach Src-GFP-Überexpression in B35-Zellen	141
Abbildung 40: Zellfortsätze nach Src-GFP-Überexpression in N3EFL-Zellen	142
Abbildung 41: Markerfärbung nach Ausdifferenzierung der glialen Vorläuferzellen	143
Abbildung 42: Markerfärbung nach Überexpression der Kandidatengene	144
Abbildung 43: Kolokalisation von A2B5 und EGFR oder Src in N3EFL-Zellen	146
Abbildung 44: Markerfärbung nach CD44-Überexpression und Faktorenentzug	147
Abbildung 45: Proliferationsnachweis mittels BrdU-Färbung	148

### **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Abkürzungen	VI
Tabelle 2: Die Kandidatengene	16
Tabelle 3: Geräte	34
Tabelle 4: Mikroskope	36
Tabelle 5: Zentrifugen	37
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien	37
Tabelle 7: Chemikalien	39
Tabelle 8: Wachstumsfaktoren und Bestandteile der Zellkulturgefäßbeschichtung	48

Tabelle 9: Supplemente des Migrationsassays	51
Tabelle 10: Eukaryotische Zelllinien	55
Tabelle 11: Tiere	56
Tabelle 12: Plasmide	56
Tabelle 13: Primer	57
Tabelle 14: Primärantikörper	58
Tabelle 15: Sekundärantikörper	59
Tabelle 16: Transfektionsansätze mit ExGen 500	70
Tabelle 17: Nucleofektionsparameter	71
Tabelle 18: PCR Temperaturzyklen	84
Tabelle 19: Zusammensetzung Polyacrylamidgele	90
Tabelle 20: Mittlere Geschwindigkeiten und Segmentgeschwindigkeiten der Kandidatengen- überexprimierenden B35-Zellen im Vergleich	116



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Zentrale Nervensystem

Das Zentrale Nervensystem (ZNS) ist das Hauptorgan der Informationsverarbeitung und besteht bei den Vertebraten aus Gehirn und Rückenmark (Alberts (2004)). Es setzt sich aus drei verschiedenen Hauptklassen von neuronalen Zellen zusammen: den Neuronen, den Astrozyten und den Oligodendrozyten (Peters *et al.* (1991)).

### 1.1.1 Myelin und Oligodendrozyten

Oligodendrozyten sind myelinbildende Gliazellen des ZNS der Vertebraten. Sie bilden die Myelinhülle um Axone, indem sie schichtweise ihre eigene Plasmamembran in einer dicht gepackten Spirale um das Axon wickeln. Dadurch wird die Membran des Axons isoliert, so dass nur wenig Strom über sie verloren gehen kann (Alberts (2004)). Die Myelinscheiden bewirken die saltatorische Weiterleitung von Aktionspotentialen (Bunge (1968), de Castro und Bribian (2005)). Ein einzelner Oligodendrozyt kann bis zu 60 Axone, abhängig von ihrem Durchmesser, myelinisieren (Miller (2002)). Die Myelinisierung ist Voraussetzung für die normale Funktion des reifen ZNS. Die Zerstörung des ZNS-Myelins durch Verletzungen, pathologische Degeneration (Waxman (1992)) oder genetische Defekte, wie zum Beispiel bei der Metachromatischen Leukodystrophie (s. 1.1.2.1), führt zu funktionellen Defekten und oft zu einer Reduktion der Lebenserwartung. In den meisten Vertebraten, einschließlich dem Menschen, findet ein Großteil der Myelinisierung postnatal statt und verläuft beim Menschen noch einige Jahre nach der Geburt weiter (Miller (2002)).

#### 1.1.1.1 Wanderung und Ausdifferenzierung der Oligodendrozyten-Vorläufer

Im Säugetier-ZNS entstehen die meisten postmitotischen Zellen in bestimmten Proliferationszonen, von denen die Zellen wegmigrieren, um ihren zum Teil beträchtlich entfernten Ort im reifen Gehirn zu erreichen. Die verschiedenen Zelltypen (Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten) interagieren, um die komplexeste Struktur des Körpers zu bilden, das ZNS. Um dies zu gewährleisten, müssen die Migrationsabläufe zusammen mit der Etablierung extrem spezifischer

Verbindungen zwischen den Neuronenstrukturen präzise reguliert werden (Brown (1991)).

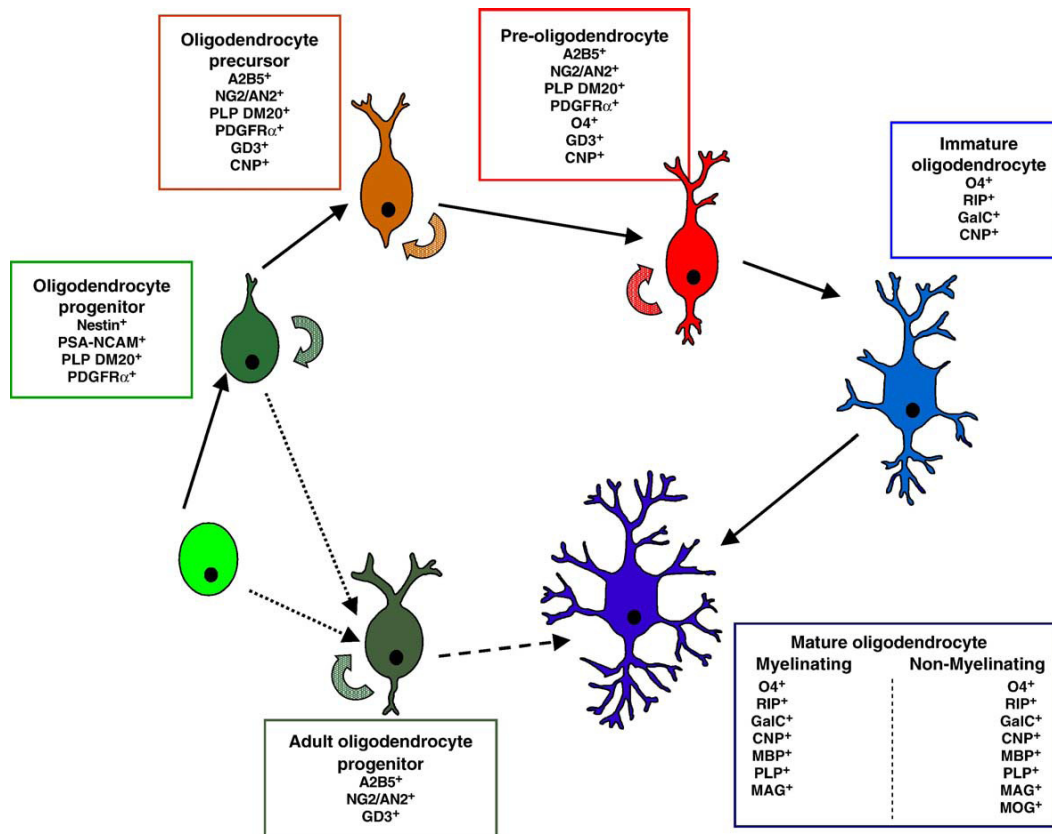
Im adulten Gehirn sind die Oligodendrozyten nahezu homogen in der weißen Substanz des Zentralen Nervensystems verteilt (Mallon *et al.* (2002), Miller (1996)). Diese Zellen entwickeln sich vom Oligodendrozyten-Progenitor ausgehend über den Oligodendrozyten-Precursor bis hin zum unreifen und reifen Oligodendrozyten, wie in Abbildung 1 dargestellt ist. Durch Wachstumsfaktoren angetrieben, proliferieren die Vorläuferzellen sehr stark, größtenteils in der weißen Substanz. Sobald genügend Precursor-Zellen generiert wurden, differenzieren die Vorläuferzellen zu unreifen Oligodendrozyten aus. Während dieses Prozesses erhöhen die Zellen sukzessive ihre Expression von myelinassoziierten Molekülen und bilden Myelinscheiden um die entsprechenden Axone aus (Miller (2002)).

Die Differenzierung zum Prä-Oligodendrozyten äußert sich morphologisch in der Erhöhung der Ausläuferanzahl. Darüber hinaus beginnen die Zellen zu diesem Zeitpunkt den Oberflächenmarker O4 zu exprimieren (Sommer und Schachner (1981)). Prä-Oligodendrozyten sind weiterhin teilungsfähig, migrieren aber langsamer als die in der Entwicklung vor ihnen stehenden Vorläuferzellen (Hardy und Reynolds (1993), Small *et al.* (1987), Baumann und Pham-Dinh (2001)). Im nächsten Reifungsschritt verlieren die Zellen das A2B5-Oberflächenantigen und differenzieren zum unreifen Oligodendrozyten. *In vitro* beginnen sie anschließend nach Pfeiffer *et al.* (1993), die myelinspezifischen Proteine in der Reihenfolge CNP, MBP, MAG und PLP zu produzieren. Jeder Schritt während des Reifungsprozesses, von der Vorläuferzelle bis hin zum reifen myelinisierenden Oligodendrozyten, kann somit über die Veränderung der Zellmorphologie und über die Expression verschiedener immunzytochemischer Marker identifiziert werden (Rowitch (2004), Pfeiffer *et al.* (1993)). Die Entwicklung und Migration der Oligodendrozyten wurde am intensivsten im Rückenmark und an dem Optischen Nerv untersucht (Miller (2002)).

Die Vorläuferzellen entstammen aus vielen, aber diskreten Stellen entlang des Neuralrohrs (de Castro und Bribian (2005)). Die räumliche Trennung zwischen dem Ursprungsort der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und ihrem endgültigen Bestimmungsort bedeutet, dass die Myelinisierung der Neurone von einer Wanderung über weite Distanzen der Vorläuferzellen abhängig ist (Miller (2002)). Sie müssen aktiv durch das ZNS migrieren und an der richtigen Stelle stoppen. Dabei werden sie von "short-range"- und "long-range"-Lockstoffen und Inhibitoren geleitet.

Verschiedene Komponenten der Extrazellulären Matrix (s. 1.2.3.1) inhibieren oder fördern als „*short-range*“-Signale die Migration der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen. Während verschiedene Wachstumsfaktoren als „*long-range*“-Lockstoffe die Migration fördern, können die „*long-range*“ Signale, ausgelöst durch Netrin oder Semaphorin, die Migration positiv oder negativ beeinflussen (Jarjour und Kennedy (2004)).

Nur differenzierte Oligodendrozyten können Myelin bilden, wohingegen undifferenzierte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ein höheres Potential zur Migration besitzen. Da ausdifferenzierte Oligodendrozyten also nicht migrieren können, ist es nicht verwunderlich, dass die Kontrolle über die Differenzierung und die Migrationsfähigkeit eng miteinander verbunden sind (Miller (2002)).



**Abbildung 1: Der Reifungsprozess der Oligodendrozyten (de Castro und Bribean (2005))**

Während der Entwicklung findet eine progressive Differenzierung vom Oligodendrozyten-Progenitor zum reifen Oligodendrozyten statt. Eine Reihe von verschiedenen Zellmarkern, aufgeführt in den Rechtecken (Bedeutungen s. Abkürzungsverzeichnis), werden zur Identifizierung der verschiedenen Entwicklungsstadien während des Reifungsprozesses der Oligodendroglia genutzt.

Die Kapazität zur Selbsterneuerung bestimmter Stadien ist durch die halbrunden Pfeile indiziert. Die restlichen Pfeile zeigen den Differenzierungs- und Reifungsprozess an.

### **1.1.2 Demyelinisierende Erkrankungen des Zentralen Nervensystems**

Im Vergleich zur relativ leicht erneuerbaren Epidermis scheint das ZNS eines Säugetiers kaum regenerierbar zu sein (Alberts (2004)).

Neben traumatischen Verletzungen können die Gründe für Dysfunktionen des ZNS vielfältig sein. Viele neurologische Krankheiten wie Morbus Parkinson, Schlaganfall oder Multiple Sklerose (MS) resultieren aus einem Verlust von Neuronen oder Gliazellen (Lindvall und Kokaia (2006)). Für eine Demyelinisierung des Zentralen Nervensystems sind aus klinischer Sicht die folgenden beiden Hauptgründe verantwortlich:

1. genetische Abnormalitäten, die Gliazellen betreffend (Leukodystrophien),
2. oder Entzündungen des Myelins und der Oligodendrozyten (als bekanntestes Beispiel dafür sei hier die MS erwähnt).

Ungeachtet der Gründe für eine Demyelinisierung resultiert aus dem Verlust des Myelins an einem Internodium immer eine Verlangsamung oder eine Blockade der Reizweiterleitung (Franklin und French-Constant (2008)) und die Patienten leiden unter vielfältigen neurologischen Problemen, welche mitunter bis zum Tode führen können (s. 1.1.2.1)

#### **1.1.2.1 Metachromatische Leukodystrophie**

Im Falle der Metachromatischen Leukodystrophie (MLD) entwickeln die Patienten eine Ataxie, eine schlaffe und spastische Parese, eine Optikusatrophie und Demenz. Nach mehreren Jahren des Leidens sterben sie letztendlich (Gieselmann (2008)). Die MLD ist eine lysosomale Speichererkrankung, welche autosomal-rezessiv vererbt wird. Die Erbkrankheit basiert zumeist auf einem Defekt der Arylsulfatase A (ASA) (Austin *et al.* (1963)). Bei den Patienten ist die Expression dieses Enzyms fehlerhaft oder gar nicht vorhanden. Arylsulfatase A und deren Aktivatorprotein Saposin B katalysieren den ersten Schritt der Degradation von Sulfatid. Aus der Fehlfunktion des Enzyms resultiert eine Akkumulation dieses Lipids in den Lysosomen von Oligodendrozyten, Schwann-Zellen, Neuronen und epithelialen Zellen. Oligodendrozyten sind die myelinisierenden Zellen des ZNS (s. 1.1.1), Schwann-Zellen haben diese Funktion im peripheren Nervensystem. Durch die Überladung mit Sulfatid gehen diese Zellen auf noch ungeklärte Weise zugrunde. Daraus folgt eine progressive Demyelinisierung im Nervensystem. Die therapeutischen Möglichkeiten sind begrenzt (Figura *et al.* (2001)).

Enzymersatztherapien im Tier lassen Hoffnung auf eine Linderung des Krankheitsbildes zu (Matzner *et al.* (2009), Matzner *et al.* (2008)) und befinden sich derzeit in Dänemark in klinischen Studien der Phase I und Phase II (Gieselmann (2008)), allerdings sind dazu noch keine Resultate bekannt. Einige Patienten wurden auch bereits mit hämatopoetischen Stammzelltransplantationen behandelt (Krivit *et al.* (1999), Malatack *et al.* (2003)). Jedoch sind die Meinungen über die Effektivität dieser Behandlung bei MLD-Patienten immer noch kontrovers (Gieselmann (2008)). Die Studien von Klein *et al.* (2006) mit ASA-überexprimierenden murinen embryonalen Stammzellen lieferten den ersten *in vivo* Beweis dafür, dass ES-Zellen als potentielle Donorquelle für die zellvermittelte Enzymersatztherapie bei Speicherkrankheiten, wie der MLD, fungieren können.

### **1.1.3 Zellersatz im Zentralen Nervensystem**

Derzeit werden zwei Hauptansätze für Therapien mit Hilfe von Stammzellen in Tiermodellen mit Demyelinisierung getestet. Zum einen die exogene Therapie, Zellersatz durch Transplantation, und zum andern die endogene Reparatur durch Unterstützung der vorhandenen Stamm- und Vorläuferzellpopulationen im adulten ZNS (Franklin und Ffrench-Constant (2008)).

Die Zelltransplantation ins ZNS findet bereits seit längerem ihre Anwendung, um das Überleben von neuralem Spendergewebe, die Stimulation axonaler Regeneration und funktionelle Effekte zu studieren (Bjorklund (1991)). Dennoch stellt der Therapieansatz der Zelltransplantation eine große Herausforderung dar. Im Vergleich zu anderen Organen ist eine Transplantation ganzer Teile des ZNS aufgrund des komplizierten Netzwerks von neuronalen Verknüpfungen nicht durchführbar. Stattdessen müssen bei einer Transplantation ins Nervengewebe unreife Vorläuferzellen in die bestehende Architektur inkorporiert und dort zur Ausreifung gebracht werden. Nachgewiesen ist bereits, dass die Transplantation von Stammzellen ins verletzte Rückenmark zur Besserung der verloren gegangenen Funktionen beitragen kann (McDonald *et al.* (1999), Ogawa *et al.* (2002)). Die Studie von Cummings *et al.* (2005) hat gezeigt, dass die Transplantation von humanen neuronalen Stamm-Zellen (NS-Zellen) in das verletzte Rückenmark der Maus die Bildung neuer Neurone und Oligodendrozyten zur Folge hatte, was ebenfalls zu einer Verbesserung der motorischen Fähigkeiten führte. Demyelinisierte Zonen im Gehirn und Rückenmark von MS-Mausmodellen konnten durch die Transplantation von

humanen adulten (Windrem *et al.* (2004)) und aus ES-Zellen abgeleiteten (Nistor *et al.* (2005)) Oligodendrozyten-Precursor-Zellen (OPC) remyelinisiert werden. Die Transplantationen von Zellen verschiedener Herkunft, wie des fetalen Gehirns, neuroepithelialer oder teratocarcinomaler Zelllinien aus dem Knochenmark oder der Nabelschnur bewirkten einige Verbesserungen bei Tieren und in einer klinischen Studie mit Schlaganfallpatienten. Darüber hinaus haben klinische Studien mit der Transplantation von humanen fetalen dopaminergen Neuronen gezeigt, dass der Zellersatz lang anhaltende Verbesserungen der Symptome bei Morbus Parkinson Erkrankten haben kann (Lindvall *et al.* (2004)).

Nach Franklin und French-Constant (2008) erforderten die multifokalen und diffusen Krankheiten wie MS oder Leukodystrophien viele Injektionsstellen. Dabei bringe jede Implantation ein Restrisiko der intracerebralen Blutung mit sich. Deshalb sei es wünschenswert, andere Methoden zu finden, bei denen sich die transplantierten Zellen von der Injektionsstelle weiter ausbreiteten.

Die Zellen sollten also Oligodendrozytenvorläuferzellen sein, um migrierfähig zu sein und im ausdifferenzierten Zustand remyelinisieren zu können. Da bei genetischen Myelindefekten keine endogenen Vorläuferzellen verfügbar sind, stellt die Zelltransplantation mit anschließender homogener Verteilung im ZNS einen Therapieansatz dar.

### **1.1.3.1 Embryonale Stammzellen**

Der Begriff der „embryonalen Stammzellen“ (ES-Zellen) wurde eingeführt, um diese von den Teratocarcinom abgeleiteten pluripotenten embryonalen Carcinomzellen unterscheiden zu können. ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse von Blastocysten gewonnen. Sie sind pluripotent und können somit in alle Zell- und Gewebetypen ausdifferenzieren (Martin (1981)). Nach Alberts (2004) ist eine ES-Zelle eine „Zelle, die aus der inneren Zellmasse des frühen Säugerembryos gewonnen wurde. Aus ihr können alle Zellen des Körpers entstehen. Sie kann in Kultur wachsen, genetisch verändert und in eine Blastocyste eingebracht werden, um sie zu einem transgenen Tier zu entwickeln.“

Vor fast 28 Jahren wurden von zwei unabhängigen Gruppen zum ersten Mal murine ES-Zellen isoliert (Martin (1981), Evans und Kaufman (1981)). In den folgenden Jahren konnten die pluripotenten Zellen auch von anderen Spezies gewonnen werden, wie zum Beispiel von Vögeln (Pain *et al.* (1996)), vom Affen (Thomson *et al.*

(1995)), von der Ratte (Iannaccone *et al.* (1994)) und vom Schwein (Wheeler (1994)). Die Isolierung humaner ES-Zellen wurde erstmals von Thomson *et al.* (1998) beschrieben. Auch die humanen ES-Zellen behielten das Potential, in alle drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm und Ektoderm) auszudifferenzieren. Bereits damals wurde davon ausgegangen, dass diese Zelllinien nützlich für die humane Entwicklungsbiologie, Medikamentenentwicklung und Transplantationsmedizin sein könnten (Thomson *et al.* (1998)). Ihre nahezu uneingeschränkte Vermehrbarkeit (Smith *et al.* (1988)) und bereits oben erwähnte Pluripotenz machen ES-Zellen zu einer viel versprechenden Donorquelle für Transplantationsstrategien.

Die Aussicht, aus ES-Zellen abgeleitete somatische Vorläuferzellen für Transplantationszwecke nutzen zu können, bewirkte eine intensive Suche nach Aufreinigungsstrategien. Die neurale Differenzierung von ES-Zellen wurde zunächst vielfach durch die Zugabe von Retinsäure induziert. Das Resultat waren oft gemischte Zellpopulationen, in denen neurale Elemente nur einen Teil der Gesamtpopulation ausmachten (Bain *et al.* (1995), Finley *et al.* (1996), Fraichard *et al.* (1995), Strubing *et al.* (1995)). Es folgte das Generieren von neuronalen Vorläuferzellen ohne die Zugabe von Retinsäure in definierten Medien (Okabe *et al.* (1996)). Auf diese Weise konnten erstmals Brüstle *et al.* (1999) hoch aufgereinigte gliale Vorläuferzellen aus ES-Zellen der Maus gewinnen. Durch eine Kombination von gerichteter Differenzierung und Lineage-Selektion genetisch manipulierter muriner ES-Zellen haben Glaser *et al.* (2005) eine homogene Zellpopulation muriner oligodendroglialer Vorläuferzellen generiert. Die murinen ES-Zellen enthielten ein Neomycin-Resistenz-Gen unter Kontrolle des oligodendrozytenspezifischen CNP-Promotors I und II (CNP- $\beta$ geo) der Maus. Nach Transplantation dieser homogenen Zellpopulation ins Rückenmark postnataler Ratten konnte die Ausreifung in myelinisierende Oligodendrozyten nachgewiesen werden.

## 1.2 Zellmigration

Der Begriff der Migration wird von dem lateinischen „*migrare*“ abgeleitet, was übersetzt „wandern“ bedeutet und die aktive Fortbewegung der Zellen beschreibt. Während die schwimmenden Spermien eine Ausnahme bilden, bewegen sich die meisten Zellen im tierischen Organismus kriechend fort.

Der Zellmigration kommt in der Komplexität des tierischen Organismus besondere Bedeutungen zu. Ohne diesen Mechanismus wäre die Embryogenese undenkbar. Während dieses Entwicklungsprozesses wandern einzelne Zellen sowie ganze Epithelschichten, um das Gewebe und die Organe eines Tieres zu bilden. Aber auch im adulten Körper migrieren Zellen als Folge einer Immunantwort oder bei der Erneuerung von Geweben. Darüber hinaus gehen viele pathologische Prozesse wie chronische Entzündungen und Metastasenbildungen bei der Tumorentwicklung mit einer Zellmigration einher (Alberts (2004)).

Von Lauffenburger und Horwitz (1996) wurde die Zellmigration im Allgemeinen als zyklischer Prozess interpretiert, der in vier Schritte aufgeteilt werden kann:

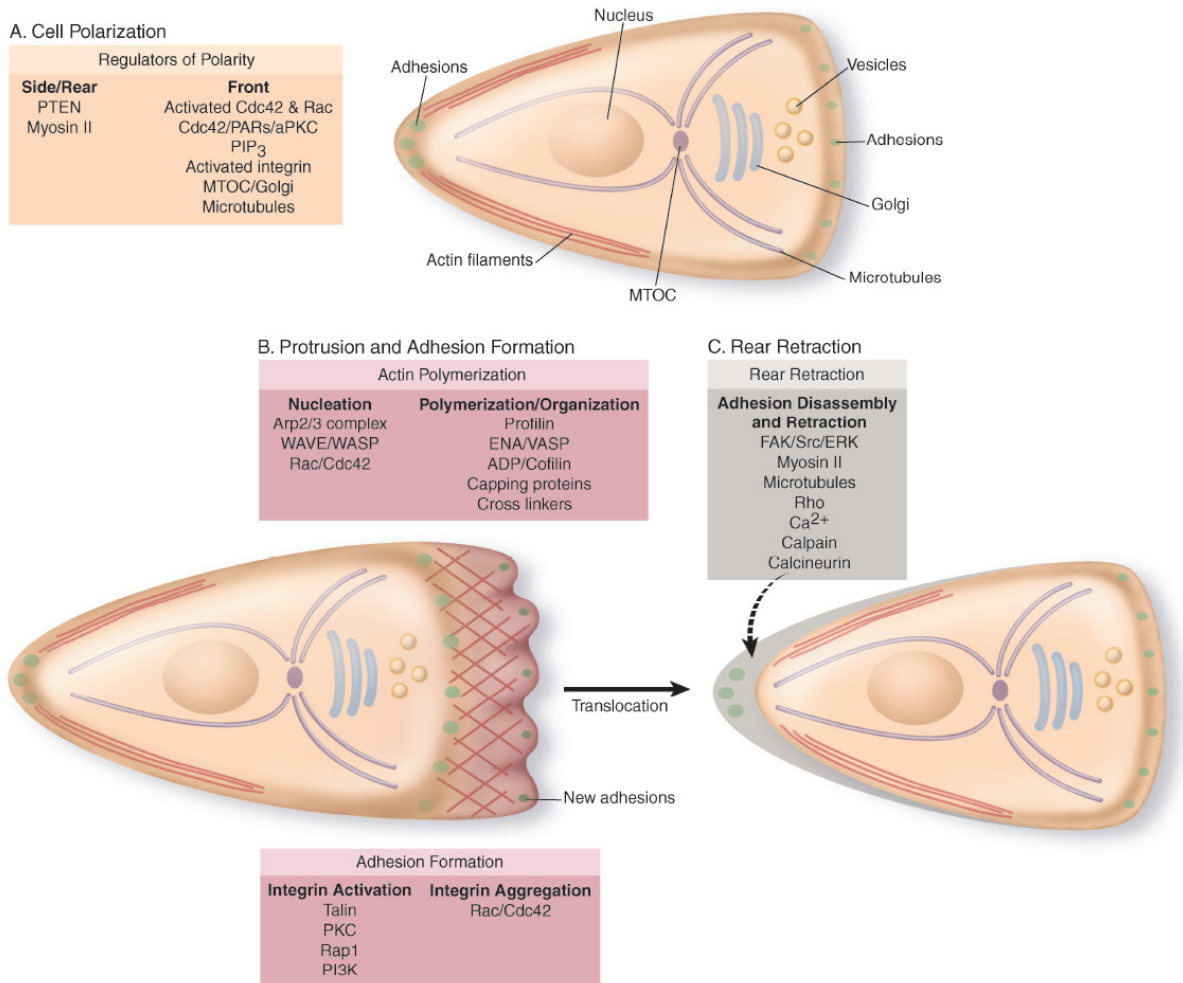
1. Polarisierung der Zelle, mit Ausbildung einer Vorder- und Rückseite und das Hervorstülpen von Protrusionen in Migrationsrichtung
2. Bildung neuer Adhäsionskontakte
3. Kontraktion des Zellkörpers
4. Retraktion des Zellendes sowie die Auflösung von Adhäsionsstellen an der Zellrückseite.

Ridley *et al.* (2003) hingegen gliedern den Migrationsprozess in drei Schritte (s. Abbildung 2):

1. Polarisierung der Zelle mit Ausbildung einer Vorder- und Rückseite
2. Hervorstülpen von Protrusionen in Migrationsrichtung und Bilden von Adhäsionskontakten
3. Retraktion des Zellendes.

Anhand des neueren Modells (Ridley *et al.* (2003)) wird im Folgenden der Prozess der Zellmigration dargestellt.





**Abbildung 2: Der Zyklus der Zellmigration und diverse Einflussfaktoren (Ridley *et al.* (2003))**

Die Zellmigration ist ein Zusammenspiel aus vielen Prozessen, welche aus der Interaktion vieler Signalwege resultieren. Diverse Proteine, wie die kleinen GTPasen, Tyrosinkinasen, Phosphatasen und viele weitere Proteine, sind in dieses Zusammenspiel involviert. Einige davon sind in den farbigen Kästchen zusammengefasst (Bedeutungen s. Abkürzungsverzeichnis).

An diesem komplexen Vorgang des Kriechens ist das Aktinzytoskelett unter der Plasmamembran der Zelle maßgeblich beteiligt (Alberts (2004)).

### 1.2.1 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett der eukaryotischen Zelle sorgt für die räumliche Organisation des Zytoplasmas und der Plasmamembran. Es ist nicht nur an der Zellmigration, sondern unter anderem auch an dem intrazellulären Transport der Organellen beteiligt und gibt der Zelle Stabilität bei äußeren mechanischen Belastungen.

Die Strukturen des Zytoskeletts durchziehen die Zelle von einem zum anderen Ende. Dieses Netzwerk setzt sich aus drei Hauptarten von dynamisch auf- und abbaubaren Filamenten zusammen. Dazu gehören:

1. Die polaren Mikrotubuli: Sie leiten den intrazellulären Transport und bestimmen die Lokalisation membranumschlossener Organellen. Die festen starren Hohlzylinder bestehen aus Tubulin.
2. Die nicht polaren Intermediärfilamente: Sie sorgen für die mechanische Festigkeit gegenüber Scherkräften. Die seilartigen Strukturen sind biegsam und schwer zu brechen. Sie setzen sich aus den Intermediärfilament-Proteinen zusammen.
3. Die polaren Aktinfilamente: Sie legen die Oberflächenstruktur der Zelle fest und sind für die Zellmigration erforderlich. Diese zweisträngigen helikalen Polymere bestehen aus dem Protein Aktin.

Für die Formgebung der Zellen sowie deren Migration ist die Koordination der Aktivitäten aller drei Filamentstrukturen unabdingbar. Hinzu kommt das Mitwirken einer Vielzahl von Hilfsproteinen. Für die Zellmigration ist das Aktin von besonderer Bedeutung, da unter anderem die Polymerisation der Mikrofilamente der Bewegung des Leitsaums zugrunde liegt (Alberts (2004)).

### **1.2.2 Protrusion des Leitsaums**

Die Bewegung einer Zelle beginnt mit der Polarisation. Viele verschiedene Moleküle können als externe Reize eine Zellmigration initiieren. Einige Moleküle rufen einen migratorischen Phänotyp hervor (chemokinetisch). Sie können als Gradient entweder in Lösung (chemotaktisch) oder als Substrat (haptotaktisch) die Migration in eine bestimmte Richtung leiten (Horwitz und Webb (2003)).

Die Protrusion nach vorne, als nächster Schritt der Zellmigration, scheint hauptsächlich auf der Aktinpolymerisation zu beruhen (Alberts (2004)).

Bei der Polymerisation lagern sich die globulären Aktinmonomere (G-Aktin) zu polaren Aktinfilamenten (F-Aktin) zusammen. Alle Aktinmonomere sind in der gleichen Richtung entlang einer helikalen Struktur angeordnet. Dabei entstehen zwei deutlich unterschiedliche Enden des Aktinfilaments. Das so genannte Plusende wird als „hakenförmig“ (*barbed*) und das Minusende als „spitz“ (*pointed*) bezeichnet (Berg (2007)). Verschiedene aktinbindende Proteine sind an der Polymerisation bzw. Depolymerisation des Aktinzytoskeletts beteiligt. Profilin zum Beispiel bindet an Aktinmonomere und verhindert auf diese Weise die *de novo* Nukleation von F-Aktin. So genannte kappenbildende Proteine hingegen verhindern die Verlängerung der Filamente, so dass die Polymerisation des F-Aktins auf die Nähe der

Plasmamembran beschränkt ist. Cofilin dagegen stellt Aktinmonomere bereit, indem es ältere Filamente am Minusende depolymerisiert (Pollard und Borisy (2003)).

Beim Herausdrücken der Plasmamembran während der Protrusion bilden sich zwei Arten von Strukturen aus. Zum einen die Filopodien, welche sich eher eindimensional mit einem Kern aus langen und dünnen Aktinfilamenten darstellen. Zum anderen die Lamellipodien. Diese sind zweidimensional und kommen blattähnlichen Strukturen gleich (Alberts (2004)).

Die Aktinpolymerisation in Lamellipodien wird durch den ARP2/3-Komplex vermittelt, der sich an die Seiten oder an die Spitze von bereits vorhandenen Aktinfilamenten anlagert und dort die Bildung neuer „Tochterfilamente“ herbeiführt (Welch und Mullins (2002), Pollard und Borisy (2003)). Die Proteine der WASP (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein)-Familie dienen als Aktivatoren dieses Komplexes (Machesky und Gould (1999)). Die Hauptaufgabe der WASP-Familie besteht darin, Signale auf das Zytoskelett zu übertragen (Mullins (2000)). Der Hauptmechanismus der WASP-Aktivierung verläuft über eine Bindung der kleinen Rho-GTPasen Cdc42 an die GDB-Domäne (Miki und Takenawa (1998)) und ebenso von PIP(2) an die N-terminal davon gelegene basische Region (Higgs und Pollard (2000)). Von Keratinozyten abgetrennte Lamellipodien können sogar trotz des Fehlens des Zellkerns, der Zentrosomen, der Mikrotubuli und der meisten Organellen autonom migrieren (Euteneuer und Schliwa (1984), Svitkina *et al.* (1997)).

Bei der Protrusion von Filopodien werden durch den so genannten Tretmühlen-Mechanismus am Plusende des Aktinpolymers Aktinmonomere eingebaut, während diese am Minusende abgebaut werden. Nach Faix und Rottner (2006) induziert ein sogenannter *filopodium tip complex* (FTP) die Bildung von Filopodien und unterstützt so die Ausbildung von Aktinbündeln. An der Spitze von Filopodien befinden sich viele Proteine. Die aktinbindenden Proteine der Ena/VASP-Familie verhindern die Kappenbildung sowie die Verzweigung der Aktinfilamente. Auf diese Weise kommt es zu einer ständigen Verlängerung der Filamente. Zusätzlich verknüpft das Bündelungsprotein Fascin die Aktinfilamente in Parallelanordnung. Dies bewirkt möglicherweise die Festigkeit der Filopodien, die das effiziente Nachvorneschieben der Plasmamembran in diesen Strukturen erlaubt (Welch und Mullins (2002)). Darüber hinaus sorgt dieses Bündelungsprotein durch einen sehr schnellen Wechsel zwischen Bindung und Ablösung vom Aktin (die

Affinität von Fascin zu Aktinfilamenten wird durch Phosphorylierung verhindert) für eine hohe Dynamik der Filopodien (Aratyn *et al.* (2007)).

Für Lamellipodien und Filopodien sind die kleinen GTPasen wichtige Regulatoren des Aktinzytoskeletts. Sie werden konformativ durch die Bindung von GTP und GDP reguliert. An GTP gebunden befinden sie sich im aktiven Zustand und interagieren mit ihren *downstream* Partnern. Diese sind unter anderem Proteinkinasen und Aktivatoren des bereits oben erwähnten ARP2/3-Komplexes (Etienne-Manneville und Hall (2002)). Rho-GTPasen werden durch GEFs (guanine nucleotide exchange factors) aktiviert und durch GAPs (GTPase activating proteins) inaktiviert. Von den Rho-GTPasen werden Rac, Cdc42 und RhoG für die Protrusion von Lamellipodien und Filopodien benötigt (Ridley *et al.* (2003)).

Durch diese Prozesse kommt es zu einem Nettofilamentaufbau am Leitsaum der Zelle, wodurch sich das Netzwerk aus Aktinfilamenten als Ganzes vorwärts bewegen kann (Pollard und Borisy (2003)).

### **1.2.3 Bildung von Adhäsionskontakten und Retraktion des Zellendes**

Die Zellmotilität und die Zelladhäsion sind zwei eng miteinander verknüpfte Prozesse. Bei der Zelladhäsion handelt es sich um einen Mechanismus, bei dem Zellen an andere angrenzende Zellen (Zell/Zell-Adhäsion) und/ oder an die extrazelluläre Matrix (EZM) (Zell/Matrix-Adhäsion) binden.

Die Zellen haften dabei über Zelloberflächenproteine, den Zelladhäsionsmolekülen, aneinander oder an der EZM. Dabei sind die Cadherine die wichtigsten Zelladhäsionsmoleküle, die für  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zell/Zell-Adhäsionen in Vertebraten zuständig sind. Integrine stellen die wichtigsten Rezeptoren dieser Art bei der Zell/Matrix-Adhäsion dar (Alberts (2004)).

Integrine bestehen aus zwei nicht kovalent verbundenen Transmembranglykoproteinen, der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit (Friedl *et al.* (1998)). Diese besitzen extrazelluläre Ligandenbindungsdomänen und einen kurzen zytoplasmatischen *tail*. Die Bindung von Liganden an den extrazellulären Teil der Integrine führt zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren. Daraus resultieren Veränderungen der Interaktionen der zytoplasmatischen Domänen der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Ketten (Emsley *et al.* (2000)) und dies führt zum Integrin *clustering*. Dabei häufen sich die Integrine an der Kontaktstelle mit der Matrix an. Ridley *et al.* (2003) bezeichnen die Integrine als die Füße ("*feet*") der migrierenden Zelle, welche die

Zelladhäsion unterstützen und über Ankerproteine mit den intrazellulären Aktinfilamenten verbunden sind. Nach Bindung des Integrins an seinen Liganden in der Matrix, heftet sich die zytoplasmatische Domäne der  $\beta$ -Untereinheit an diverse intrazelluläre Ankerproteine, wie Talin,  $\alpha$ -Actinin und Filamin. Diese binden entweder direkt oder über weitere Ankerproteine, wie Vinculin an Aktin, und bilden so die Verbindung zwischen den Integrinen und den Aktinfilamenten in der Zellrinde (Alberts (2004)). Daraus resultieren intrazelluläre Signale, wie die Tyrosinphosphorylierung an Proteinen oder die Aktivierung von den kleinen GTPasen (Geiger *et al.* (2001)). Viele Signalgebungsfunktionen der Integrine sind dabei abhängig von einer zytosolischen Tyrosinkinase, der Fokaladhäsions-Kinase (FAK). Die sich anhäufenden FAK-Moleküle phosphorylieren sich wechselseitig an einem speziellen Tyrosinrest und bieten auf diese Weise eine Bindungsstelle für Mitglieder der Src-Familie (s. 1.3.2) der zytoplasmatischen Tyrosinkinasen (Alberts (2004)). Durch das Lösen der Fokaladhäsionen an der Zellrückseite kann die Zelle sich vorwärts bewegen (Frame *et al.* (2002)). Viele Krebszellen weisen vermehrt FAK auf. Dies könnte einer von vielen Hinweisen darauf sein, warum sie beweglicher sind als normale Zellen (Alberts (2004)). Auch die in dieser Arbeit verwendeten Krebszellen, B35-Neuroblastomzellen, zeichnen sich durch eine erhöhte Motilität aus (Schubert *et al.* (1974)).

Durch die Wirkung der Integrine als Transmembran-Kupplungen wird so die Form, Orientierung und Bewegung von Zellen reguliert (Alberts (2004)).

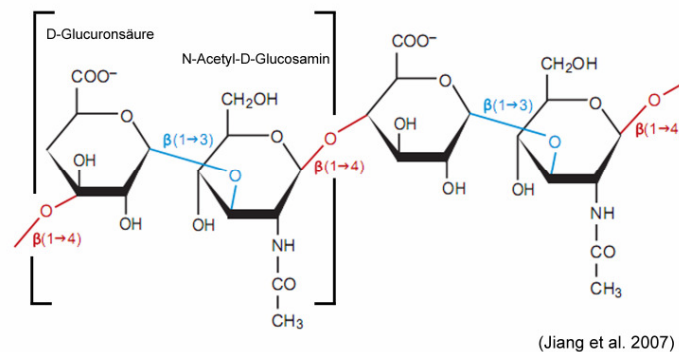
Der Migrationszyklus ist vollständig durchlaufen, sobald sich die Adhäsion abbaut und das Zellende hinterhergezogen wird. Dieser Abbau wird durch Signalwege, welche zum Beispiel FAK, ERK und Src beinhalten, kontrolliert. Die Retraktion am Zellende erfordert Rho-Kinasen und ist ein von Myosin abhängiger Prozess. Das Ablösen der Adhäsionen am Zellende und an der Frontseite scheint einigen ähnlichen Mechanismen zu unterliegen und mit der Ausbildung der Protrusionen am Vorderteil der Zelle zusammen zu hängen (Ridley *et al.* (2003)).

### 1.2.3.1 Hyaluronan als Komponente der Extrazellulären Matrix

Integrine binden hauptsächlich an die EZM. Somit sind während der Invasion die Interaktionen der Zellen mit der EZM sehr wichtig (Gentile und Comoglio (2004)). Der extrazelluläre Raum nimmt einen nicht unerheblichen Teil des tierischen Gewebes ein. Im adulten Säuger-ZNS sind dies ungefähr 20 % des Gesamtvolumens (Nicholson und Sykova (1998)).

Die Extrazelluläre Matrix besteht aus Proteinen und Polysacchariden, welche an bestimmten Stellen von Zellen ausgeschieden werden und mit ihrer Oberfläche in Verbindung bleiben. Die EZM beeinflusst die Bindung der Zellen aneinander, ihr Überleben, ihre Entwicklung, Form, Polarität und ihr Verhalten (Alberts (2004)).

Löffler und Petrides (2003) teilen die von verschiedenen Zelltypen sezernierten Proteine der EZM in vier Gruppen ein: die Kollagene als Hauptproteine der EZM, das Elastin, welches Strukturen elastische Eigenschaften verleiht, die nichtkollagenen Glykoproteine, wie Fibronectin und Laminin, und die Proteoglykane. Diese sind stark glykosylierte Proteine mit einem Polypeptidkern. An diesen sind Glykosaminoglykane (GAG) kovalent gebunden. GAG sind unverzweigte Polysaccharide, die aus Disaccharidgrundbausteinen bestehen.



**Abbildung 3: Molekularer Aufbau von Hyaluronan (Jiang et al. (2007))**

Hyaluronan ist eine Kette von  $\beta$  (1->4) glykosidisch miteinander verknüpften Disaccharideinheiten aus D-Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin.

Das einfachste GAG ist Hyaluronan (HA). Es enthält, anders als alle anderen GAG, keine sulfatierten Zucker, seine Disaccharideinheiten sind identisch (Alberts (2004)). Dabei sind D-Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin  $\beta$  (1->4) glykosidisch miteinander verbunden (Stern (2003)). HA ist ein hochmolekulares Polymer von bis zu  $2 \times 10^4$  kDa, welches in der EZM zu finden ist (Meyer und Palmer (1934), Fraser et al.

(1997), Lee und Spicer (2000)). Die Synthese von Hyaluronan findet nicht wie bei den anderen GAG im Golgiapparat statt, sondern wird von einem Komplex an der zytoplasmatischen Oberfläche der Plasmamembran (Prehm (1984)), einer Familie von HA-Synthasen (Weigel *et al.* (1997), Itano und Kimata (2002)) durchgeführt. Da das Molekül bis zu dem 1000-fachen seines eigenen Gewichtes an Wasser binden kann, dient es zum Beispiel als Schmiermittel in Gelenkflüssigkeiten (Engstrom-Laurent (1997)). Es ist somit ein raumfüllendes Molekül, welches das Gewebe auflockert, Platz für Zellbewegungen schafft und die Zell-Zellkontakte vermindert (Laurent (1998)). Darüber hinaus kann HA die Zellmigration direkt über Rezeptoren, welche mit dem Zytoskelett interagieren, beeinflussen (Entwistle *et al.* (1996), Bourguignon *et al.* (2001)). HA kann auch über Rezeptoren von der Zelle aufgenommen werden (Collis *et al.* (1998)). Beispiele dafür sind CD44 (s. 1.3.1) (Culty *et al.* (1992), Hua *et al.* (1993)) und RHAMM (Cheung *et al.* (1999)). Außerdem übernimmt es als Koregulator zellulären Verhaltens Aufgaben bei der Tumorprogression und Invasion (Toole und Hascall (2002)).

Im Gehirn bildet Hyaluronan das Grundgerüst der EZM. Außerdem finden sich dort hyaluronanbindende Proteoglykane und einige große Glykoproteine, während kein Kollagen vorhanden ist (Rauch (2007)). Baier *et al.* (2007) haben faserartige HA-Strukturen in dem sich entwickelnden Mauserebellum anfärben können. Sie beschreiben die Fasern als mögliche Migrationspfade für neurale Zellen während der Gehirnentwicklung.

### **1.3 Kandidatengene**

Gene, von denen aus der Literatur migrations- und/ oder invasionssteigernde Effekte bekannt waren, werden in der vorliegenden Arbeit als Kandidatengene (s. Tabelle 2) bezeichnet. Ihre Wirkung auf die Zellmigration und -invasion von neuronalen Vorläuferzellen wurde untersucht.

So haben zum Beispiel Ni *et al.* (2004) in ihrer Studie mit humanen neuronalen Vorläuferzellen herausgefunden, dass CXCR4 eine signifikante Beeinflussung auf die Migration neuraler Vorläuferzellen während der Entwicklung des Zentralen Nervensystems haben könnte. Chiaramello *et al.* (2007) zeigten, dass BDNF im subventrikulären System Einfluss auf die Neuroblastenmigration hat. Von Hyaluronan (s. 1.2.3.1) ist bekannt, dass es sich im entwickelnden Mauserebellum in faserartige Strukturen formiert, welche die gerichtete Migration neuraler Zellen während der

Gehirnentwicklung unterstützen könnte (Baier *et al.* (2007)). Aus diesem Grunde wurden die Effekte der Überexpression von Hyaluronanrezeptoren, wie CD44 (s. 1.3.1) und Lyve untersucht. HA und Hyaluronidase (Hyal), als HA-fragmentierendes Enzym, wurden als Supplemente hinzugefügt, da bekannt ist, dass sich unterschiedlich große HA-Fragmente verschieden auf die Zellmigration auswirken können (Udabage *et al.* (2005)). Als weiteres Supplement wurde Ionomycin verwendet. Ionomycin ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor, welches die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöht. Unter anderem durch die Studie von Guan *et al.* (2007) wurde gezeigt, welche Auswirkungen der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel auf die Zellmigration haben kann. Dort bewirkte eine durch Slit-2 induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Welle eine RhoA-Umorganisation und hatte eine Richtungsumkehr cerebraler Körnerzellen zur Folge. Darüber hinaus spalten intrazelluläre Proteasen, die Calpaine, welche durch  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert werden, einige Proteine, die an der Zelladhäsion und Motilität beteiligt sind. Dies betrifft Integrine, Cadherine und Fokale Adhäsionskinasen (Franco und Huttenlocher (2005)). Auch Src (s. 1.3.2) übt Einfluss auf Fokale Adhäsionskinasen und somit auf die Zellmigration aus (Frame *et al.* (2002)). NCAM hingegen gehört zu den Proteinen, welche für die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Zell/Zell-Adhäsion verantwortlich sind (Alberts (2004)).

**Tabelle 2: Die Kandidatengene**

Aufgelistet sind die oben beschriebenen Kandidatengene

<b>Kandidatengene</b>	
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i>
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
LYVE	<i>lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1</i>
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
Src	Src-Tyrosinkinase

Im Folgenden wird genauer auf die Kandidatengene eingegangen, welche in dieser Arbeit eine positive Auswirkung auf die Zellmigration und/ oder -invasion hatten.



### **1.3.1 Der Hyaluronanrezeptor CD44**

CD44 (*cluster of differentiation 44*) ist ein Transmembran-Glykoprotein der Klasse I (Ponta *et al.* (2003)). Der Hyaluronanrezeptor CD44 stellt als Adhäsionsmolekül Zell-Matrix-Adhäsionen her. Dabei bindet CD44 vor allem an Hyaluronan (s. 1.2.3.1), aber auch an andere EZM-Komponenten wie Kollagen, Fibronectin, Laminin und Chondroitin-Sulfat (Naor *et al.* (1997)). Er stellt unter den hyaluronanbindenden Proteinen den bedeutendsten Rezeptor auf der Zelloberfläche dar (Aruffo *et al.* (1990)). Die CD44-Proteine werden auf den meisten Vertebratenzellen, wie den epithelialen Zellen, bestimmten Immunzellen wie Makrophagen und Lymphozyten, sowie auf den Fibroblasten exprimiert (Jiang *et al.* (2007)). Im ZNS findet sich CD44 bei Astrozyten, Radialglia und Mikroglia (Akiyama *et al.* (1993), Girgrah *et al.* (1991), Girgrah *et al.* (1991a), Ikeda *et al.* (1996), Moretto *et al.* (1993), Vogel *et al.* (1992), Jones *et al.* (2000), Liu *et al.* (2002)). Oligodendrozyten (s. 1.1.1) scheinen, wenn überhaupt (Liu *et al.* (2002), Moretto *et al.* (1993)), nur geringfügig CD44 zu exprimieren (Bouvier-Labit *et al.* (2002)). Adulte Neuronen weisen das Protein nicht auf (Akiyama *et al.* (1993), Jones *et al.* (2000), Vogel *et al.* (1992)).

Die Struktur des Transmembran-Glykoproteins variiert durch alternatives Spleißen (Screaton *et al.* (1992)) und posttranslationale Modifikationen. Dies ist abhängig von Zelltyp und Wachstumsbedingungen (Lesley *et al.* (1993)). Dadurch entstehen mögliche CD44-Varianten mit einem scheinbaren Molekulargewicht zwischen 80 und 200 kDa (Stamenkovic *et al.* (1991)). Die verschiedenen Varianten werden im folgenden Kapitel 1.3.1.1 dargestellt.

#### **1.3.1.1 Struktur des Hyaluronanrezeptors CD44**

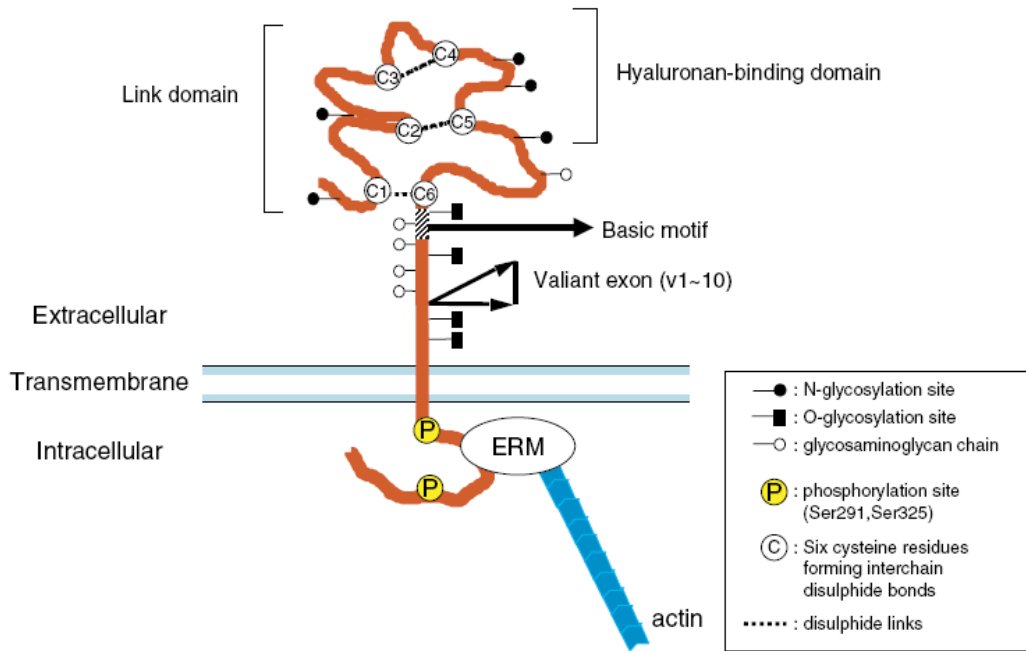
Die folgenden Beschreibungen zu der CD44-Rezeptor-Familie sind anhand von Abbildung 4 nachzuvollziehen. Das CD44-Protein setzt sich aus drei Domänen zusammen: Dem aminoterminalen extrazellulären Teil, der Transmembrandomäne und der zytoplasmatisch gelegenen carboxyterminalen Domäne.

Der aminoterminalen Teil weist ein Hyaluronanbinde-Motiv auf, welches sich in der link-Domäne befindet, und ein basisches Motiv, welches nicht in der link-Domäne lokalisiert ist (Naor *et al.* (1997a)). Für die Stabilität der globulären link-Domäne sorgen Disulfidbrückenbindungen zwischen hochkonservierten Cysteinresten (Day und Sheehan (2001)). Diese link-Domäne ermöglicht die Bindung von CD44 an Hyaluronan (Sherman *et al.* (1994)) und andere Glykosaminoglykane (GAG)

(Sleeman *et al.* (1997)). Die Affinität von CD44 zu den diversen GAG ist abhängig von posttranslationalen Modifikationen, wie zum Beispiel Glykolysierung (Skelton *et al.* (1998)). Die aminoternale globuläre Domäne ist von der Plasmamembran durch eine Stammstruktur getrennt. Die kleinste CD44-Isoform ist die Standardform (CD44s). Ihre Stammstruktur besteht aus 46 Aminosäuren. Durch den Einbau variabler Exone (v1-v10) kann sich diese Struktur beim Menschen bis hin zu 381 Aminosäuren (bei der Maus 423 Aminosäuren) vergrößern (Screaton *et al.* (1992)). Das Einfügen der variablen Exone ist nach König *et al.* (1998) abhängig von Mitogen-vermittelten Signalen. Proliferierende Zellen und Krebszellen (Naor *et al.* (1997)) exprimieren oft die größeren Varianten. Im normalen adulten ZNS ist hauptsächlich CD44s zu finden (Liu *et al.* (2004b)).

Der transmembrane Teil besteht aus 23 hydrophoben Aminosäuren und einem Cysteinrest. Dieser ist nach Liu und Sy (1997) an der kovalenten Homodimerisierung von Hyaluronanrezeptoren CD44, die Voraussetzung für eine effiziente Hyaluronanbindung ist, beteiligt. Darüber hinaus wird spekuliert, ob die Transmembrandomäne verantwortlich ist für die Bindung von CD44 an die so genannten *lipid rafts* (Neame *et al.* (1995), Perschl *et al.* (1995)). Auch die durch CD44-vermittelte endosomale Aufnahme von Hyaluronan, der der lysosomale Abbau folgt, soll von der Lokalisation des Rezeptors in den so genannten *lipid rafts* abhängig sein (Thankamony und Knudson (2006)).

Proteine, die an den zytoplasmatischen Teil binden, vermitteln die Interaktion des Rezeptors mit dem Zytoskelett (Ponta *et al.* (2003)). Dazu gehören Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) Proteine, welche an die Aminosäuren 292-300 binden (Legg und Isacke (1998)) und Ankyrin, was an die Aminosäuren 218-304 bindet (Lokeshwar und Bourguignon (1992)). ERM-Proteinen wird eine Bedeutung in der Regulation der Zellmigration und Zellform zugeordnet. Sie interagieren bei vielen Prozessen, die an der Umorganisation des Zytoskeletts und der Membran beteiligt sind. Diese Proteine sind in *ruffles*, Microvilli und Filopodien lokalisiert (Tsukita und Yonemura (1999)).



**Abbildung 4: Die Struktur des CD44-Proteins (Nagano und Saya (2004))**

Das CD44 Typ I-Transmembranprotein setzt sich aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen (intrazellulären) Domäne zusammen. Der extrazelluläre aminoterminele Teil wird auch als link-Domäne bezeichnet. Sechs Cysteine, welche durch Disulfidbrücken verbunden sind, geben der link-Domäne Stabilität. Dieser aminoterminele globuläre Teil besitzt ein Hyaluronanbinde-Motiv, welches sich an der link-Domäne befindet. Ein basisches Motiv ist außerhalb der link-Domäne lokalisiert. Die extrazelluläre Domäne kann durch posttranslationale Modifikation glykolysiert sein.

Die Stammstruktur kann durch den Einbau variabler Exone (v1-v10) (alternatives *Splicing*) vergrößert werden.

Die carboxyterminale zytoplasmatische Domäne interagiert unter anderem mit ERM-Proteinen, die mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind.

### 1.3.1.2 Funktionen des Hyaluronanrezeptors CD44

Die CD44-Proteine sind in viele zelluläre Prozesse, wie Zellwachstum, Überleben, Differenzierung und Zellmotilität (Ponta *et al.* (2003)) involviert. Während der Embryogenese (Wheatley *et al.* (1993)) und Angiogenese (Slevin *et al.* (2007)) spielt der Rezeptor eine Rolle. Auch an Entzündungsreaktionen und der Wundheilung (Huebener *et al.* (2008)) sowie an der axonalen Wegfindung (Lin und Chan (2003)) ist er beteiligt. Darüber hinaus spielt CD44 bei der Tumorzellentwicklung eine Rolle (Naor *et al.* (2002), Bourguignon (2008)).

Im Folgenden wird dargestellt, dass der Rezeptor an vielen zellulären Mechanismen beteiligt ist, welche die Zellmigration und/ oder -invasion beeinflussen. Da der Hyaluronanrezeptor in Tumorstammzellen zu finden ist (Bourguignon (2008)), wurde bereits vorgeschlagen, CD44 als Oberflächenmarker für Tumorstammzellen zu verwenden (Al-Hajj *et al.* (2003)). CD44 wird häufig in Zusammenhang mit

Tumorzelllinien und Metastasierung, was Zellmigration und -invasion impliziert, gebracht.

Im ZNS werden von hochinvasiven Astrozytomen neben CD44s auch einige Splicevarianten des Rezeptors exprimiert. Auch maligne Tumore des peripheren Nervensystems exprimieren CD44. Der Rezeptor hat vermutlich einen Einfluss auf die Tumorzellinvasion (Merzak *et al.* (1994), Okada *et al.* (1996), Radotra und McCormick (1997a), Radotra und McCormick (1997a), Wiranowska *et al.* (1998), Gunia *et al.* (1999), Breyer *et al.* (2000), Monaghan *et al.* (2000), Su *et al.* (2003), Su *et al.* (2004)). CD44 wird ebenfalls von Oligodendrogliomen (Hagel und Stavrou (1999), Bouvier-Labit *et al.* (2002)) und Schwannomen (Kuppner *et al.* (1992), Sherman *et al.* (1995), Sherman *et al.* (1997)) exprimiert.

Das Abspalten („*shedding*“) von CD44-Fragmenten scheint ebenfalls wichtig bei der Zellmigration und -invasion von Tumorzellen zu sein. Nagano und Saya (2004) beschreiben, dass aus dem *shedding* eine erhöhte Zellmigration resultiert. Die Koaktivierung von Proteinkinase C (PKC) und der kleinen GTPase Rac führt zur Akkumulierung der membranständigen Matrixmetalloproteinase ADAM17 („*a disintegrin and metalloproteinase*“ 17) am Leitsaum, welche die Ektodomäne des Rezeptors abspaltet. Dadurch löst sich die Zelle von der EZM, woraus eine bessere Migrationsfähigkeit resultiert. Die Ausdehnung des Lamellipodiums am Leitsaum hat eine mechanische Dehnung der Zelle am hinteren Ende zur Folge, wodurch es zu einem Einstrom von extrazellulärem Calcium durch zugaktivierte  $Ca^{2+}$ -Kanäle in die Zelle kommt. Die erhöhte zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration am Zellende bewirkt ein Ablösen des an ADAM10 gebundenen Calmodulin. Dadurch wird das Enzym aktiviert. Es katalysiert ebenfalls die Abspaltung der Ektodomäne des Hyaluronanrezeptors CD44 und löst damit die Zelle von der EZM. Aus der Abspaltung der Ektodomäne des Proteins resultiert zusätzlich die Aktivierung einer  $\gamma$ -Sekretase, wodurch auch die intrazelluläre Domäne ins Zytoplasma abgespalten wird. Es folgt eine Translokation dieser Domäne zum Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktor dient und eine erhöhte Bildung von CD44-mRNA initiiert. Auch die Stimulation mit EGF kann eine Steigerung der Zellmigration und -invasion im Zusammenspiel mit der Abspaltung einer CD44-Ektodomäne hervorrufen. Die Abspaltung wird auch hier von der Metalloproteinase ADAM10 katalysiert und ist abhängig von der Aktivierung der kleinen GTPase Rac1 und der MAP-Kinase (*mitogen-activated protein kinase*) (Murai *et al.* (2004), Murai *et al.* (2006)). Sugahara

*et al.* (2003) haben in einer *in vitro* Studie nachgewiesen, dass Hyaluronanligosaccharide einer bestimmten Größenordnung (kleiner als 36 kDa) durch die Interaktion mit dem Hyaluronanrezeptor CD44 das *shedding* von CD44-Fragmenten bewirken und gleichzeitig die Zellmotilität fördern. In einem ähnlichen Zusammenhang stellt der selbe Autor (Sugahara *et al.* (2006)) einen möglichen neuen autokrinen/parakrinen Aktivierungs-Mechanismus vor, welcher das maligne Potenzial von Tumorzellen induzieren und fördern könnte. Die erhöhte Sezernierung von Hyaluronidasen durch humane Pankreaskarzinom-Zellen führte in dieser Studie zur Bildung von Hyaluronanmolekülen geringen Molekulargewichts, welche die Abspaltung von CD44-Fragmenten forcierten und gleichzeitig die Zellmotilität steigerten.

Bourguignon (2008) analysierte die Interaktionen von HA-CD44 und den Rho-GTPasen im Kontext der Tumorentwicklung, da bekannt war, dass CD44-assoziierte Zytoskelettproteine (Bourguignon *et al.* (1992) und Bourguignon *et al.* (1995)) und tumorzellspezifische Phänotypen abhängig von den Signalwegen der Rho-GTPase waren (Bourguignon (2001a), Bourguignon *et al.* (1998), Turley *et al.* (2002)). Dabei legte sie ihren Fokus auf die Rolle von HA-vermittelten CD44-Interaktionen mit diversen *downstream* Effektoren. Neben einem Zusammenspiel von HA-CD44 und den GTPasen stellt sie auch die Interaktionen von Ankyrin und dem Zytoskelett während der Tumorentstehung heraus. Ankyrin war der erste intrazelluläre Bindungspartner von CD44, der identifiziert wurde. Wie bereits in 1.3.1.1 erwähnt, stellen Ankyrin und die ERM-Proteine eine Verbindung zwischen CD44 und dem Zytoskelett dar (Ponta *et al.* (2003)), was Rückschlüsse auf eine durch CD44 vermittelte Zellmigration zulässt.

Derartige Signalkaskaden sind auch in anderen Zellen, welche keine Tumorzellen sind, denkbar. Bourguignon *et al.* (2004) haben beispielsweise festgestellt, dass die Bindung von Hyaluronan an CD44 einen Einfluss auf die Zell-Zell-Adhäsion und die Differenzierung von Keratinozyten ausübt. Die Interaktion der EZM-Komponente mit dem Rezeptor bewirkt eine Rac1-induzierte Aktivierung der Proteinkinase N-γ (PKN<sub>γ</sub>), was zu einem Anstieg von freiem Calcium in der Zelle führt. Darüber hinaus wird das Zytoskelett-Protein Cortaktin phosphoryliert, wodurch dessen Fähigkeit, Aktinfilamente quervernetzen, behindert wird. Ein ähnliches Modell wendeten sie 2007 auch bei der Beeinflussung der Astrozytenmigration durch HA-CD44 Interaktionen an (Bourguignon *et al.* (2007)). Legg *et al.* (2002) beschreiben einen

Phosphorylierungs-Mechanismus, der CD44 reguliert: In ruhenden Zellen ist der Rezeptor am Serin 325 phosphoryliert. Nach einer Aktivierung der Proteinkinase C wird CD44 am Ser 291 nach einem Phosphorylierungswechsel phosphoryliert. Ser 291 befindet sich in der Nähe der ERM-Bindestelle. Dort koordiniert sie auf eine bislang unbekannte Weise die Dephosphorylierung des Serin-Restes 325. Dies bewirkt *in vivo* eine Modulation der Interaktion zwischen CD44 und dem Zytoskelettlinker-Protein Ezrin und hat Auswirkungen auf die CD44-abhängige gerichtete Zellmotilität. Es wird angenommen, dass diese Motilität durch einen polarisierten so genannten *turnover* von Membran-Zytoskelett-Verbindungen als Antwort auf Modifikationen in der EZM oder anderer externer Reize zustande kam.

Ponta *et al.* (2003) beschreiben in ihrer Veröffentlichung, dass CD44 als Korezeptor fungieren kann, wodurch Signalwege von Rezeptor-Tyrosinkinasen beeinflusst werden. Die Familie der ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen (s. 1.3.3) hebt er an dieser Stelle besonders hervor. Der EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor) wird von vielen invasiven Tumorzellen stark exprimiert. Wang und Bourguignon (2006) weisen in ihrer Studie Hyaluronan-Interaktionen zwischen CD44 und EGFR nach, welche einen Anstieg der Tumorzellmigration durch EGFR-Signalwege induzieren. Kürzlich haben Kim *et al.* (2008) gezeigt, dass die Interaktionen von CD44 mit EGFR HA-vermittelte Zellmotilität durch die Aktivierung von PKC-Signalwegen fördern.

Die Interaktionen mit anderen Rezeptoren könnten im Zusammenhang mit vielen CD44-Aktivitäten, wie Tumorzellwachstum, -invasion und Metastasenbildung stehen (Ponta *et al.* (2003)). Darüber hinaus zeigt das Vorangegangene, dass CD44 in viele Prozesse der Zellmigration und -invasion involviert ist. Aus diesem Grunde wurde CD44 in dieser Arbeit als Kandidatengen zur Migrations- und Invasionsteigerung in den betreffenden Zellen transient exprimiert.

### 1.3.2 Die Src-Tyrosinkinase

Die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Src ist wichtig für viele Aspekte der Zellphysiologie. Das virale Src (v-Src) Gen war das erste identifizierte retrovirale Onkogen. 1911 beschrieb Peyton Rous erstmals das Virus, welches mittlerweile seinen Namen trägt – das Rous Sacroma Virus (Martin (2001)). Das zelluläre Pendant, c-Src, war das erste Protoonkogen, welches im Säugetiergenom 60 Jahre später von zwei unabhängigen Gruppen, Collett und Erikson (1978) und Levinson *et al.* (1978), entdeckt wurde. Die erste identifizierte Tyrosinkinase war ebenfalls Src (Hunter und Sefton (1980)). Darüber hinaus beschrieben Hunter und Sefton (1980), dass Src sich auch selbst phosphoryliert. Daraufhin wurde in den nächsten Jahren aufgeklärt, dass Src einen Komplex molekularer Mechanismen durch die Formierung intramolekularer Interaktionen reguliert (Martin (2001)). Gleichzeitig wurde herausgefunden, dass Src einer Familie von strukturell gleichartigen Kinasen angehört. Thomas und Brugge (1997) beschrieben erstmals die neun Mitglieder der Src Familie: Src, Lck, Hck, Fyn, Blk, Lyn, Fgr, Yes und Yrk. Während Src, Yes und Fyn ubiquitär vorkommen, ist die Verteilung der restlichen Mitglieder gewebespezifisch. Die Struktur und das Zusammenspiel des Komplexes der Src-Familienmitglieder sind im folgenden Kapitel 1.3.2.1 erläutert.

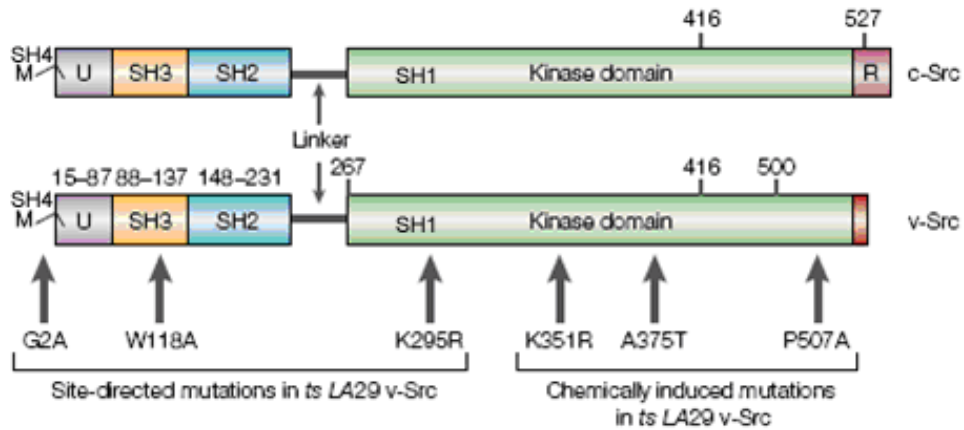
#### 1.3.2.1 Struktur und Aktivierung der Src-Tyrosinkinase

Die Src-Kinasen besitzen eine konservierte Domänenstruktur, bestehend aus den SH (*src homology*)-Domänen: SH4, SH3, SH2 und SH1 (Boggon und Eck (2004)). Die SH4-Region am N-Terminus ist der Membran-Targeting-Bereich, welcher immer myristoyliert, in seltenen Fällen auch palmitoyliert ist (Koeogl *et al.* (1994), Resh (1999)). Die SH4-Domäne besteht aus 15 Aminosäuren (Resh (1993)). Der SH4-Region schließt sich eine einheitliche Region bestehend aus 50-70 Resten an, welche zwischen den einzelnen Src-Familienmitgliedern divergieren (Boggon und Eck (2004)). Ein Kennzeichen der Src-Kinasen ist ein kurzer C-Terminus mit einer autoinhibierenden Phosphorylierungsstelle (Tyrosin 527 bei Src) (Cooper *et al.* (1986)). Die Mitglieder der Src-Familie haben ihre Phosphorylierungsstelle in einem Segment, welches Aktivierungsschleife genannt wird. Diese ist notwendig für die vollständige katalytische Aktivität. Bei der Src-Tyrosinkinase befindet sich diese Stelle für die Autophosphorylierung am Tyrosin 416 (der Gleichheit wegen stammen die Nummerierungen alle von der Huhn-Src) (Smart *et al.* (1981)). Die

Domänenstruktur inklusive der Phosphorylierungsstellen von c-Src und v-Src sind in Abbildung 5 dargestellt. *In vivo* werden die Src-Kinasen entweder am Tyr 416 (aktiver Zustand) oder am Tyr 527 (inaktiver Zustand) phosphoryliert. Die inaktivierende Phosphorylierung am Tyr 527 erfolgt durch die Src-spezifischen Kinase Csk (Nada *et al.* (1991)) oder durch ihr Homolog Chk (Hamaguchi *et al.* (1996), Davidson *et al.* (1997)). Diese Phosphorylierung am C-Terminus bewirkt die Bindung der SH2-Domäne an das Tyr 527 und hat eine Umorganisation der SH2-, SH3- und der Kinasendomäne in eine autoinhibierende Konformation zur Folge (s. Abbildung 6). Diese wird durch Interaktionen der einzelnen Domänen aufrecht erhalten (Sicheri *et al.* (1997), Sicheri und Kuriyan (1997a), Williams *et al.* (1997)). Eine Dephosphorylierung an Tyr 527 und/ oder eine Phosphorylierung an Tyr 416 können zum aktiven Zustand zurückführen (s. Abbildung 6). Die Entdeckung, dass die spezifische Bindung der SH2-Domäne an einen Phosphotyrosinrest für die Funktion der Src-Tyrosinkinase wichtig ist (Sadowski *et al.* (1986)), führte zu dem Konzept der „*modular signaling domain*“ (Pawson (1995)).

Der größte Unterschied zwischen der viralen und zellulären Src ist das Fehlen des Tyr 527 bei v-Src. Tyr 527 und einige umgebende Aminosäuren sind dort nicht vorhanden. Dies bewirkt in der viralen Src sowie bei ähnlichen Abbrüchen bei c-Src eine konstitutive Aktivität des Enzyms (Reynolds *et al.* (1987)). Die Abwesenheit der intramolekularen Interaktionen zwischen Tyr 527 und der SH2-Domäne hat eine permanente Aktivität von v-Src zur Folge (Leu und Maa (2003)).

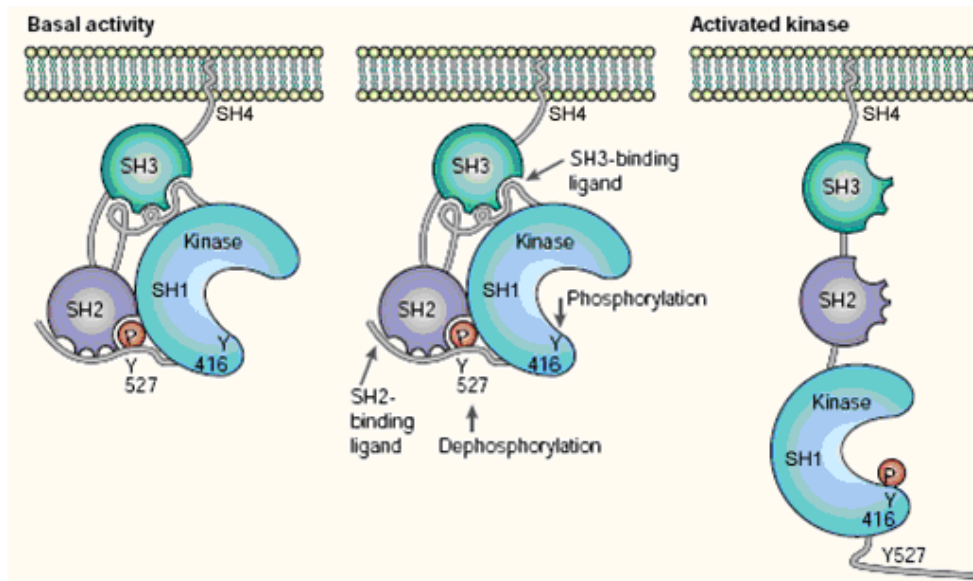




**Abbildung 5: Struktur von c-Src und der Mutante ts LA29 v-Src (Frame *et al.* (2002), modifiziert)**

Dargestellt sind die Domänen von c-Src und v-Src.

Das c-Src-Protein setzt sich zusammen aus der Myristoylierungsstelle (M) am aminoterminalen Ende, der SH4-Domäne, einer einheitlichen Region (U), der Src-Homologie-2 (SH2) und SH3-Protein-Interaktionsdomänen, der SH1-Domäne mit der Kinasendomäne mit Tyr 416 und der carboxyterminalen regulierenden Domäne (R) mit Tyr 527. V-Src-Proteine unterscheiden sich teilweise von c-Src-Proteinen. Ein entscheidender Unterschied ist die Substitution der negativ regulierenden Region am carboxyterminalen Ende. Als Beispiel ist die temperatursensitive (ts) LA29 v-Src-Mutante dargestellt, bei der zusätzlich drei Aminosäuresubstitutionen vollzogen wurden: K351R, A375T und P507A.



**Abbildung 6: Aktivierung von c-Src (Martin (2001), modifiziert)**

Dargestellt sind die an der Aktivierung von Src-Kinasen beteiligten Mechanismen und Konformationsänderungen am Beispiel des Huhn-c-Src.

Das linke Bild repräsentiert die inaktive Konformation von Src, welches am C-terminalen Tyr 527 phosphoryliert ist und mit der SH2-Domäne interagiert. Auf diese Weise tritt die SH3-Domäne in Wechselwirkung mit dem *linker* zwischen der SH2- und der katalytischen Domäne (SH1). Die mittlere Abbildung zeigt mögliche Mechanismen bei der Aktivierung von Src. Dabei stellt Tyr 416 die Autophosphorylierungsstelle in der Aktivierungsschleife dar. Auch die Dephosphorylierung an Tyr 527 kann eine Konformationsänderung in den aktiven Zustand bewirken. Dieser ist im rechten Bild dargestellt. Dort sind die intramolekularen Verbindungen zwischen der SH3- und SH2-Domäne unterbrochen.

Wie in Abbildung 6 dargestellt, existieren viele Wege, um die SFK (*Src family of protein tyrosine kinases*) zu aktivieren. Darin eingeschlossen ist das Auflösen der intramolekularen Interaktionen der SH2- und SH3-Domäne durch hochaffine Liganden oder durch die Modifikation bestimmter Reste. Dazu zählen, wie oben bereits erwähnt, die Dephosphorylierung von Tyr 527 durch Tyrosinphosphatasen oder Phosphorylierung von Tyr 416. Oft ist mehr als ein Mechanismus in die Aktivierung der Src-Tyrosinkinase involviert (Thomas und Brugge (1997)). Beispielsweise kann die Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren nach Yeatman (2004) dazu führen, dass diese mit der SH2-Domäne von c-Src interagieren, die inhibitorischen intramolekularen Interaktionen so unterbrechen und folglich c-Src auf diese Weise aktivieren.

### **1.3.2.2 Funktionen der Src-Tyrosinkinase**

Die SFK spielen im Allgemeinen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Signaltransduktionen. Dabei beeinflussen sie auf verschiedene Weisen die zytoplasmatische Signal-Maschinerie über die Interaktion mit Oberflächenrezeptoren, welche mit der zellulären Umgebung in Kontakt stehen. Dieses Zusammenspiel beeinflusst fundamentale Regulationen der zellulären Prozesse, wie die Proliferation, die Differenzierung der Zellen, die Zellmorphologie, die Zellmigration und das Überleben, sowie spezielle Signalkaskaden (Parsons und Parsons (2004)).

In dieser Arbeit sollte die transiente Überexpression dieses Kandidatengens, wie auch bei den anderen Kandidatengenen, eine Migrations- sowie Invasionssteigerung zur Folge haben. Im Folgenden wird zunächst dargelegt, dass Src in viele Signalkaskaden involviert ist, welche auf unterschiedliche Weisen die Zellmigration und -invasion beeinflussen können.

So werden die Interaktionen der SFK mit verschiedenen Rezeptoren, wie zum Beispiel mit den G-Protein gekoppelten Rezeptoren, den GPI-verankerten Rezeptoren, den Integrinen und anderen Adhäsionsrezeptoren sowie mit den Protein Tyrosinkinaserzeptoren, von Thomas und Brugge (1997) detailliert dargestellt. Diese Rezeptoren können bei Zellmigrations sowie -invasionsprozessen mitwirken. Auch wenn sich die Rezeptoren strukturell und in ihren Funktionen unterscheiden, machen die Autoren einige generelle Schlussfolgerungen über ihr Zusammenspiel mit den SFK.

(a) Src-Protein Tyrosinkinasen können direkt oder indirekt über verschiedenste Mechanismen mit Rezeptoren interagieren. (b) Sie können durch Ligandenbindung an den Rezeptoren aktiviert werden und die Aktivierung kann durch multiple Mechanismen vermittelt werden. (c) Nicht nur die Rezeptoren regulieren die SFK, auch die Src-Kinasen können die Funktionen der Rezeptoren beeinflussen. Diese Vielseitigkeit der Src-Protein Tyrosinkinasen, als Regulatoren und/ oder als Effektoren der Rezeptoren fungieren zu können, ermöglicht den SFK den *cross-talk* zwischen mehreren Rezeptoren (Thomas und Brugge (1997)).

Viele Studien haben bereits dargelegt, dass SFK in die Signaltransduktion einiger RTK (Rezeptor-Tyrosinkinasen) involviert sind. Einige der interagierenden Rezeptoren sind der EGFR (Luttrell *et al.* (1988), Belsches *et al.* (1997)), SCFR (Stammzellofaktor Rezeptor) (Krystal *et al.* (1998)), CSF1R (*colony-stimulating factor-1 receptor*) (Dey *et al.* (2000)), HGFR (*hepatocyte growth factor/scatter factor receptor*) (Maejima *et al.* (2003)), PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) (Kypta *et al.* (1990)), FGFR (FGF-Rezeptor) (Zhan *et al.* (1994)) und andere Rezeptoren (Parsons und Parsons (1997), Abram und Courtneidge (2000), Hong *et al.* (2004), Mohamed *et al.* (2001)).

Darüber hinaus deuten einige Experimente daraufhin, dass die SFK in die Mechanismen der Zellmigration involviert sind. So migrieren zum Beispiel Fibroblasten aus Src<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant langsamer als die Wildtypzellen. Dieser Defekt wurde durch die Expression einer kinaseaktiven, aber nicht einer kinaseinaktiven c-Src-Variante behoben. Darüber hinaus inhibiert auch die Expression einer dominant-negativen Src-Tyrosinkinase die Fortbewegung (Hall *et al.* (1996)). Src spielt auch eine Rolle bei EGF-induzierter Migration von Rattenkarzinomzellen (Rodier *et al.* (1995)). Jüngst haben Purnell *et al.* (2009) nachgewiesen, dass der Src-Inhibitor AZD0530 Src und die Fokale Adhäsionskinase blockiert und somit signifikant die Migration und Invasion von Lungenkrebszellen in Matrigel inhibiert. Src kann auf verschiedenste Arten und Weisen an der Zellmigration beteiligt sein, zum Beispiel auch durch FAK über die Integrin vermittelte Adhäsion (s. 1.2.3), oder über Veränderungen der Genexpression, welche zum Beispiel die Expression von Integrinen oder anderen Adhäsionsrezeptoren beeinflussen (Thomas und Brugge (1997)). Slack *et al.* (2001) stellen beispielsweise bei der Zellmigration von Prostatakarzinomzellen einen Zusammenhang zwischen Src und FAK her.

Sandilands *et al.* (2004) stellen einen Zusammenhang des Aktinzytoskeletts, dessen Umorganisation eine Voraussetzung für migratorische Prozesse ist, mit der Aktivierung der Src-Tyrosinkinase dar. Sie haben zunächst die Zusammenhänge der Translokation von Src aus der perinukleären Region hin zur Plasmamembran genauer untersucht. RhoB wurde dabei (RhoB colokalisiert mit Endosomen (Adamson *et al.* (1992))) als eine Komponente des *outside-in-signalings* identifiziert, welches die Src-Aktivierung sowie ihre Translokation zu den Transmembranrezeptoren koordiniert. Die Autoren haben gezeigt, dass die Aktivierung von Src-Tyrosinkinasen nach einer PDGF-Stimulation im Zytoplasma stattfindet. Für die Membrantranslokation und die optimale Aktivierung der Kinase war das Aktinzytoskelett notwendig.

Auf diese Weise lassen sich viele Studien und Signalkaskaden aufführen, welche darlegen, dass die Src-Tyrosinkinase eine migrationsbeeinflussende Wirkung hat. Aus diesem Grunde wurde diese Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase für Studien zur Steigerung der Zellmigration und -invasion transient in verschiedenen Zelllinien exprimiert.

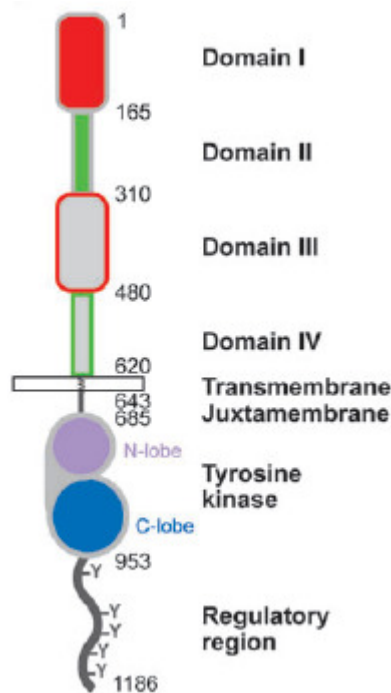
### **1.3.3 Der EGF-Rezeptor**

Die Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor Familie besteht aus vier Mitgliedern: EGFR (HER-1), ErbB2 (HER-2), ErbB3 (HER-3) und ErbB4 (HER-4) (Schlessinger (2004), Yarden und Sliwkowski (2001)). Der Transmembranrezeptor ist eine der vielseitigsten Signaleinheiten in der Biologie. Diese Rezeptor-Tyrosinkinase reguliert Schlüsselprozesse der Zellbiologie, wie die Proliferation, das Überleben, die Differenzierung während der Entwicklung, Gewebshomöostase sowie die Tumorentstehung. Nach der Ligandenbindung werden Homodimere oder Heterodimere (mit anderen Familienmitgliedern) gebildet und die Aktivierung der Kinase initiiert viele intrazelluläre Signalkaskaden. In Säugetieren kann dieser Tyrosinkinaserzeptor durch die Bindung von sieben verschiedenen Wachstumsfaktoren aktiviert werden (Schneider und Wolf (2009)): EGF, TGFA (*transforming growth factor-a*), HBEGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*), AREG (*amphiregulin*), BTC (*betacellulin*), EREG (*epiregulin*) und EPGN (*epigen*) (Harris *et al.* (2003)). Hinzu kommen einige Komponenten der EZM, die EGF-homologe Domänen aufweisen. Dazu gehören zum Beispiel Laminin (Engel

(1992)), Tenascin (Swindle *et al.* (2001)), Versican (Xiang *et al.* (2006)), Netrin (Yin *et al.* (2000)) und Slit (Rothberg *et al.* (1990)).

### 1.3.3.1 Struktur und Aktivierung des EGF-Rezeptors

Jeder ErbB-Rezeptor setzt sich aus einer großen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne, einer intrazellulären Juxtamembrandomäne (JM), einer Tyrosinkinasedomäne und einer C-terminal gelegenen regulativen Domäne zusammen. Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei homologen Ligandenbindungsdomänen (Domäne I und III) und zwei cysteinreichen Domänen (Domäne II und IV) (Ferguson (2008)). Die Struktur ist in Abbildung 7 dargestellt.

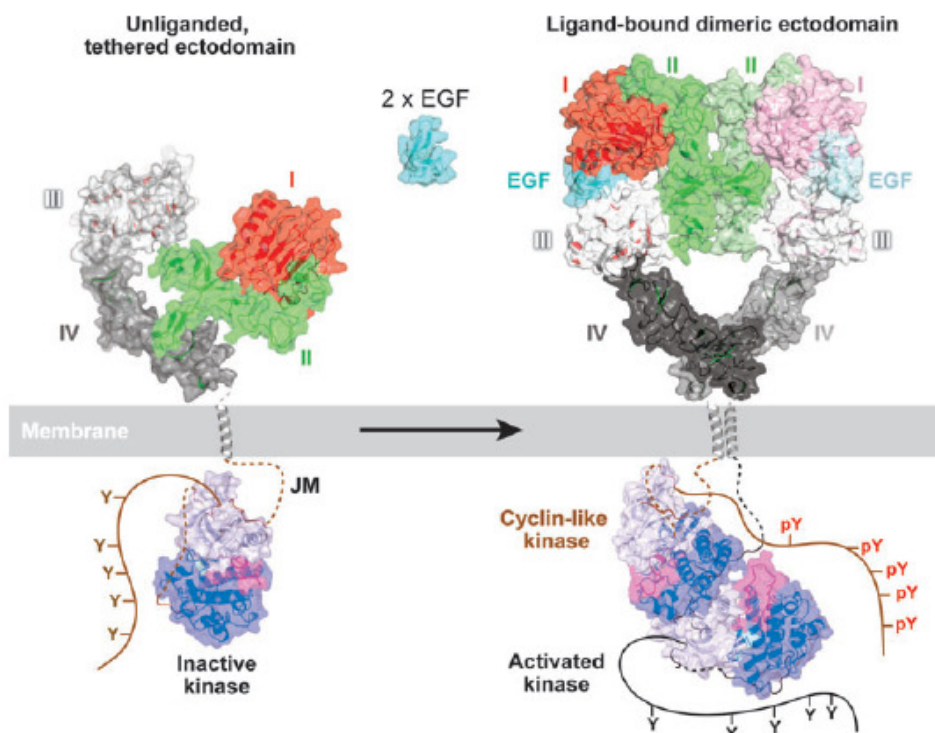


**Abbildung 7: Die Domänen des EGF-Rezeptors (Ferguson (2008))**

Die extrazelluläre Region setzt sich aus vier Domänen (I-IV) zusammen. Diese werden oftmals auch als L1, CR1, L1 und CR2 oder L1, S1, L2 und S2 bezeichnet. Domäne I (rot) und III (grau, rot umrandet) stimmen in ca. 37 % ihrer Sequenz überein, während Domäne II (grün) und IV (grün, grün umrandet) cysteinreich sind. Die „N-lobe“ der Kinasedomäne ist in lila und die „C-lobe“ in blau dargestellt. Die Aminosäurenummern der Domänengrenzen sind angegeben.

Abbildung 8 repräsentiert ein Übersichtsmodell, das die strukturellen Veränderungen des EGFR während der Aktivierung zeigt. Im Ruhezustand sind die extrazellulären Domänen II und IV gebunden und die Kinasedomäne ist inaktiv. Die Ligandenbindung (hier EGF) an die extrazelluläre Region induziert die bereits oben erwähnte Dimerisierung. Das hat eine starke Annäherung der intrazellulären

Kinasendomänen zu einem asymmetrischen Dimer zur Folge (Ferguson (2008)). Der Dimerisierung folgt eine Auto- oder Transphosphorylierung mehrerer Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil. Diese Region eines aktivierten EGFR dient auch als Anlagerungsstelle für Signalproteine mit einer SH2-Domäne (Liu und Neufeld (2007)). Der EGFR kann auch durch die Aktivierung anderer Membranrezeptoren transaktiviert werden. Beispiele dafür sind die Angiotensin II Rezeptoren, bestimmte G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Beta-2 adrenerge Rezeptoren und *insulin-like growth factor* Rezeptoren. Die Transaktivierung der EGFR-Signalwege durch andere Rezeptorsignalwege wird durch Matrix Metalloproteinasen vermitteltes *shedding* von endogenen EGFR-Liganden initiiert (El-Shewy *et al.* (2004), Fischer *et al.* (2006), Flannery und Spurney (2006), Snider und Meier (2007)). Eine ligandenunabhängige Tyrosinphosphorylierung ist bei dem EGFR ebenfalls möglich (Drube *et al.* (2006)). Eine Autoinhibition resultiert aus den Interaktionen der extrazellulären Region, der Tyrosinkinasedomäne und möglicherweise auch von der JM- und C-terminalen Region (Ferguson (2008)).



**Abbildung 8: Mechanismen der EGF-Rezeptoraktivierung (Ferguson (2008))**

Dargestellt sind die kristallisierten Strukturen des EGFR in der Membran. Links im inaktiven Zustand und rechts nach Ligandenbindung (hier EGF) im aktiven Zustand. Die Transmembrandomäne ist als  $\alpha$ -Helix in grau zu sehen. Nicht kristallographisch definierte Regionen sind als gestrichelte oder durchgehende Linien illustriert. Die fehlenden Teile der inaktiven Kinase sind in braun dargestellt, die der aktiven in schwarz.

### 1.3.3.2 Der EGF-Rezeptor als Positivkontrolle

Erfolgreiche Zelltransplantationen zur Therapie von Erkrankungen des Zentralen Nerven Systems setzen nicht nur voraus, dass der richtige Zelltyp ins Gewebe inkorporiert wird, sondern auch, dass dieser von der Transplantationsstelle wegmigriert. Die Überexpression des Kandidatengens EGFR wurde in dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendet. Von dem Rezeptor ist aus verschiedenen Studien bekannt, dass er sich positiv auf die Zellmigration und -invasion auswirken kann.

Aguirre *et al.* (2005) haben zum Beispiel nachgewiesen, dass die EGFR-Expression die Migration von postnatalen neuronalen Vorläuferzellen *in vitro* und *in vivo* steigert. Die höhere endogene Expression des Tyrosinkinase-Rezeptors von NG2-exprimierenden Vorläuferzellen der postnatalen Subventrikulären Zone (SVZ) im Vergleich zu dem zellulären Pendant aus dem Cortex konnte als der Grund für ihr erhöhtes migratorisches Potential *in vitro* und *in vivo* eruiert werden. Aus der transienten Überexpression des EGFR in den nicht-migratorischen NG2-exprimierenden corticalen Zellen resultierten ebenfalls *in vitro* und *in vivo* migrationsfähige Zellen. Auch aufgereinigte corticale NG2-Zellen aus einem EGFR-überexprimierenden Mausmodell wiesen eine verbesserte Migrationsfähigkeit auf. Die Autoren selber proklamieren, dass EGFR so eine neue Rolle im postnatalen Gehirn zugeordnet werden kann. Aufgrund der positiven Befunde ergeben sich neue Möglichkeiten, EGFR-exprimierende Zellen zur Therapie von erkranktem ZNS zu nutzen. In einer weiteren Studie legt der selbe Autor (Aguirre *et al.* (2007)) zusätzlich dar, dass EGFR die Oligodendrozytenregeneration und Myelinisierung verstärken könnte.

#### 1.4 Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit

Die Therapie von Läsionen des ZNS stellt aufgrund des limitierten Regenerationspotentials des ZNS eine große Herausforderung dar. Lässt die Ursache der Schädigung Hoffnung zur Linderung in Form einer exogenen Therapie zu, so könnte die Zelltransplantation auf diverse Weisen durchgeführt werden. Während intraventrikuläre Injektionen in frühen Entwicklungsstadien erfolgsversprechend sind, zeigen sie bis heute keine eindeutigen Verbesserungen am geschädigten adulten Gehirn. Auch die intravenöse Applikation ist momentan noch nicht erfolgsversprechend (Franklin und Ffrench-Constant (2008)). Beispielsweise die Transplantation von ASA-überexprimierenden ES-Zellen in die Hemisphären zwei Tage alter Mäuse hingegen erzielte in einem MLD-Mausmodell eine lokale Verbesserung der Symptomatik (Klein *et al.* (2006)). An den Transplantationsstellen war die Sulfatidablagerung reduziert, jedoch nicht im gesamten Gehirn. Viele ZNS-Erkrankungen sind aber multifokal und diffus, was im Falle einer solchen lokal limitierten Therapieform etliche Injektionen ins Gehirn mit sich bringen müsste. Dieses würde durch die Injektionsnadel viele kleine neue Verletzungen des empfindlichen Gewebes zur Folge haben, was ein erhöhtes Risiko intracerebraler Blutungen mit sich bringen würde. Aufgrund dessen wäre es wünschenswert, wenn sich die transplantierten Zellen nach nur einer Injektion möglichst homogen im betroffenen ZNS verteilen würden.

Genau an diesem Punkt setzt diese Arbeit an. Das Ziel war die **signifikante Verbesserung der Migrationsfähigkeit und Invasivität von glialen Vorläuferzellen**. Dabei sollte die transiente Transfektion von aus der Literatur bekannten migrations- und/ oder invasionsbeeinflussenden Kandidatengenen zielführend sein.



Im Detail mussten dazu folgende Punkte erarbeitet werden:

1. Ein Hochskalieren eines von Dai (2005) entwickelten Migrationsassays sollte einen höheren Durchsatz von Experimenten und somit ein effizientes Durchmusterung von Kandidatengenen ermöglichen. Dabei sollten Zeitrafferaufnahmen von Kandidatengen-GFP-überexprimierenden Zellen in 96-well-, anstatt in 24-well-Platten angefertigt werden. Es sollte eine objektive und reproduzierbare Auswertemethode der Aufnahmen entwickelt werden, um die Signifikanz der Migrationsveränderungen durch Überexpression der Kandidatengene zu eruieren.
2. Der Einfluss der Kandidatengene auf die Zellinvasion ins Gehirngewebe sollte ermittelt werden. Dabei war es wichtig, einen *assay* zu finden, welcher einen hohen Durchsatz der Versuche zuließ, aber nicht unnötig auf Kosten unzähliger Tiere durchgeführt werden musste. Auch für diese Experimente sollte eine objektive und reproduzierbare Methodik zur Auswertung gefunden werden.
3. Nach der Etablierung der beiden *assays* mit B35-Neuroblastomzellen, sollten diese ebenfalls mit den diffiziler zu handhabenden aus ES-Zellen abgeleiteten glialen Vorläuferzellen, den N3EFL-Zellen, durchgeführt und ausgewertet werden.
4. Die *in vitro* sowie *in vivo* Auswirkungen relevanter Kandidatengene auf die beiden Zelllinien waren von Interesse. Dabei wurden Untersuchungen zur Morphologie, Differenzierung, Proliferation, Migration und Invasion nach einer transienten Überexpression der Kandidatengene durchgeführt.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerät, Modell	Hersteller (Standort)
Analysenwaage	CP 124S-OCE Sartorius (Göttingen)
Bakterienkolben	Eigenbau vom Glasbläser
Brutschrank (Bakterien)	Heraeus (Hanau)
Brutschrank (Zellkultur)	Forma Scientific (USA)
Dampfsterilisator, Varioklav EC	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE, Mini Protean 3 Gelkammer	BioRad (USA)
Eppendorf Bio Photometer	Eppendorf (Esseling-Berzdorf)
Gefrierschrank (-80 °C)	Heraeus (Hanau)
Gefrierschränke (-20 °C)	AEG (Stockholm)
Gefriertruhe (-80 °C)	Ultra low Sanyo Scientific (UK)
Gel Doc 2000	BioRad (USA)
Gelkammern, Protean 3	BioRad (USA)
Haarpinsel (Größe 0), forte basic 393	da Vinci Künstlerpinselfabrik DEFET (Nürnberg)
Heizblock, MTB 250	Kleinfeld-Labortechnik (Gehrden)
IR-CO <sub>2</sub> gas tester	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Kammern für Agarosegelelektrophorese	Eigenbau der Werkstatt
Kolbenhubpipetten (2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 100 µl, 1000 µl)	Gilson (USA)
Kühlschränke	AEG (Stockholm)
Rührmagnete	Labomedic (Bonn)
Magnetrührer, IKAMAG Ret	IKA-Labortechnik (Staufen)
Messzylinder	Labomedic (Bonn)
Microplate Reader, GENios	Tecan (Schweiz)
Mikrowelle, Micormat	AEG (Stockholm)

<b>Gerät, Modell</b>	<b>Hersteller (Standort)</b>
Netzgerät (Stromversorgung) (Western Blot; Proteingele)	BioRad (USA)
Netzgerät (Stromversorgung), (Agarosegele), Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech (Wien)
Nucleofector Device II, AAD-1001	Amaxa (Köln)
ph-Meter, 761 Calimatic	Knick (Berlin)
Pipettierhilfe, Easypet	Eppendorf (Esseling-Berzdorf)
Pumpe	Vacuubrand (Wertheim)
Quarzküvette	Eppendorf (Esseling-Berzdorf)
Rotationsrad für Westerninkubation	Heidolph Instruments (Schwabach)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific (USA)
Schüttler, Rotamax 120	Heidolph Instruments (Schwabach)
semi dry Western Blot, Transblot SD Cell	BioRad (USA)
Sequenzierer, ABI Prism 310 Genetic analyzer	Perkin Elmer (USA)
Speed Vac, SC 100	Savant (USA)
Spektralphotometer, DU 640	Beckman Coulter (München)
Sterilbank (ES-Zellkultur)	Hera safe, Thermo Scientific (Langselbold)
Sterilbank, CAR6	Clean Air Products (USA)
T3 Thermocycler	Biometra (Hannover)
Ultraschallwasserbad, 1510	Branson (USA)
UV-Handlampe	Konrad Benda Laborgeräte und UVStrahler (Wiesloch)
Vortexer, Unimag Zx3 Classic	UniEquip (Martinsried)
Waage, PC 4400	Mettler (Giessen)
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore (MA, USA)
Wasserbad, GFL1083	GFL (Burgwedel)
Zählkammer (Neubauer)	Brand (Wertheim)
12-Kanalpipette (5-50 µl)	Dunn Labortechnik (Asbach)

## 2.1.1 Mikroskope

Tabelle 4: Mikroskope

Gerät, Modell	Hersteller (Standort)
<b>Axioskop 2</b> Objektiv, Plan-Neofluar 2,5 x Objektiv, EC-Plan-Neofluar 10 x/0,3 Ph1 Objektiv, Plan-Neofluar 20 x/0,50 Ph2 Objektiv, Plan-Neofluar 40 x/0,75 Ph2 Axio CamMRm	Carl Zeiss AG (Jena) Carl Zeiss AG (Jena) Carl Zeiss AG (Jena) Carl Zeiss AG (Jena) Carl Zeiss AG (Jena) Carl Zeiss AG (Jena)
<b>Epifluoreszenzmikroskop, Axiovert 200M</b> Objektiv, A-Plan 10 x/0,25 Ph1 CCD-Kamera (AxioCam MRm) in vivo Inkubationskammer, Incubator XL-3 motorisierter Kreuz-Tisch	Carl Zeiss AG (Jena) Carl Zeiss AG (Jena) Carl Zeiss AG (Jena) Pelon GmbH (Deutschland) Scan IM 120x100; Märzhäuser GmbH (Deutschland)
<b>Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometer (FCS), Confocor</b> Objektiv, Plan-Apochromat 63 x/1,2 H <sub>2</sub> O DIC CCD Kamera 1/3" (AxioCam MRm) Axiovert 135 TV Mikroskopstativ mit motorisiertem x-,y-,z-Antrieb für Tisch und Pinhole	Carl Zeiss AG (Jena)  Carl Zeiss AG (Jena) Carl Zeiss AG (Jena) Carl Zeiss AG (Jena)
<b>Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 100M</b> Objektiv, Neofluar 40 x/1,3 Öl CDD-Kamera (AxioCam HRm)	Carl Zeiss AG (Jena) Carl Zeiss AG (Jena) Carl Zeiss AG (Jena)
<b>Laser-Scanning-Mikroskop, 510- Meta</b> Objektiv, C-Apochromat 40 x/1,2 W corr Objektiv, Plan-Apochromat 63 x/1,4 Öl DIC	Carl Zeiss AG (Jena) Carl Zeiss AG (Jena) Carl Zeiss AG (Jena)
<b>Laser-Scanning-Mikroskop; 510- Meta- NLO</b> Objektiv, Plan-Apochromat 63 x/1,4 Öl DIC	Carl Zeiss AG (Jena) Carl Zeiss AG (Jena)
<b>Lichtmikroskop, Telaval 31</b>	Carl Zeiss AG (Jena)

## 2.1.2 Zentrifugen

Tabelle 5: Zentrifugen

Gerät, Modell	Rotor	Hersteller (Standort)
Hermle Z 233 UK	Hermle 220-59 VO7	Biotron Labortechnik (Hilden)
Labofuge 400e (Zellkultur)	#8179	Hereaus instruments (Hanau)
Optima TLX Ultrazentrifuge	TLA 110	Beckman Coulter (USA)
Tischzentrifuge 5415 D	F45-24-11	Eppendorf (Esseling-Berzdorf)
Tischzentrifuge 5417 R	F45-30-11	Eppendorf (Esseling-Berzdorf)
Tischzentrifuge 5810 R	F34-6-38	Eppendorf (Esseling-Berzdorf)

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Gerät, Modell	Hersteller (Standort)
12-well-Platten	BD Falcon (Heidelberg)
24-well-Platten	BD Falcon (Heidelberg)
2 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
6-well-Platten	BD Falcon (Heidelberg)
96-well-Platten	BD Falcon (Heidelberg)
Bakterienkulturgefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
Bakterienkulturgefäße, für die ES-Zelldifferenzierung	Nunc (Langenselbold)
Deckgläser	Marienzfeld (Lauda-Königshofen)
Einmalpipetten (1ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Einmalspritzen	B. Braun (Melsungen)
Filter 0,2 µm	Sarstedt (Nümbrecht)
Flasche G1 klar	Chromatographie Service GmbH (Langerwehe)

<b>Gerät, Modell</b>	<b>Hersteller (Standort)</b>
Für die Slicekulturen: 6-well-Platten (3516) Membraneinsatz (3450)	Costar Corning (USA) Costar Corning (USA)
Kanülen	BD Falcon (Heidelberg)
Kryoröhrchen	Nunc (Langenselbold)
Membraneinsatz zum Filmen der Slicekulturen (PICM ORG 50)	Millipore (Schwalbach)
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll (Dassel)
Objektträger	Engelbrecht (Edermünde)
Parafilm-M Verschlussfolie	Hecht (Sondheim)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen	Greiner (Frickenhausen)
Pyrexröhrchen	SciLabware Limited (Großbritannien)
Reaktionsgefäße (0,2 ml-2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Skalpelle	B. Braun (Melsungen)
Wattestäbchen	Elkos Face (Hamburg)
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)
Zellkulturflaschen (T25, T75)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschalen (3 cm, 6 cm, 10 cm) (ES-Zellkultur)	BD Falcon (Heidelberg)
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber (ES-Zellkultur)	Labomedic (Bonn)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) für die ES-Zellkultur (Polystyrene (352095) oder Polypropylene (352096))	BD Falcon (Heidelberg)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) für die Zellkultur	Sarstedt (Nümbrecht)

## 2.3 Chemikalien

Tabelle 7: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller (Standort)	Bestellnummer
1 x PBS	Invitrogen (Karlsruhe)	14190
2-Amino-2-(Hydroxymethyl) 1,3-Propandiol (Tris)	BioRad (USA)	161-0719
3,3,5-tri-iodothyronine Hormon (T3)	Sigma-Aldrich (Selze)	T6397
6 x DNA loading dye	Fermentas (St. Leon-Rot)	R0611
Acrylamid	Roth (Karlsruhe)	A515.1
Agar	Sigma-Aldrich (Selze)	A 7002
Agarose	Qbiogene (Heidelberg)	A6AH0500
albumin from bovine serum (BSA)	Sigma-Aldrich (Selze)	A3912
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)	9592.2
Ampicillin-Natriumsalz	Roth (Karlsruhe)	K029.2
<i>Aqua dest.</i> (für die Zellkultur)	Invitrogen (Karlsruhe)	15230
Ascorbinsäure (AA)	Sigma-Aldrich (Selze)	A-4403
Bacto Peptone	BD (Heidelberg)	211677
Bacto Yeast Extract (Hefeextrakt)	BD (Heidelberg)	212750
Bakterielle Hyaluronidase (Hyaluronate Lyase)	Sigma-Aldrich (Selze)	H-1136
Basen: Adenosin Guanosin Cytosin Uridin Tymidin	Sigma-Aldrich (Selze)	A-4036 G-6264 C-4654 U-3003 T-1895
Basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF)	R&D Systems (Wiesbaden)	233-FBICF
BES	Calbiochem (Darmstadt)	391334

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller (Standort)</b>	<b>Bestellnummer</b>
BigDye Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (USA)	4336774
BioRad DC Protein Assay: Protein Assay Reagent A Protein Assay Reagent B Protein Assay Reagent S	BioRad (USA)	500-0113 500-0114, 500-0115
Borax	Sigma-Aldrich (Selze)	71997
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Selze)	B-5525
BSA (fettsäurefrei)	Sigma-Aldrich (Selze)	A6003
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)	9022960
Calciumchlorid–Dihydrat	Merck (Darmstadt)	2383
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIP)	Fermentas (St. Leon-Rot)	EF0341
Cay10444 (Edg-Inhibitor)	Cayman (USA)	10005033
Chloroform	Merck (Darmstadt)	1024441000
D-(-)-Arabinose	Sigma-Aldrich (Selze)	A3131
D-(+)-Glucose-Monohydrat	Merck (Darmstadt)	8346
DAPI	Sigma-Aldrich (Selze)	D-9542
Dibutyltin dilaurate	Sigma-Aldrich (Selze)	291234
Diethanolamin	Fluka (Schweiz)	31589
Dimethyl-Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich (Selze)	D2650
DMEM/F12	Invitrogen (Karlsruhe)	21311-020
DNA-Marker	Fermentas (St. Leon-Rot)	
Dneasy Mini Kit	QIAGEN (Hilden)	69504
dNTP	Fermentas (St. Leon-Rot)	
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich (Selze)	43817-5G
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen (Karlsruhe)	31885-023
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich (Selze)	E-5134
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	R&D Systems (Wiesbaden)	236-EG-200



<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller (Standort)</b>	<b>Bestellnummer</b>
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)	3738.5
Ethanol (EtOH)	Hofmann (Düsseldorf)	641
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Selze)	E8751
ExGen 500	Fermentas (St. Leon-Rot)	R-0511
fetal calf serum (FCS) für die ES-Zellkultur	PAN (Aidenbach)	3302-P260719
fetal calf serum (FCS)	Invitrogen (Karlsruhe)	10270106
Fibronectin (Fn)	Invitrogen (Karlsruhe)	33010018
Fluo-3-AM	Invitrogen (Karlsruhe)	F1241
Forskolin	Sigma-Aldrich (Selze)	F6886-10MG
Gelatine (für Zellkultur)	Sigma-Aldrich (Selze)	G1890
Gelatine TypA	Sigma-Aldrich (Selze)	G2500
Glucose	Sigma-Aldrich (Selze)	G7021-1KG
Glutaraldehyd	Serva (Heidelberg)	23115
Glycerol p.A.	BioRad (USA)	161-0724
HBSS	Invitrogen (Karlsruhe)	14170
HiDi Formamid	Applied Biosystems (USA)	4311320
HPLC-H <sub>2</sub> O	Roth (Karlsruhe)	A511.2
Hyaluronan (HA)	Sigma-Aldrich (Selze)	H5388
Immersionsöl „Immersol“ 518 F	Carl Zeiss AG (Jena)	444962
Insulin	Sigma-Aldrich (Selze)	I6634-50MG
Ionomycin	Calbiochem (Darmstadt)	407950
Isopropanol	Fluka (Schweiz)	82092
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)	4936.1000
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Selze)	K-4000
Ki16425	Sigma-Aldrich (Selze)	K0639
Kupfer-(II)-sulfat-pentahydrath	Roth (Karlsruhe)	8175.1
Laminin (Ln)	Sigma-Aldrich (Selze)	L2020-1MG
Leukemia inhibitory factor (LIF)	Millipore (Schwalbach)	ESG1107
Leupeptin	Sigma-Aldrich (Selze)	L 2884
L-Glutamin	invitrogen (Karlsruhe)	250 30-032
L-Glutamin	Sigma-Aldrich (Selze)	G8540-25MG

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller (Standort)</b>	<b>Bestellnummer</b>
LPA	Sigma-Aldrich (Selze)	L7260
Lysosulfatid	Matreya (USA)	1904
Magermilchpulver	Reformhaus	
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck (Darmstadt)	5833
Methanol tech.	Merck (Darmstadt)	1.06035.1000
Mowiol	Calbiochem (Darmstadt)	475904
N,N,N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)	2887.1
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'- ethansulfonsäure (HEPES)	Roth (Karlsruhe)	9105.4
NaHCO <sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat)	Sigma-Aldrich (Selze)	401676
NaOH- Pellets	Merck (Darmstadt)	1-064.821.000
Na-Selenit	Sigma-Aldrich (Selze)	S5261-10G
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)	1.06268.1000
Natriumchlorid	VWR/Prolabo(Frankreich)	27810364
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)	K12610129
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)	1.06469.1000
Natriumphosphat	Merck (Darmstadt)	1063451000
NBT/BCIP Stocklösung	Roche (Mannheim)	11681451001
Normal Goat Serum (NGS)	Sigma-Aldrich (Selze)	G-6767
NRS	Sigma-Aldrich (Selze)	R-9759
NucleoSpin® Extract II	MACHEREY NAGEL (Düren)	740609.50
Oligo(dt) <sub>18</sub> Primer	Fermentas (St. Leon-Rot)	SO131
Omniscript RT Kit	QIAGEN (Hilden)	205110
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (Selze)	P- 6148
p-Coumarsäure	Fluka (Schweiz)	28200
PD 168393 (EGFR-Inhibitor)	Merck (Darmstadt)	513033
Pefabloc SC	Merck (Darmstadt)	1.24839.0100

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller (Standort)</b>	<b>Bestellnummer</b>
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Invitrogen (Karlsruhe)	15140-122
Pepstatin A	Fluka (Schweiz)	77170
Phalloidin-Atto-488 (10nmol)	Atto-Tec (Weidenau)	Atto-488
Phalloidin-TRITC (Tetramethylrhodamin B isothiocyanat)	Fluka (Schweiz)	77418-1EA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (Selze)	P-7627
Phosphorsäure	Merck (Darmstadt)	100573
Platelet derived growth factor (PDGF)-AA	R&D Systems (Wiesbaden)	221-AA
p-Nitrophenolphosphat	Fluka (Schweiz)	71768
Poly-L-Ornithin (PO)	Sigma-Aldrich (Selze)	P-3655-50mg
Ponceau-S	Roth (Karlsruhe)	5938.1
Progesterone	Sigma-Aldrich (Selze)	P8783-5G
Propidiumiodid	Invitrogen (Karlsruhe)	P1304MP
Proteinstandard, 671 Prestained Page Ruler	Fermentas (St. Leon-Rot)	SM0671
PTX	Calbiochem (Darmstadt)	516560
Putrescine	Sigma-Aldrich (Selze)	P5780-5G
Pyruvat	Invitrogen (Karlsruhe)	11360
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN (Hilden)	12143
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN (Hilden)	12123
QIAquick Gelextraction Kit	QIAGEN (Hilden)	28706
RNAse Inhibitor (40U/μl)	Promega (Mannheim)	N2611
RNeasy MiniKit	QIAGEN (Hilden)	74104
RPMI-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)	A10491-01
S1P (Sphingosin-1-Phosphat)	Matreya (USA)	1803
Salzsäure 32%	Roth (Karlsruhe)	P074.4
SDS (Natriumdodecylsulfat)	BioRad (USA)	161-0302

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller (Standort)</b>	<b>Bestellnummer</b>
Sphingolipid ceramide N-deacylase (SCDase)	Takara (Frankreich)	TAK-4462
Src-Inhibitor (PP2)	Merck (Darmstadt)	529573
Stickstoff 5,0	Linde Gas (Pullach)	2210152
Streptavidin (Alexa633-gekoppelt)	Invitrogen (Karlsruhe)	S21375
Sucrose	Sigma-Aldrich (Selze)	W-7903
Sulfatide, sodium salt, bovine	Calbiochem (Darmstadt)	573750
Taq-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)	EP0404
TEMED	Roth (Karlsruhe)	2367.1
Transferrin	Chemicon (Serological Corporation)	4452-01
Trifluoressigsäure (TFA)	Roth (Karlsruhe)	P088.1
Tris-HCl	Roche (Mannheim)	10812846001
Triton X-100 (Versuche im Life and Brain)	Sigma-Aldrich (Selze)	T-8787
Triton X-100 (Versuche in der Physiologischen Chemie)	Serva (Heidelberg)	37238
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Selze)	T-8154
Trypsin	Sigma-Aldrich (Selze)	T7659
Tween 20	Fluka (Schweiz)	93773-250G
VECTASHIELD® Mounting Medium	VECTOR LABORATORIES (U.K.)	H-1000
VPC23019 (Edg-Inhibitor)	Avanti (USA)	857360
VPC25239 (Edg-Inhibitor)	Davis <i>et al.</i> (2005)	
VPC32183 (Edg-Inhibitor)	Avanti (USA)	857340
W146 (S1P <sub>1</sub> Antagonist Rezeptor)	Avanti (USA)	857390
β-Mercaptoethanol	Fluka (Schweiz)	63689

## 2.4 Lösungen, Medien und Puffer

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit Nanopore Wasser angesetzt.

### 2.4.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Das FCS wurde bei 57 °C für 35 - 40 min hitzeinaktiviert. Alle weiteren den Zellkulturmedien zugefügten Komponenten wurden, wenn nicht anders beschrieben, ggf. in *aqua dest.* (destilliertem Wasser) gelöst und sterilfiltriert (Sterilfilter mit Porengröße 0,2 µm).

- Einfriermedium:
  - DMEM/F12
  - 10 % oder 5 % FCS
  - 1 % L-Glutamin
  - 100 U/ml Penicillin
  - 100 µg/ml Streptomycin
  - 10 % DMSO
  
- Kulturmedium:
  - DMEM/F12
  - 10 %, 5 % oder 0 % FCS
  - 1 % L-Glutamin
  - 100 U/ml Penicillin
  - 100 µg/ml Streptomycin
  
- Weitere Lösungen und Medien:
  - Ca<sup>2+</sup>-Messungen mit MMR-2 mM KCl:
    - 145 mM NaCl
    - 2 mM KCl
    - 2 mM CaCl<sub>2</sub>
    - 1,3 mM MgCl<sub>2</sub>
    - 10 mM HEPES
    - 20 mM Glucose
    - auf pH 7,3 einstellen.

Fixationslösungen für Kulturzellen und Slicekulturen:

8 % PFA in PBS: (mit Sucrose)	8 % PFA 30 % Sucrose in 1 x PBS unter Erhitzen lösen, durch Zugabe von NaOH auf pH 7,4 einstellen.
----------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Postelektroporationskulturmedium: (für Testzwecke)	RPMI 1 % L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
-------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------

#### 2.4.1.1 Puffer und Supplemente für die ES-Zellkultur

- 0,1 %ige Gelatine: 1 mg/ml
- Basen Stammlsg.:  
40 mg Adenosin  
42,5 mg Guanosin  
36,5 mg Cytosin  
36,5 mg Uridin  
12 mg Thymidin  
in 50 ml vorgewärmten H<sub>2</sub>O lösen.
- DNase (1 %ig): 10 mg/ml DNase in 1 x PBS
- Fibronectin Stammlsg. (1 mg/ml): 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O
- PBS/EDTA (0,04 %):  
500 ml 1 x PBS  
200 mg EDTA  
pH auf 7,2 einstellen.
- HEPES-Puffer (1 M):  
26 g HEPES-Natriumsalz,  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O  
auf pH 7,4 einstellen.

- Insulin Stammlsg. (5 mg/ml): 50 mg Insulin  
In 10 ml 10 mM NaOH lösen.
- Natrium-Selenit Stammlsg. (500  $\mu$ M): 0,0865 g Natrium-Selenit  
in 10 ml H<sub>2</sub>O lösen (= 100 x) lösen.  
15  $\mu$ l von Natrium-Selenit (100 x) *ad*  
15 ml H<sub>2</sub>O (= 0,5  $\mu$ M).
- Progesteron Stammlsg. (20  $\mu$ M): 0,032 g Progesteron  
in 50 ml EtOH abs. lösen (= 100 x).  
30  $\mu$ l von Progesteron (100 x) auf 3 ml  
EtOH abs. geben (= 0,02  $\mu$ M).
- Putrescin Stammlsg. (0,1 M): 0,16 g Putrescin  
in 10 ml H<sub>2</sub>O lösen.
- Transferrin Stammlsg. (10 mg/ml): 1 g Transferrin  
in 100 ml H<sub>2</sub>O lösen.
- Trypsin/EDTA ((1 x) = (0,125 %)): 1 ml 10 x Trypsin/EDTA  
in 9 ml 1 x PBS lösen.

**Tabelle 8: Wachstumsfaktoren und Bestandteile der Zellkulturgefäßbeschichtung**

Bestandteil	Vorverdünnung		Endverdünnung	
	Lösungsmittel	Konzentration	Lösungsmittel	Konzentration
AA	EtOH abs.	100 mM	1:500	200 µM
EGF	0,1 %BSA 0,575 µl/ml Essigsäure in PBS	10 µg/ml	1:500 im Medium	20 ng/ml
bFGF	0,1 % BSA in PBS	10 µg/ml	1:1000 im Medium	10 ng/ml
Forskolin	EtOH abs.	10 mM	1:1000 im Medium	10 µM
Ln	Tris buffered saline (TBS) (Auslieferungszustand)	1 mg/ml	1:500 in PBS im Zellkulturgefäß	20 µg/ml
PDGF-AA	0,1 %BSA 4 mM HCl in H <sub>2</sub> O	10 µg/ml	1:1000 im Medium	10 ng/µl
PO	H <sub>2</sub> O	1,5 mg/ml	1:100 in H <sub>2</sub> O	15 µg/ml
T3	31 mM NaOH	30 µg/µl	1:1000	30 ng/µl



### 2.4.1.2 Medien für die ES-Zellkultur

- DMEM: 4,5 mg/ml Glucose  
0,12 mg/ml Pyruvat
  
- DMEM-ES: DMEM  
1 ml/100ml  
Basen Stammlsg./DMEM  
1 ml/100ml  
Nicht-essentielle Aminosäuren/DMEM  
0,7 µl/100ml  
β-Mercaptoethanol/DMEM  
25 mM HEPES-Puffer
  
- DMEM-ES-Prol: DMEM-ES  
20 % FCS  
0,01 % Lif
  
- DMEM/10 %FCS: DMEM  
10 % FCS
  
- DMEM-ES-Diff: DMEM-ES  
10 % FCS  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin
  
- Einfriermedium (für N3EFL): Cell Freezing Medium-DMSO von Sigma

- ITS-Medium:
  - DMEM/F12
  - 5 µg/ml Insulin
  - 0,03 µM Na-Selenit
  - 0,05 mg/ml Transferrin
  - 100 U/ml Penicillin
  - 100 µg/ml Streptomycin
  
- N2-Medium:
  - DMEM/F12
  - 2 mM L-Glutamin
  - 1,54 mg/ml Glucose
  - 25 µg/ml Insulin
  - 0,02 µM Progesteron
  - 0,1 mM Putrescine
  - 0,03 µM Na-Selenit
  - 0,1 mg/ml Transferrin
  - 100 U/ml Penicillin
  - 100 µg/ml Streptomycin
  
- N3-Medium:
  - DMEM/F12
  - 25 µg/ml Insulin
  - 0,02 µM Progesteron
  - 0,1 mM Putrescine
  - 0,03 µM Na-Selenit
  - 0,05 mg/ml Transferrin
  - 100 U/ml Penicillin
  - 100 µg/ml Streptomycin

## 2.4.2 Lösungen für den Migrationsassay

An dieser Stelle wird dargestellt, wie die Supplemente des Migrationsassays gelöst wurden. In der Liste erscheinen nur die Bestandteile des Assays, welche noch nicht in den vorangegangenen Kapiteln aufgeführt sind, weil sie unter anderem auch zur Zellkultivierung genutzt wurden.

**Tabelle 9: Supplemente des Migrationsassays**

Bei Felder, welche mit „-----“ sind, trifft die entsprechende Bedingung nicht zu.

Supplement	Beschreibung	Verdünnung	
		Vorverdünnung im Lösungsmittel	Endkonzentration im Medium
Gehirnpräparation	Gesamtgehirn (ohne <i>Cerebellum</i> ) wurde mit Rasierklinge in möglichst kleine Stücke zerteilt.	Gehirnstücke in 2ml Medium homogenisiert.	Gehirnsuspension: Medium (1:4)
HA	Hyaluronan	H <sub>2</sub> O	10 µg/ml oder 100 µg/ml
HA-TRITC	TRITC markiertes Hyaluronan <sup>1</sup>	H <sub>2</sub> O	10 µg/ml oder 100 µg/ml
Hyaluronidase	Hyaluronan-abbauendes Enzym	1000 U/ml H <sub>2</sub> O	1 U/ml Passi <i>et al.</i> (2004)
Ionomycin	Ionophor, bewirkt intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Anstieg	1,41 mM DMSO	5 µM
Neg. Kontrollen: Die verwendeten Lösungsmittel	Lösungsmittel, in denen Supplemente gelöst wurden.	-----	Gleiche Endkonzentration im Medium, wie entsprechendes Supplement.
PP2	Src-Inhibitor	10 mM DMSO	10 µM Hsia <i>et al.</i> (2005)

<sup>1</sup> Hergestellt von T. Kaminski (Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Bonn)

### 2.4.3 Lösungen und Medien für die Bakterienkultur

- Agarplatten LB-Medium: 1,5 % Agar  
autoklavieren, auf 50 °C abkühlen lassen und in Petrischalen gießen.  
Ggf. 50 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion hinzufügen.
  
- LB-Medium: 1 % NaCl  
1 % Hefe-Extrakt  
0,5 % Trypton  
auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.

### 2.4.4 Lösungen für molekularbiologische Untersuchungen

- 50 x TAE: 2,5 M Tris  
100 mM EDTA  
1 M Natriumacetat  
mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen
  
- L(IV)-Puffer: (0,25 mM Bromphenolblau)  
30 % Glycerin (100 %)  
10 mM Tris/HCl  
auf pH 7,0 einstellen.

### 2.4.5 Lösungen für proteinbiochemische Untersuchungen

- 4 x Lämmliprobenpuffer: 8 % SDS  
40 % Glycerol  
240 mM Tris-HCl, pH 6,8  
(reduzierend) (4 % β-Mercaptoethanol)  
0,5 % Bromphenolblau

- 10 x SDS-Laufpuffer: 250 mM Tris-Base  
1,9 M Glycin  
1 % SDS
- 10 x TBS: 100 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0  
300 ml 5 M NaCl  
ad 1000 ml *aqua dest.*
- APS: 10 % Ammoniumperoxydisulfat
- AP-Färbelösung: 100 mM Tris-HCl, pH 9,5  
100 mM NaCl  
50 mM MgCl<sub>2</sub>  
200 µl NBT/BCIP-Stocklösung  
auf 10 ml mit H<sub>2</sub>O-bidest auffüllen.
- AP-Stopplösung: 20 mM EDTA
- Blotpuffer: 48 mM Tris-Base  
39 mM Glycin  
auf pH 8,5 einstellen  
0,037 % SDS  
20 % Methanol
- HEPES-Puffer (HP): 10 mM HEPES pH 7,4  
150 mM NaCl  
2 mM PMSF  
1 µg/ml Leupeptin  
1 µg/ml Pepstatin  
2 mM EDTA  
(reduzierend) (0,5 mM DTT)  
5 % Glycerol  
0,1 % Triton X-100

- hypotoner HEPES-Puffer (hHP):  
(mit Proteaseinhibitoren)
  - 25 mM HEPES pH 7,4
  - 10 µg/ml PMSF
  - 1 µg/ml Leupeptin
  - 1 µg/ml Pepstatin
  - 5 mM EDTA
  
- isotoner HEPES-Puffer (iHP):  
(mit Proteaseinhibitoren)
  - 25 mM HEPES pH 7,4
  - 10 µg/ml PMSF
  - 1 µg/ml Leupeptin
  - 1 µg/ml Pepstatin
  - 5 mM EDTA
  - 300 mM Sucrose
  
- Ponceau-S-Lösung:
  - 0,2 % Ponceau S
  - 3 % Trichloressigsäure
  
- Sammelgelpuffer:
  - 500 mM Tris-HCl, pH 6,8
  
- TBS/T:
  - 1 x TBS
  - 0,05 % Tween
  
- Trenngelpuffer:
  - 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

#### 2.4.6 Sonstige Lösungen und Puffer

- 0,1 M Borat Puffer:
  - 0,1 M Borax in H<sub>2</sub>O
  - pH 7,5
  
- 10 x PBS:
  - 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
  - 1,5 M NaCl
  - 25 mM KCl
  
- BrdU-Stammlösung:
  - 10 mM in H<sub>2</sub>O
  
- DAPI-Stammlösung1:
  - 5 mg/ml in H<sub>2</sub>O

- DAPI-Stammlösung2: 20 mg/ml in NaHCO<sub>3</sub> pH 7,4
- Mowiol: nach Osborn und Weber (1982)
- Phalloidin-TRITC-Stammlösung: 1 mg/ml in Methanol
- Propidiumiodid-Stammlösung: 1 mg/ml in PBS

## 2.5 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 10: Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Zelllinie (Spezies)	Herkunft
B35	Neuroblastomzellen (Ratte)	Schubert <i>et al.</i> (1974)
C6	Gliomazellen (Ratte)	Benda <i>et al.</i> (1968)
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen Zellen (Maus, Cj7)	Swiatek und Gridley (1993)
Mitotisch inaktivierte Feederzellen (γEF)	Embryonale Fibroblasten (Maus)	Institut für Neuropathologie (Bonn)
N3EFL (N3-Medium, EGF, FGF, Laminin)	Gliale Vorläuferzellen (Maus)	Brüstle <i>et al.</i> (1999) (Kultiviert auf PO/Ln- Beschichtung)

## 2.6 Bakterienstamm

Kompetente *E.coli* XL1-blue.

## 2.7 Tiere

Tabelle 11: Tiere

Tiere	Stamm	Verwendung
Mäuse (p8-p9)	C57 black 6	Gehirnpräparation: Der Effekt der Zugabe von Gehirnfragmenten in den 2-dimensionalen Migrationsassay wurde getestet.
Ratten (p9-p10)	Sprague Dawley	Slicekulturen

## 2.8 Plasmide

Tabelle 12: Plasmide

Plasmid (Herkunft)	Verwendung
(Kandidatengen)-pEGFP-N2 (GenBank Accession #:U57608) In die MCS wurden verschiedene Kandidatengene kloniert: <ul style="list-style-type: none"> <li>• BDNF</li> <li>• CD44</li> <li>• CXCR4</li> <li>• LYVE</li> <li>• NCAM-180</li> </ul>	Zur Expression von Fusionskonstrukten der Kandidatengene mit GFP in Kulturzellen.
EGFR-pEGFP-N3 (Brock <i>et al.</i> (1999))	Zur Expression von EGFR (= Kandidatengen) als GFP-Fusionskonstrukt in Kulturzellen.
(Kandidatengen)-pcDNA3	Zur Expression der Kandidatengene in Kulturzellen.
(Kandidatengen)-pcmvSPORT	Zur Expression der Kandidatengene in Kulturzellen.
pEGFP-C2 (GenBank Accession #:U57606)	Als Negativkontrolle bei Migrations- und Invasionsstudien.
pIRES2-EGFP	Zur Expression in Kulturzellen.
Src-pEGFP-N1 (Sandilands <i>et al.</i> (2004))	Zur Expression von Src (= Kandidatengen) als GFP-Fusionskonstrukt in Kulturzellen.



## 2.9 Oligonukleotide (Primer)

Tabelle 13: Primer

Name	sense	antisense	Fragment- größe [bp] (cDNA)	Herkunft
Mycoplasmenprimer	5-CACCATCTGTCACTCTGTTAACC-3	5-GGAGCAAACAGGATTAGATACCC-3	270	
pEGFP-Nseq	5-AGAGCTGGTTTAGTGAACCG-3		----	Sequenzierungsprimer
pGFP-N2-Seq-A	5-GATGGGCACCACCCCGG-3		----	Sequenzierungsprimer

## 2.10 Antikörper

Die Antikörper wurden vor ihrer Verwendung immer für ca. eine Minute bei 16.100 g zentrifugiert, um eine Aggregatbildung zu vermeiden.

**Tabelle 14: Primärantikörper**

Wurden die aufgelisteten Antikörper unter einer bestimmten Bedingung nicht verwendet, so ist dies mit (----) gekennzeichnet.

Antigen (ggf. Bezeichnung) Spezies	Wirt	Herkunft	Bestell- nummer	Immunfärbung		Western Blot
				Verd.	Triton	Verd.
<b>A2B5</b>	Maus	Millipore	MAB 312R	1:2.000	nein	----
<b>BrdU</b> , monoclonal, spezieskonform	Maus	BD	347580	1:33	ja	----
<b>CD44 (BRIC 235)</b> , Monoclonal, Mensch	Maus	BGRL	9407	----	----	----
<b>CD44 (5G8)</b> , monoclonal, Ratte	Maus	Hybridoma- überstand, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H. Ponta (Forschungs- zentrum Karlsruhe)		----	----	1:1.000
<b>CD44 (IM7)</b> , monoclonal, Maus	Ratte	BD	553131	----	----	1:5.000
<b>EGFR</b> , polyclonal, Mensch, Maus, Ratte	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	Sc-03	1:250	nein	1:1.000

Antigen (ggf. Bezeichnung) Spezies	Wirt	Herkunft	Bestell- nummer	Immunfärbung		Western Blot
				Verd.	Triton	Verd.
<b>GFAP</b> , monoclonal, Mensch, Schwein, Ratte	Maus	MP Biomedicals	69110	1:100	ja	-----
<b>GFP</b> , polyclonal	Kaninchen	abcam	ab290	1:1.000	ja	1:5.000
<b>O4</b>	Maus	R&D Systems	MAB1326	1:100	nein	-----
<b>Src</b> , monoclonal, Mensch, Maus, Ratte	Maus	Invitrogen	AHO1152	1:300	ja	1:5.000

**Tabelle 15: Sekundärantikörper**

AP = alkalische Phosphatase; WB = Western Blot; ICC = Immunzytochemie

Antigen	Gekoppelt an	Wirt	Herkunft	Bestellnummer	Verdünnung (Anwendung)
Kaninchen	AP	Ziege	Sigma Aldrich	A3687	1:5.000 (WB)
Kaninchen IgG (H+L)	Cy3 (rot)	Ziege	Jackson Immuno Research	111-165-003	1:250 (ICC)
Maus IgG+IgM (H+L)	AP	Ziege	Dianova	115-055-068	1:5.000 (WB)
Maus IgG+IgM (H+L)	Cy3 (rot)	Ziege	Jackson Immuno Research	115-165-044	1:250 (ICC)
Maus IgG (H+L)	FITC (grün)	Ziege	Dianova	115-095-003	1:100 (ICC)
Ratte IgG (H+L)	AP	Ziege	Dianova	112-055-003	1:5.000 (WB)

## **3 Methoden**

### **3.1 Zwei-Photonen-Mikroskopie**

Bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie wird der Effekt ausgenutzt, dass durch simultane Anregung mit zwei Photonen, nicht unbedingt der selben Frequenz, dieselbe Energiemenge an ein Fluoreszenzmolekül übertragen werden kann, wie mit einem Photon der doppelten Energie.

Dazu müssen beide Photonen simultan auf dasselbe Fluorochrom treffen. Die Wahrscheinlichkeit einer Zwei-Photonen-Anregung hängt quadratisch von der Lichtintensität ab. Diese nimmt mit dem Abstand vom Fokus stark ab, so dass nur Fluorochrome angeregt werden, welche sich unmittelbar um den Fokus des Objektivs herum, dem Anregungsvolumen, befinden. Die Größe des Anregungsvolumens hängt von der numerischen Apparatur des Objektivs und der verwendeten Anregungswellenlänge ab.

Bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie ist im Vergleich zu der Ein-Photonen Laser Scanning Mikroskopie (LSM) auch keine konfokale Lochblende (pinhole) vor dem Detektor notwendig (Pawley (2006)). Die Zwei-Photonen-Anregung eines Präparats mit einem Laser-Scanning-Mikroskop bietet eine räumliche Auflösung dreidimensionaler Objekte und eine Reduktion des Hintergrundrauschens (Denk *et al.* (1990)). Dadurch ist die Darstellung auch von tiefsitzenden Strukturen in Gewebsschnitten möglich.

In Zusammenarbeit mit Dr. M. Hans (Institut für Physiologie II, Bonn) wurden transplantierte Zellen in Hippocampusschnitten mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie detailliert untersucht. Die dreidimensionale Rekonstruktion der Zellen im Gewebe wurden von Dr. M. Hans mit dem Programm AutoVisualize AutoDeblur durchgeführt.

### **3.2 Zellkultur**

Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C kultiviert. Die Zellkulturinkubatoren wurden dementsprechend halbjährig kalibriert. Das Arbeiten mit den Kulturzellen, sowie den entsprechenden Medien und Zusätzen erfolgte unter Sicherheitswerkbänken der Klasse 2.

Verwendete Medien und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, auf 37 °C vorgewärmt.

Zur allgemeinen Kontrolle wurden die verwendeten Zelllinien mittels PCR regelmäßig auf Mycoplasmenkontaminationen geprüft.

### **3.2.1 Auftauen von Zellen**

Ein Kryovial mit den aufzutauenden Zellen wurde der -80 °C-Truhe entnommen und bei 37 °C im Wasserbad erwärmt, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen sichtbar war. Zuvor wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen 8 ml vorgewärmtes (ca.15 min in 37 °C Wasserbad) Kulturmedium vorgelegt. Die Zellsuspension aus dem Kryovial wurde unmittelbar nach dem Erwärmen in das vorbereitete Zentrifugenröhrchen überführt. Ein weiterer Milliliter des Mediums diente zum erneuten Ausspülen des Kryovials, um auch die restlichen Zellen in das Zentrifugenröhrchen überführen zu können. Es folgten eine Zentrifugation von 5 min bei 1.000 rpm - 1.200 rpm (Labofuge 400e) und das Absaugen des Überstandes, bis lediglich ein geringes Volumen an Medium auf dem Zellpellet verblieb. Dieses wurde in dem entsprechenden Medium resuspendiert und die Suspension in ein Zellkulturgefäß überführt.

### **3.2.2 Zellzahlbestimmung**

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauerzählkammer benutzt. Die Zellen in 10 µl Zellsuspension (Im Falle eine Lebendzellfärbung: 5 µl Zellsuspension + 5 µl Trypanblau) wurden in vier Großquadraten ausgezählt. Der Mittelwert (Resultat der Quantifizierung dividiert durch vier) multipliziert mit 10.000 entsprach der Zellanzahl in einem Milliliter Zellsuspension. Nach einer Trypanblaufärbung wurde dieses Produkt noch mit zwei multipliziert, um die Anzahl der lebenden Zellen zu ermitteln.

### **3.2.3 Passagieren von Zellen**

Die Kulturzellen wurden zur Expansion abhängig von ihrem Proliferationsstatus regelmäßig passagiert. B35-Neuroblastomzellen wurden bei einer Konfluenz von 80 % - 100 % in einem Verhältnis von 1:5 gesplittet. Bei der selben Konfluenz erfolgte die Teilung der C6 Gliomzellen in einer Relation von 1:5 bis 1: 20.

Im Folgenden wird das Passagieren der Zellen aus einer T75-Zellkulturflasche heraus mit den entsprechenden Volumenangaben beschrieben.

Zunächst wurde das Medium aus der Flasche abgesaugt. Dann erfolgte ein vorsichtiges Waschen der Zellen mit 10 ml PBS, um tote Zellen und FCS-Reste zu entfernen. Die anschließende Inkubation (1 min bei 37 °C) mit 2 ml Trypsin bewirkte ein Ablösen der Zellen, so dass diese im Zellkulturgefäß mit zusätzlichen 8 ml Medium suspendiert werden konnten. Danach wurden sie in ein Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend bei 1.200 rpm (Labofuge 400e) für 5 min zentrifugiert. Das FCS im Medium inhibierte das Trypsin.

Nach der Zentrifugation wurde das Medium über dem entstandenen Zellpellet abgesaugt, dieses in 10 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert und die Zellen im gewünschten Verhältnis wieder ausplattiert.

### **3.2.4 Einfrieren von Zellen**

Die ersten Schritte des Einfrierprozesses entsprechen denen der Passagierung (s. 3.2.4). Abweichend dazu wird das Zellpellet nach dem Zentrifugationsschritt in einem Milliliter Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryovial überführt. Dieses wird sofort auf Eis gelagert, und die Zellen werden anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

### **3.2.5 Poly-L-Ornitin/Laminin Beschichtung von Zellkulturgefäßen**

Für eine PO/Ln Beschichtung wurden die Zellkulturgefäße zunächst mit PO beschichtet.

PO (1,5 mg/ml) wurde in *aqua dest.* 1:100 verdünnt (Endkonzentration 15 µg/ml), steril filtriert und in folgenden *Volumina* in die Zellkulturgefäße pipettiert:

3 cm-Schale:	1,5 ml PO
6 cm-Schale:	3 ml PO
10 cm-Schale:	5 ml PO

Es folgte eine mindestens zwei stündige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank.

Anschließend wurde das PO abgesaugt und die Zellkulturgefäße wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Beim dritten Mal wurde dem Kulturgefäß, PBS mit Ln (1 mg/ml) in einem Verhältnis von 1:500 (Endkonzentration 2 µg/ml) in den unten aufgeführten Relationen, hinzugefügt:

3 cm-Schale:	1 ml PBS
6 cm-Schale:	2 ml PBS
10 cm-Schale:	4 ml PBS

Nach einer weiteren Inkubation von mindestens einer Stunde bei 37 °C im Brutschrank und dem Absaugen der flüssigen Phase, konnten Zellen auf den PO/Ln vorbeschichteten Zellkulturgefäßen ausplattiert werden.

### **3.2.6 Gliale Vorläuferzellen**

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. T. Glaser aus dem Arbeitskreis von Professor Dr. O. Brüstle (Institut für Neuropathologie, Bonn) wurden für diese Arbeit embryonale Stammzellen der Maus zu glialen Vorläuferzellen (N3EFL) vordifferenziert, kultiviert, transfiziert und für Migrations- und Invasionsstudien genutzt oder ausdifferenziert.

#### **3.2.6.1 Prädifferenzierung zu glialen Vorläuferzellen**

Die neuronalen Vorläuferzellen wurden durch eine sukzessive Kultivierung aus ES-Zellen differenziert. Im Folgenden werden die einzelnen Kultivierungsschritte detailliert beschrieben.

##### **3.2.6.1.1 Auftauen von Feederzellen**

Zwei Tage bevor die ES-Zellen in Kultur genommen wurden, wurden mitotisch inaktivierte embryonale Fibroblasten ( $\gamma$ EF, auch Feederzellen genannt) aufgetaut. Für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Stadiums der verwendeten ES-Zelllinie ist die Kokultur mit den teilungsunfähigen Fibroblasten notwendig.

Die  $\gamma$ EF wurden wie in 3.2.1 beschrieben, in 6 ml DMEM/10 % FCS aufgetaut. Jeweils 3 ml dieser Zellsuspension wurden auf 6 cm-Schalen ausplattiert.

### **3.2.6.1.2 Auftauen von embryonalen Stammzellen**

Ein Kryoröhrchen mit ES-Zellen (CJ7) (1,25 Mio. Zellen) wurde, wie in 3.2.1 beschrieben, unter Verwendung des DMEM-ES-Prol Mediums aufgetaut. Dabei wurde das Zellpellet in 6 ml resuspendiert und auf zwei 6 cm-Schalen mit konfluenten  $\gamma$ EF überführt.

### **3.2.6.1.3 Passage auf Gelatine**

Zwei bis drei Tage nach dem Auftauen erfolgte die Passage der ES-Zellen auf Gelatine-beschichtete Zellkulturgefäße. Bis zu diesem Zeitpunkt fand täglich ein Mediumwechsel statt. Die Beschichtung wurde genutzt, um die Differenzierung zu starten und die  $\gamma$ EFs aus der Kultur zu entfernen.

Die 6 cm-Schalen wurden für 20 min bei Raumtemperatur (RT) mit 0,1 % Gelatine inkubiert.

Die auf den Feederzellen gewachsenen ES-Zellen wurden dreimal mit PBS/EDTA gewaschen und anschließend trypsiniert (1,5 ml pro Schale). Sobald sich die Zellen vom Untergrund lösten, wurden sie mit einer geflämmten Pasteurpipette (durch die Hitzeinwirkung zog sich das Glas zusammen, so dass die Pipettenöffnung verkleinert wurde) vereinzelt und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit DMEM/10 % FCS überführt, um die Wirkung des Trypsins abzustoppen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit 1.000 rpm (Tischzentrifuge 5810 R) für 5 min bei 4 °C. Das Zellpellet wurde in DMEM-ES-Prol resuspendiert und 2 - 2,5 Mio. Zellen wurden in 3 ml Medium auf einer mit Gelatine beschichteten 6 cm-Schale plattiert.

### **3.2.6.1.4 Herstellen von Embryoidkörpern (EBs)**

Die Differenzierung der ES-Zellen wurde durch den Entzug von LIF und der Bildung von EBs induziert. Dies sind Sphäroide, welche durch Aggregation von ES-Zellen entstehen und in welchen die Zellen spontan in Derivate aller drei Keimblätter differenzieren. Diese Differenzierung ist ungerichtet. Für die Aggregation zu EBs sollten die ES-Zellen subkonfluent sein.

Ein bis zwei Tage nach der Passage auf Gelatine wurden die EBs gebildet. Dazu wurden pro ES-Zellkulturschale jeweils 3 ml DMEM-ES-Diff in acht unbeschichtete 6 cm-Bakterienkulturschalen (Nunc) vorgelegt.



Die ES-Zellen wurden dreimal mit PBS/EDTA gewaschen und mit 1,5 ml Trypsin/EDTA von der Schale trypsinisiert. Zur Bildung der *EBs* dürfen die Zellen nicht vereinzelt werden. Sie müssen als Zellaggregate von der Schale gespült werden. Aus diesem Grunde wurden die Zellen in einem Pipettierschritt mit 6,5 ml DMEM-ES-Diff abgespült, die entstandene Zellsuspension wurde vorsichtig wieder aufgenommen und je 1 ml wurde auf die acht vorbereiteten Bakterienkulturschalen verteilt.

Am darauf folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um tote Zellen zu entfernen. Die *EBs* aus acht Kulturschalen wurden in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nachdem diese sedimentiert waren, wurde der Überstand bis auf 5 ml abgenommen und 27 ml frisches DMEM-ES-Diff darauf pipettiert. Es folgte ein vorsichtiges Resuspendieren der *EBs*, um anschließend wieder jeweils 4 ml dieser Suspension auf die schon zuvor benutzten Kulturschalen zurückzugeben.

#### **3.2.6.1.5 Plattieren der *EBs* und Transfer zu ITSFn**

Durch das Plattieren von *EBs* können Zellen aus den Zellaggregaten auswandern. Dadurch können neurale Precursor einfacher selektioniert werden. Durch die Verwendung eines speziellen serumfreien Mediums (s. unten) wurde das Überleben der neuronalen Vorläuferzellen gefördert und das Wachstum anderer Zellen inhibiert.

Drei Tage alte *EBs* wurden wie beim Mediumwechsel (s. 3.2.6.1.3) in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Sedimentation wurde der Überstand wieder auf 5 ml abgesaugt und die *EBs* wurden vorsichtig in 15 ml DMEM-ES-Diff resuspendiert. Insgesamt wurden die *EBs* aus acht 6 cm-Kulturschalen auf ein bis zwei 10 cm-Zellkulturschalen gleichmäßig ausgesät. Am folgenden Tag wurden die plattierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um das FCS zu entfernen. Die neurale Selektion wurde durch die Kultivierung der Zellen in ITS-Medium mit Fibronectin (ITSFn-Medium) gestartet (Endkonzentration Fibronectin = 2,5 µg/ml). Alle zwei Tage wurde aufgrund des starken Zelltodes ein Mediumwechsel durchgeführt.

### **3.2.6.1.6 Transfer in N3FL-Medium**

In diesem Stadium sollten die neuronalen Zellpopulationen zur verstärkten Proliferation angeregt werden. Deshalb wurden die Zellen in basic FGF haltiges N3-Medium überführt. Basic FGF fördert das Wachstum der multipotenten neuronalen Vorläuferzellen.

Vier Tage alte ITSFn-Zellkulturen wurden dreimal mit PBS gewaschen, die Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA von der Schale abgelöst, und das Trypsin wurde mit 5 ml DMEM + 10% FCS inhibiert. Die Zellen wurden in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und nach einem weiteren Spülen der Schale bei 1.000 rpm (Tischzentrifuge 5810 R) für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 3 ml 0,1 %iger DNase-Lösung (Stammlösung 1:10 verdünnt in PBS) resuspendiert. Die DNase-Lösung vermied ein Verklumpen der Zellen durch die freigesetzte DNA. Diese Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und vorsichtig unter Verwendung von drei geflämmten Pasteurpipetten (s. 3.2.6.1.3) zu einer Einzelzellsuspension trituriert. Die Öffnungen der Pasteurpipetten waren graduell verkleinert. Unter dem Mikroskop wurde der Prozess des Vereinzeln überprüft. Die verbliebenen Zellklümpchen wurden durch die Filtration der Zellsuspension durch ein 40 µm-Zellsieb in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen und das anschließende Spülen des Filters mit 7 ml PBS entfernt. Nach einer Zentrifugation von 1.000 rpm (Tischzentrifuge 5810 R) für 7 min bei 4 °C wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden in N3-Medium resuspendiert. Es wurden 3 - 4 Mio. Zellen pro PO-vorbeschichteter 10 cm-Kulturschale (s 3.2.5) ausplattiert. Kurz vor Gebrauch wurden die beschichteten Schalen dreimal mit PBS gewaschen. Zu dem N3-Medium wurde basic FGF in einer Konzentration von 10 ng/ml und Ln in einer Konzentration von 1 ng/ml hinzugefügt. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Für eine Dauer von vier Tagen wurde dem Medium jeden Tag basic FGF hinzugefügt und alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

### **3.2.6.1.7 Transfer in N3EFL-Medium**

Durch Überführung in ein basic FGF/EGF-haltiges Medium wurden aus den neuronalen Vorläuferzellen gliale Vorläuferzellen separiert.

Vier Tage nach Proliferation der N3FL-Kulturen wiesen diese eine 80 - 90 %ige Konfluenz auf. Zum Passagieren wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, 3 ml einer 0,1 %igen DNase-Lösung zu der Schale hinzugefügt, um anschließend unter Verwendung eines Zellschabers die Zellen mechanisch von der Schale abzulösen. Mit einer geflämmten Pasteurpipette folgte eine Vereinzelung der Zellen. Die Zellsuspension wurde durch ein 40 µm-Zellsieb gegeben, um Zellklümpchen zu entfernen. Die Schale und das Sieb wurden erneut mit 7 ml PBS gespült und die Zellen bei 1.000 rpm (Tischzentrifuge 5810 R) für 7 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in N3-Medium unter Zugabe von 10 ng/ml basic FGF, 20 ng/ml EGF und 1 ng/ml Laminin resuspendiert. Anschließend wurde diese Zellsuspension auf einer PO-vorbeschichteten Zellkulturschale (s 3.2.5) ausgesät. Die Wachstumsfaktoren wurden täglich erneut hinzugefügt und das N3EFL-Medium alle zwei Tage gewechselt.

Das Passagieren der Zellen wurde wie oben beschrieben durchgeführt, bis die Zellkultur homogen war und die prädifferenzierten glialen Vorläuferzellen (N3EFL), wie in 3.2.6.2 beschrieben, kultiviert und für verschiedene Experimente genutzt werden konnten.

### **3.2.6.2 Kultivieren von glialen Vorläuferzellen**

Eingefrorene N3EFL wurden, wie in 3.2.1 beschrieben, aufgetaut. Die Zellen wurden auf PO/Ln vorbeschichteten Zellkulturgefäßen (s. 3.2.5) kultiviert. Dabei wurden 3 - 4 Millionen Zellen beim Auftauen in einer 6 cm-Schale (BD, Falcon) ausplattiert. An den Rand des Zellkulturgefäßes wurden zusätzlich Wachstumsfaktoren in folgenden Endkonzentrationen in das N2-Medium pipettiert:

- EGF (20 ng/ml) (≅ 1:500 vom EGF-Stammlsg. (10 µg/ml))
- FGF (10 ng/ml) (≅ 1:1000 vom FGF-Stammlsg. (10 µg/ml))
- Forskolin (10 mM) (≅ 1:1000 vom Forskolin-Stammlsg. (10 µM))

und anschließend durch Schwenken des Zellkulturgefäßes im Medium vermischt.

Bis die Zellen eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht hatten, wurde abwechselnd ein Mediumwechsel oder eine Faktorenzugabe in einem täglichen Rhythmus durchgeführt.

Das Mediumvolumen bei einem Wechsel stand dabei in folgender Relation zur Größe der Zellkulturgefäße:

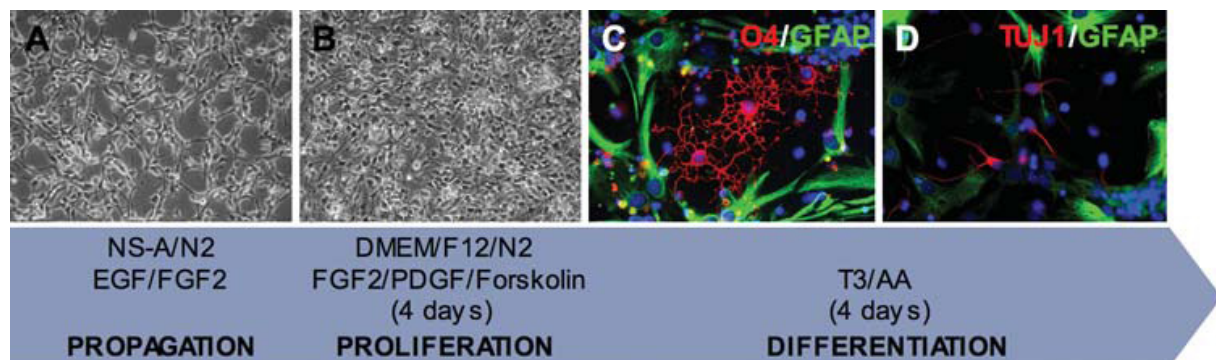
- 3 cm Schale: 1,5 ml Medium
- 6 cm Schale: 3 ml Medium
- 10 cm Schale: 5 ml Medium.

Das Austauschen des Mediums wurde ebenfalls unter äquivalenter Zugabe der oben genannten Wachstumsfaktoren durchgeführt.

Sobald die Zellen entsprechend proliferiert hatten, wurden sie in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:3 gesplittet.

Die Zellen wurden unter Verwendung des Einfriermediums von Sigma (C6295), wie in 3.2.4 beschrieben, eingefroren.

### 3.2.6.3 Ausdifferenzieren von neuralen Vorläuferzellen



**Abbildung 9: Differenzierung neuraler Vorläuferzellen (Glaser *et al.* (2007))**

Die Abbildung stellt die Differenzierung von neuralen Vorläuferzellen zu drei unterschiedlichen Zelltypen des ZNS dar. (A) Die Zellen wurden in NS-A Medium (Euroclone, Italien) mit N2 Supplementen (Invitrogen, Karlsruhe) unter Zugabe von EGF und bFGF kultiviert. (B) Zur Proliferation wurden sie vier Tage in N2-Medium mit bFGF, PDGF und Forskolin auf Po/Ln beschichteten Platten kultiviert. (C,D) Die Zellen wurden vier Tage lang unter täglicher Zugabe von T3 und AA und unter Entzug der anderen Wachstumsfaktoren ausdifferenziert. (C) Die Immunfärbung des O4-Antigens wies Oligodendrozyten, und die positive Färbung für GFAP wies Astrozyten, nach. (D) Auch  $\beta$ -III-tubulin/TUJ1-positive Neuronen konnten nach der Differenzierung immunocytochemisch sichtbar gemacht werden.

Zur Ausdifferenzierung der N3EFL wurde analog zu den Beschreibungen von Glaser *et al.* (2007) verfahren (s. Abbildung 9). Zunächst proliferierten die Zellen unter dem Einfluss von 10 ng/ $\mu$ l bFGF, 10 ng/ $\mu$ l PDGF und 10  $\mu$ M Forskolin im N2-Medium. Im Anschluss daran wurden sie einer viertägigen Differenzierung unterzogen. Hierzu wurden die Faktoren entzogen und stattdessen wurden sie weiterhin in N2-Medium unter täglicher Zugabe von 30 ng/ $\mu$ l T3 und 200  $\mu$ M AA kultiviert.

### **3.2.7 Transfektion**

Die Kandidatengene wurden in dem Migrations- und Invasionsassay sowie für verschiedene immunzytосhemische Experimente mittels verschiedener Transfektionstechniken in den entsprechenden Zellen überexprimiert.

#### **3.2.7.1 Transfektion mit ExGen 500**

ExGen 500 ist ein Polyethylenimin. Der Hersteller selber bezeichnet das kationische Polymer als „Protonenschwamm“ (Fermentas).

Der ExGen 500/DNA-Komplex setzt sich nach Zugabe in den Zellkulturüberstand auf der Zellmembran durch Gravitation ab und wird endozytiert. Das Reagenz puffert den sauren pH-Wert der Endosomen. Sie zerreißen und die DNA gelangt in das Zytosol. Ein lysosomaler Abbau der Plasmid-DNA wird so umgangen. Auf diese Weise kann sie in den Zellkern gelangen.

Entsprechende Volumina des Plasmids und einer 150 mM NaCl-Lösung (s. Tabelle 16) wurden in einem 1,5 ml-Reagiergefäß zusammenpipettiert (= DNA-Ansatz). Auch das ExGen 500 Reagenz wurde mit einer 150 mM Kochsalzlösung (s. Tabelle 16) äquivalent vermischt (= ExGen-Ansatz). Der ExGen-Ansatz wurde zu dem DNA-Ansatz gegeben, das Ganze ca. 10 s gevortext, anschließend 10 min bei RT inkubiert und dann in die entsprechenden Kavitäten pipettiert. Wurden die Zellen zuvor in FCS-haltigem Medium kultiviert, erfolgte vor der Transfektion ein Waschschrift mit PBS, um die Serumreste zu entfernen und um ein Mediumwechsel zu FCS-freiem Medium zu gewährleisten. 5 - 19 h nach diesem Mediumwechsel wurden die Zellen wieder mit serumhaltigen Medium kultiviert.

**Tabelle 16: Transfektionsansätze mit ExGen 500**

Soweit nicht anderes erwähnt, beziehen sich die Angaben auf alle verwendeten Zelllinien. Mit „-----“ markierte Felder bedeuten, dass in dem entsprechenden Fall keine Anwendung zutrif.

<b>Angaben für eine Kavität</b>	<b>96-well-Schale (B35)</b>	<b>96-well-Schale (N3EFL)</b>	<b>24-well-Schale</b>	<b>12-well-Schale (B35)</b>	<b>6-well-Schale (B35)</b>	<b>6-well-Schale oder 3 cm-Schale (N3EFL)</b>
Zellzahl	20.000	60.000	B35: 75.000 N3EFL: 200.000	200.000	400.000	1.000.000
Faktorengabe nach Aussaat [h] (N3EFL)	-----	ca. 12-24	ca. 12-24	-----	-----	ca. 12-24
Transfektion nach Aussaat [h]	ca. 12-24	ca. 36-48	B35: ca. 12-24 N3EFL: ca. 20-30	ca. 12-24	ca. 12-24	ca. 20-30
DNA [µg]	0,10	0,15	0,50	1,00	2,00	3,00
ad NaCl [µl]	2,50	2,50	12,50	25,00	50,00	100,00
ExGen [µl]	0,33	0,60	1,65	3,30	6,60	11,52
NaCl [µl]	2,17	1,90	10,85	21,70	43,40	88,48
Medium [ml]	0,05	0,15	0,25	0,50	1,00	2,00
Zeit nach Transfektion [h] (Zellen fixiert, gefilmt oder transplantiert)	12-30 (abhängig von Konfluenz und Transfektionseffizienz, wurde mikroskopisch kontrolliert)					

### 3.2.7.2 Nucleofektion® mit Amaxa

Bei der Elektroporation (mit dem Amaxa-System Nucleofektion® genannt) entstehen durch das Anlegen eines elektrischen Feldes mikroskopisch kleine Löcher in der Zellmembran (Zimmermann *et al.* (1974)). Daraus resultiert ein Verlust der Semipermeabilität der selbigen (Neumann und Rosenheck (1972)), wodurch die Zelle DNA aus ihrem Umgebungsmedium aufnehmen kann. Bei der Nucleofektion® handelt sich um einen nicht-viralen Gentransfer direkt in den Zellkern.

Bei dem Amaxa-System kann diese Art der effizienten Transfektion durch die Anpassung verschiedener Parameter optimiert werden:

- Verwendeter Elektroporationspuffer
- Nucleofektor-Programm (einzustellen durch das Nucleofector Device II System)
- Menge eingesetzter DNA
- Verwendetes Medium nach der Elektroporation.

Für die in dieser Arbeit elektroporierten Zellen (B35-Zellen und N3EFL-Zellen) gibt es vom Hersteller keine optimierten Protokolle. Deshalb mussten die benötigten Parameter evaluiert werden (s. Tabelle 17).

**Tabelle 17: Nucleofektionsparameter**

Die angegebenen Mengen und Volumina gelten für die Aussaat der Zellen in eine 10 cm-Kulturschale nach der Nucleofektion.

Parameter	B35-Zellen	N3EFL-Zellen
Zellzahl	12.000.000	12.000.000
Elektroporationspuffer [100 µl]	Puffer V	Puffer V
Nucleofektor-Programm	T-20	A-030
DNA [µg]	18	18
Medium [5 ml]	DMEM/F12/ 10% FCS	N2 (+ 20ng/ml EGF + 10ng/ml FGF + 10 µM Forskolin)

### 3.2.8 Fixieren, Gegenfärben und Eindeckeln von Kulturzellen

Das so genannte Paraformaldehyd vernetzt Proteine reversibel. Es fixiert auf diese Weise Zellen. So sind an den stagnierten Zellstrukturen nach einer Fixation u.a. Gegenfärbungen der *Nuclii* oder des Aktinzytoskellets sowie immunzytochemische Behandlungen (s. 3.2.9) möglich.

Für die Gegenfärbung wurden die Zellen in den Kavitäten einer 24-well-Platte auf 12 mm-Deckgläsern kultiviert. In einem Stadium von einer ca. 80 %igen Konfluenz wurden sie mittels einer Paraformaldehydlösung fixiert. Dazu wurde das Kulturmedium 1:1 mit einer 8 %igen Lösung des so genannten Paraformaldehyds verdünnt. Der resultierende 4 %ige Paraformaldehydüberstand wirkte 10 min bei RT auf die Zellen ein. Es folgte ein dreimaliges Waschen in den einzelnen Kavitäten mit PBS für jeweils 5 min.

Zum Gegenfärben wurden die Deckgläser den jeweiligen Vertiefungen der Multiwellschale vorsichtig mit einer spitzen Pipette entnommen und direkt in eine feuchte Kammer überführt. Diese war mit Alufolie lichtundurchlässig umkleidet. Im Boden waren drei zurechtgeschnittene Filterpapiere (Whatman) platziert. Das oberste wurde mit einem Bleistift mit allen relevanten Informationen in einem Raster versehen, an dem die Deckgläser am Ende ausgerichtet wurden. Zuvor wurde das saugfähige Papier noch mit H<sub>2</sub>O getränkt und mit einem ebenso großen Parafilm abgedeckt. Direkt nach Platzieren der Präparate auf dem Parafilm wurde ein Tropfen PBS auf diese pipettiert, um ein Austrocknen zu vermeiden.

Zum Färben der Zellkerne wurde die DAPI-Stammlösung<sup>1</sup> 1:500 eingesetzt. Die farbliche Kenntlichmachung des Aktinzytoskellets erfolgte mit der Phalloidin-TRITC-Stammlösung in einer Relation von 1:4.000 oder mit Phalloidin-Atto 488 (1:100). Alle drei wurden in PBS mit 0,2 % Triton X-100 verdünnt und für eine Dauer von 8 min bei RT im Dunklen inkubiert. Dazu wurden 80 µl der entsprechenden Lösung auf jeweils ein Deckglas in der feuchten Kammer pipettiert. Auch eine simultane Färbung der Zellkerne und des Zytoskellets, durch die Kombination der DAPI-Lösung mit einer der Aktinfärbungen, war möglich. Anschließend wurden die gefärbten Zellen erneut dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Abschließend erfolgte ein kurzer Waschschrift in H<sub>2</sub>O, um die Bildung von möglichen Salzkristallen in den Präparaten zu vermeiden. Bevor die Zellen mikroskopiert werden konnten, wurden die Deckgläser, mit dem Zellrasen nach unten, in einem Tropfen Mowiol auf einem Objektträger positioniert



(eingedeckelt). Die Betrachtung des Resultats mit einem Öl- oder Wasserobjektiv war erst nach ca. 12 h möglich, um ein Verrutschen des Präparats zu vermeiden.

Der beschriebenen Gegenfärbung konnte auch einer Immunfluoreszenzfärbung (s 3.2.9) angeschlossen werden.

### **3.2.9 Immunfluoreszenzfärbung von Kulturzellen**

Durch Immunfluoreszenzfärbungen werden Zellbestandteile durch spezifische Antigen-Antikörperreaktionen optisch nachgewiesen. Dabei bindet i.A. der Erstantikörper an das gesuchte Epitop. Der Zweitantikörper ist in der Regel mit einem Fluorophor gekoppelt und bindet an den Erstantikörper. Der fluoreszierende Komplex kann mikroskopisch visualisiert werden.

Für immunzytochemische Zwecke wurden die Kulturzellen genauso, wie vor einer Gegenfärbung kultiviert, fixiert und in eine feuchte Kammer überführt (s. 3.2.8). Bei jedem Inkubationsschritt wurden die Deckgläser mit 80 µl der entsprechenden Lösung überschichtet. Diese wurden immer mit sterilfiltriertem PBS angesetzt und bei RT im Dunkeln inkubiert, falls nicht anders erwähnt.

Die Handhabung der Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen sind in 2.10 beschrieben. Sie wurden immer in den entsprechenden Blocklösungen verdünnt, wenn nichts anderes angegeben ist. Als Negativkontrollen dienten Immunfluoreszenzfärbungen nach dem entsprechenden Protokoll ohne Primärantikörperinkubation (stattdessen wurde die entsprechende Blocklösung, wie im Folgenden beschrieben, verwendet).

#### **3.2.9.1 Standardprotokoll (Blockieren mit Gelatine)**

Alle Immunfluoreszenzfärbungen wurden, falls nicht anders erwähnt, mit diesem Protokoll durchgeführt.

Wenn das gesuchte Epitop nicht an der Zelloberfläche lokalisiert war, war zunächst eine Permeabilisierung mit Triton X-100 notwendig (s. 2.10). Dazu wurden die Präparate in 0,3 %igem Triton X-100 für 5 min inkubiert.

Mit einer anschließenden 30-minütigen Inkubation mit einer 0,2 %igen Gelatinelösung (= Blocklösung) wurden unspezifische Bindungen geblockt. Der Erstantikörper konnte für 60 - 120 Minuten auf den fixierten Zellen binden. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils 5 min. Die anschließende Inkubation mit dem Zweitantikörper dauerte erneut 60 - 120 Minuten. Danach wurden die

Deckgläser wieder dreimal mit PBS gewaschen, bevor sie ggf. gegengefärbt und eingedeckelt wurden (s 3.2.8).

### **3.2.9.2 Färben von Hyaluronan mit HK2-GFP**

HK2-GFP ist ein Fusionsprotein, welches aus der Hyaluronanbindedomäne von Neurocan und GFP besteht (Zhang *et al.* (2004)). Folglich kann mittels HK2-GFP Hyaluronan an Kulturzellen und Slicekulturen grünfluoreszierend detektiert werden.

Für die Färbung an Kryoschnitten wurden diese zunächst auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet, damit die entsprechende Inkubationslösung auf dem Gewebe konzentriert blieb. In diesem Fall wurde mit einem Volumen von 180 µl gearbeitet.

Zunächst wurde das Präparat für eine Stunde in 2 % NGS geblockt. HK2-GFP<sup>2</sup> wurde 1:10 verdünnt und ü.N. bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils 5 min. Die Gegenfärbung der Zellen erfolgte hier mit Propidiumiodid. Die Stammlösung wurde 1:3.000 verdünnt und für 30 min auf dem Präparat inkubiert. Anschließend wurde die Schnitte noch einmal für 5 min mit PBS und kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen, bevor sie eingedeckelt wurden (s. 3.2.8). Das Eindeckeln der Kryoschnitte erfolgte äquivalent zu dem Eindeckeln der Zellkulturpräparate. Ein Tropfen Mowiol wurde auf den Schnitt gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt.

### **3.2.9.3 Gliale Markerfärbung**

Zur Überprüfung des Differenzierungsstadiums der ES-Zellen wurden unterschiedliche Erstantikörper eingesetzt, welche spezifisch an Markerantigene verschiedener Typen von glialen (Vorläufer-) Zellen binden.

Präoligodendrozyten exprimieren das O4-Oberflächenantigen (Sommer und Schachner (1981)), GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) ist ein Intermediärfilamentprotein des Zytoskeletts, welches spezifisch für reife Astrozyten ist (Bignami *et al.* (1972)) und das Epitop des Oberflächengangliosids A2B5 wird bis zum Stadium des Prä-Oligodendrozytens exprimiert (s. 1.1.1.1).

Für die Markerfärbung wurden die Zellen in 3 cm-Kulturschalen (BD), anstatt auf Deckgläsern in 24-well-Platten kultiviert. Die Kulturschalen bestehen aus Polystyrol,

---

<sup>2</sup> Hergestellt von PD Dr. Joachim Kappler (JK1-188-18) (Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Bonn)

auf dem gliale Zellen besser adhäreren können, als auf Glas. Erreichten die Zellen eine ca. 80 %ige Konfluenz, wurden sie fixiert (s. 3.2.8) und anschließend dreimal für je zehn Minuten mit PBS gewaschen. Am Rand des Kulturgefäßes wurde der Zellrasen mit einem Wattestäbchen entfernt und die frei gewordene Fläche mit einem Fettstift nachgezogen. Auf diese Weise konnte das benötigte Volumen für die verschiedenen Inkubationsschritte auf 400 µl reduziert werden. Die Färbungen wurden anschließend, wie von Glaser *et al.* (2005) beschrieben, durchgeführt:

Die Blocklösung bestand aus 5 % NGS und im Falle einer Solubilisierung aus zusätzlichen 0,1 % Triton X-100. Geblockt wurde für 20 min. Die anschließende Erstantikörperinkubation erfolgt ü.N. bei 4 °C. Danach wurden die Zellen erneut dreimal für je 10 min mit PBS gewaschen. Der Zweitantikörper wurde 60 min bei RT auf den Zellen inkubiert, bevor diese wieder, wie oben beschrieben, gewaschen wurden. Es folgte eine zweiminütige Inkubation mit DAPI-Stammlösung<sup>2</sup> (1:1.000 in NaHCO<sub>3</sub> pH 7,4). Anschließend wurden die Kulturschalen zweimal für 30 min mit PBS gewaschen. Ein letzter kurzer Waschschrift mit H<sub>2</sub>O ging dem Eindeckeln voraus. Hier wurde ein Tropfen Vectashield mounting Medium genutzt, um das Deckglas auf den gefärbten Zellen zu fixieren.

#### **3.2.9.4 Proliferationsnachweis mit Bromdesoxyuridin (BrdU)**

Bromdesoxyuridin ist ein Thymidinanalogon und wird während der S-Phase in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Mit spezifischen BrdU-Antikörpern können auf diese Weise proliferierende Zellen detektiert werden (Alberts (2004)).

Gliale Vorläuferzellen wurden hinsichtlich ihres Proliferationsvermögens untersucht. Dazu wurden sie auf 3 cm-Schalen (BD) (s. 3.2.9.3) kultiviert. 6 h vor ihrer Fixierung wurden die Zellen mit der BrdU-Stammlösung im Medium (1:1.000 = 10 µM) kultiviert. Bis zum Zeitpunkt der Zugabe des Erstantikörpers wurden die Zellen genauso wie in 3.2.9.3 präpariert.

Auch dieser Nachweis orientierte sich an der Versuchsdurchführung von Glaser *et al.* (2005):

Zunächst wurden die Zellen in 0,5 % Triton X-100 solubilisiert, einmal für 10 min mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 N HCl 10 min lang inkubiert. Anschließend wurden die Präparate wieder zweimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 0,1 M Borat Puffer und erneut ein dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils 10 min. Dann wurde mit 5 % NGS und 0,1 % Triton X-100 10 min lang

geblockt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte ü.N. bei 4 °C in 1 %NGS und 0,1 % Triton X-100. Am folgenden Tag wurden alle Schritte ab der Zweitkörperinkubation, wie unter 3.2.9.3 beschrieben, durchgeführt.

Die BrdU-Inkooperationen wurden mittels des Makros Cell Counter von Kurt De Vos (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>) der frei verfügbaren Software ImageJ ausgewertet. Das Makro markiert und zählt mit der Computermaus angeklickte Bildpunkte. Auf diese Weise konnten die Anzahl der proliferierten Zellen (BrdU-Inkooperationen) und die Gesamtzellzahl der Zellen (DAPI) ermittelt werden. Diese wurden ins Verhältnis zu einander gesetzt, um die Proliferationsrate zu ermitteln.

### **3.2.10 Migrationsassay in der 96-well-Platte**

Die Auswirkungen der Überexpression der Kandidatengene auf die Zellmigration wurden mittels Zeitrafferaufnahmen untersucht.

Dazu wurden die entsprechenden Zellen in 96-well-Platten mit ExGen 500, wie in 3.2.7.1 beschrieben, transfiziert. Die Kavitäten am Rand der 96-well-Platte wurden ausgespart. Das Filmen der Zellmigration erfolgte einen Tag nach der Transfektion mit einem Axiovert 200 M Epifluoreszenzmikroskop. Dieses war mit einer Inkubationskammer ausgestattet, welche den Zellen eine konstante Umgebung von 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> sicherte. Auf diese Weise war das Aufnehmen von Bildern über mehrere Stunden hinweg möglich. Dabei wurden entsprechende Positionen (ein bis zwei Positionen pro Kavität) über einen motorisierten x-y-Kreuztisch im „Mark and Find“ Programm des Mikroskops (Axio Vision 4-1, Zeiss) festgelegt. Abhängig von der Gesamtanzahl der Positionen betrug ein Zeitintervall mindestens 10 min. An jeder Position wurden 20 - 25 Aufnahmen gemacht.

Die Bilder wurden im 2 x 2 Binningmodus (1 Pixel = 1,29 µm x 1,29 µm) aufgezeichnet und im TIFF-Format abgespeichert. Zur Beurteilung der Zellmigration wurden die Filme mittels zweier verschiedener Auswertungen, wie im Folgenden beschrieben, mit ImageJ 1.37 analysiert.

### 3.2.10.1 Bestimmen des relativen Migrationsindex (RDI)

Der relative Migrationsindex (RDI) wurde, wie von Dai *et al.* (2005) beschrieben, kalkuliert.

Hierzu wurden die Bildsequenzen, nach Setzen eines Schwellenwerts, in binäre Bilder umgewandelt. Grauwerte über dem Schwellenwert, welche Zellstrukturen entsprachen, bekamen somit eine eins (= schwarz) zugeordnet. Die Pixel der Zellkulturumgebung, unter der entsprechenden Grenze, wurden dadurch auf null gesetzt (= weiß). Die Anzahl der schwarzen Pixel (BPA) wurden mittels des Makros zHistogrammLister (Dai *et al.* (2005)) kalkuliert. Nach Normalisierung der BPA (zum Zeitpunkt null) und unter Berücksichtigung der Zeitintervalle ergab sich der RDI aus dem Flächenzuwachs der Binärbilder. Dieser wurde mittels MS Excel 2.000 berechnet.

### 3.2.10.2 Manuelle Pfadbestimmung

Mittels des ImageJ Makro MTrackJ von Erik Meijering (<http://www.imagescience.org/meijering/software/mtrackj/>) wurde der Pfad jeder Zelle, welche sich während der gesamten Aufnahmezeit im Sichtfeld befand und sich nicht teilte, manuell bestimmt. Dabei wurde für jeden Zeitpunkt der Aufnahme in einem Quadrat von 19 x 19 – 33 x 33 Pixeln um den Zellmittelpunkt automatisch der hellste Punkt bestimmt. Berücksichtigt wurden nur Strukturen, welche zweifelsfrei vitalen Zellen entsprachen. Auf diese Weise wurde die Pfadbestimmung von fluoreszierenden Präzipitaten, die durch den untransfizierten Zellrasen umher geschoben wurden, verhindert.

Über die auf diese Weise erhaltenen x- und y-Koordinaten der Zelltrajektorien berechnete MtrackJ die Geschwindigkeiten, Pfadlängen und die von den analysierten Zellen zurückgelegten Distanzen (Abstand zwischen Start- und Endpunkt). Der Quotient aus Distanz und Pfadlänge beschreibt die Richtungspersistenz (Persistenzindex), welche mit Hilfe von MS Excel 2.000 berechnet wurden. Der Persistenzindex liegt somit zwischen null und eins und korreliert mit der Direktionalität der zellulären Bewegung. Um zu untersuchen, ob signifikante Unterschiede zwischen den mittleren Migrationsgeschwindigkeiten bzw. den Richtungspersistenzen der GFP-exprimierenden Kontrollzellen und der

Kandidatengen-GFP-exprimierenden Zellen bestanden, wurden der t-Test und der Vierfeldertest verwendet.

### **3.2.11 Sliceinvasionsassay**

In Kooperation mit der Arbeitsgemeinschaft von Prof. Dr. O. Brüstle wurde die Invasivität von transient transfizierten Zellen (s. 3.2.7) in einem Slicekulturassay, wie in Scheffler *et al.* (2003) beschrieben, überprüft. Im Folgenden wird die Methode kurz wiedergegeben:

Es wurden 400 µm dicke hippocampale Slicekulturen von P8 - P9 Sprague Dowley Ratten angelegt. Diese wurden sieben Tage auf Membraneinsätzen (Costar Corning, 3450) bei 5 % CO<sub>2</sub> und 35 °C kultiviert. Für Zeitrafferaufnahmen wurden spezielle transparente Membranen von Millipore (PICM ORG 50) verwendet. Anschließend erfolgte die Transplantation von 150.000 transient transfizierten Zellen (15 h – 24 h nach Transfektion) am Entorhinalen Cortex (EC). Die Gewebsschnitte mit den transplantierten Zellen wurden für drei oder fünf weitere Tage unter den oben beschriebenen Bedingungen in Kultur gehalten, bis sie fixiert und gefärbt wurden.

#### **3.2.11.1 Immunfluoreszenzfärbung der transplantierten Zellen**

Die Slicekulturen wurden mit 4 % PFA über Nacht (ü.N.) bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden sie vorsichtig mit einem dünnen Haarpinsel von den Membranen heruntergenommen und in eine 48-well-Platte überführt. Gewebsschnitte unter gleichen Bedingungen konnten in einer Kavität gefärbt werden (bis zu vier *slices*). Dabei wurden mindestens 300 µl Überstand pro Kavität angewandt.

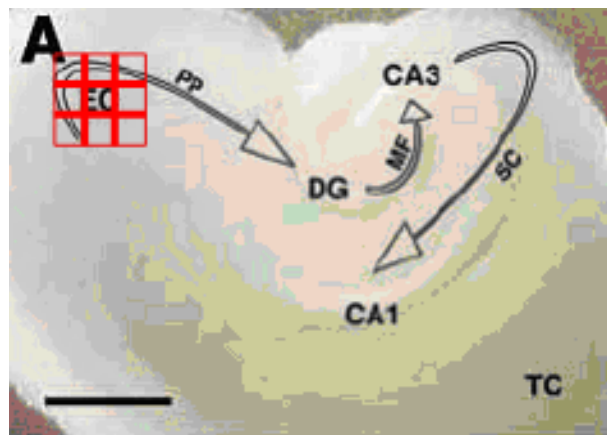
Alle Schritte der Färbung erfolgten auf einem Schüttler und bei RT, falls nicht anders erwähnt. Dazu wurden zunächst „unspezifische“ Bindungsstellen durch die Inkubation mit PBS-Natriumazid (0,02 %), 10 % NGS und 0,1 % Triton X-100 über Nacht bei 4 °C geblockt. Über den folgenden Tag wurden die *slices* mit dem Erstantikörper (anti-GFP, abcam) in einer Verdünnung von 1:1.000 in PBS-Natriumazid, 5 % NGS, 0,1 % Triton X-100 inkubiert. Anschließend wurden sie über Nacht bei 4 °C in PBS-Azide 0,1 % Triton in einem Waschschrift gewaschen. Dem folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Cy3-gekoppelt) 1:250 in PBS-Natriumazid, 5 % NGS, 0,1 % Triton X-100 wiederum für die Zeitspanne eines Tages. Die Gegenfärbung mit DAPI-Stammlösung2 (1:10.000 in NaHCO<sub>3</sub> pH 7,4)

dauerte 10 min. Ein letzter Waschschrift über Nacht bei 4 °C in PBS-Natriumazid 0,1 % Triton X-100 ging dem Eindeckeln der *slices* voraus.

Das Überführen der Slicekulturen auf den Objektträger erfolgte, indem ein Tropfen Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) auf dem Glasträger positioniert wurde, der *slice* mit einem Haarpinsel mit der Transplantationsstelle nach oben (mikroskopisch kontrolliert) vorsichtig darauf transferiert wurde und abschließend mit einem Deckglas abgedeckt wurde. Das Vectashield mounting medium brauchte ca. einen Tag zum Trocknen.

### 3.2.11.2 Auswertung der Sliceinvasion

Mit einem konfokalen Mikroskop (LSM 510 meta, C-Apochromat 40 x/1,2W korr Objektiv) wurde überprüft, wie tief die transplantierten Zellen in die Slicekulturen eingewachsen waren. Dabei wurden an der Transplantationsstelle (EC) Bildstapel entlang der z-Achse mit einem Ebenenabstand von 5 µm aufgenommen, wobei die erste Aufnahme an der Sliceoberfläche gemacht wurde. Jedes Bild eines Stapels bildete eine Fläche von ca. 0,51 mm<sup>2</sup> ab. Abbildung 10 zeigt die genaue Lokalisation der einzelnen Aufnahmen.



**Abbildung 10: Sliceinvasionstest: Aufnahmefelder im Hippocampus (Scheffler *et al.* (2003), modifiziert)**

Das in 3x3 rote Kleinquadrate unterteilte Großquadrat lokalisiert die neun Aufnahmestellen an der Transplantationsstelle, dem Entorhinalen Cortex (EC). Die dickeren Linien stellen das in 3.2.11.2.2 beschriebene Kreuz zur Grauwertkalkulation dar. Die geschwungenen Pfeile stammen aus der Abbildung der Veröffentlichung (Scheffler *et al.* (2003)) und sind für den Sliceinvasionstest irrelevant.

Zur Quantifizierung des Invasionswachstums wurden zwei verschiedene Auswertemethoden verwendet.

### 3.2.11.2.1 Messung der maximalen Invasionstiefe

Jede Ebene der aufgenommenen Bildstapel wurde hinsichtlich des Vorhandenseins grünfluoreszierender Zellen inspiziert, um jeweils die tiefste durch die transplantierten GFP-(Fusionsproteine) exprimierenden Zellen erreichte Schicht zu bestimmen.

Insgesamt wurden mindestens neun Bildstapel pro *slice* und mindestens zwei unabhängige *slices* in die Berechnung einbezogen. Ermittelt wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Werte der Eindringtiefen der am weitesten in den *slice* eingewanderten Zellen.

### 3.2.11.2.2 Grauwertberechnung

Die Tiefenverteilung des Fluoreszenzsignals der transfizierten Zellen in die *slices* wurde auf eine Experimentator-unabhängige Weise ermittelt, um ein quantitativ-objektives Kriterium der Invasionstiefe zu gewinnen. Hierzu wurde das im Vergleich mit der Eigenfluoreszenz der Gewebeschnitte relativ schwache GFP-Signal zuvor durch eine Antikörperfärbung verstärkt (s. 3.2.11.1). Anschließend wurden konfokale Bildstapel gewonnen (s. 3.2.11.2.). Die Einzelbilder wurden im JPEG-Format mit einer Grauwerttiefe von 8 bit exportiert, und mit Hilfe eines ImageJ Makros wurde der Grauwert jedes Pixels analysiert. Dieser variiert zwischen 0-255, wobei ein Wert von „0“ schwarz entspricht und der Wert „255“ einem weißen Pixel zugeordnet wird. Das Makro analysiert, wie häufig jeder einzelne Grauwert auf einem Bild vorhanden ist. Die Summe der Produkte aus der Anzahl der jeweiligen Helligkeitsstufen ergibt den Grauwert eines kompletten Bildes (s. Formel 1 „a“). Dieser ist äquivalent zu der vorhandenen Fluoreszenz und steht somit mit dem in dem Schnitt vorhandenen Anteil GFP-exprimierender Zellen in Beziehung. Dieser Wert wurde für alle Bildstapel mit MS Excel 2.000 bestimmt. Ein *slice* pro Bedingung wurde exemplarisch dieser Betrachtung unterzogen. In die Kalkulation flossen alle Ebenen von jeweils fünf kreuzförmig an der Injektionsstelle angeordneten Bildstapeln (*stacks*) (s. Abbildung 10) ein.



Zunächst wurde der Hintergrund nach folgender Formel abgezogen:

$$\frac{a}{b} - 1 = c$$

**Formel 1: Abzug des Hintergrundes für die Grauwertberechnung**

a = Grauwert einer Ebene eines *stacks*

b = minimaler Grauwert aller Grauwerte „a“ eines *slices*

c = Grauwert einer Ebene eines *stacks* nach Abzug des Hintergrundes

(Subtraktion von 1, um den minimalen Grauwert des *slices* auf 0 zu bringen ohne die Relationen zu ändern)

Anschließend wurden die Resultate nach folgender Formel normiert:

$$\frac{c}{d} = e$$

**Formel 2: Normierung der Grauwerte**

d = Summe der Grauwerte eines *stacks*

e = normierter Grauwert einer Ebene eines *stacks* (prozentualer Grauwertanteil einer Ebene in einem *stack*)

Es wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Grauwerte „e“ (s. Formel 2) für jede einzelne Invasionstiefe errechnet und graphisch dargestellt.

### 3.2.12 Messen der Zellfortsätze

Die Längen der Zellfortsätze transfizierter Zellen wurden mittels dem Makro NeuronJ mit ImageJ 1.38 gemessen (Meijering *et al.* (2004)).

Dabei dienen GFP-überexprimierende Zellen als Kontrollzellen. Die Messung wurde am Aktinzytoskelett (Phalloidin-TRITC Färbung) durchgeführt, um einen direkten Vergleich der Veränderung der Zellstrukturen zu bekommen. Dabei wurden nur Fortsätze in die Kalkulation mit einbezogen, welche eindeutig erkennbar waren und der zugehörigen Zelle zugeordnet werden konnten.

Ausgewertet wurden die Ergebnisse mit MS Excel 2.000 und Origin 6.1G.

### **3.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.3.1 Transformation von Prokaryotischen Zellen**

Zur klassischen Transformation wurden chemisch kompetente *E.coli* genutzt. Ein Aliquot dieser Prokaryoten (150 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 ng Vektor-DNA vorsichtig gemischt und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Erwärmen des Ansatzes auf 37 °C für 90 s. Nach Zugabe von 1 ml vorgewärmtem LB-Medium (37 °C) wurde die Mischung für eine Stunde erneut bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 10 – 500 µl des Transformationsansatzes abhängig von der Resistenz auf einer LB-Ampicillin-Platte oder LB-Kanamycin-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Mit einzelnen bis zum nächsten Tag gewachsenen Kolonien wurden jeweils Vorkulturen mit 5ml LB-Medium inklusive dem entsprechenden Antibiotika angeimpft und für 5 – 6 h bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 300 U/min inkubiert. Diese Vorkulturen wurden für Plasmidpräparationen genutzt.

#### **3.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Die Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Lyse gewonnen (Birnboim und Doly (1979)). Das unterschiedliche Denaturierungsverhalten der Nukleinsäuren wurde genutzt, um die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA zu trennen.

Zur Plasmidisolierung wurde ein Kit der Firma QIAGEN genutzt (s. 3.3.2.1).

##### **3.3.2.1 Plasmid-Midipräparation**

Die Plasmidpräparation wurde nach den Angaben des Herstellers, QIAGEN (Hilden), unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

50 ml LB-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum wurden mit 100 µl der Vorkultur (s. 3.3.2) angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 300 U/min kultiviert.

Die Bakterien wurden anschließend für 15 min bei 6.000 g und 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden dem Ansatz 4 ml Puffer P2 zugefügt. Die Suspension wurde direkt vorsichtig durch Invertieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit 4 ml gekühltem Puffer P3 neutralisiert und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert.

Die Zelltrümmer, Proteine und genomische DNA wurden von der Plasmid-DNA durch Zentrifugation bei 20.000 g (4 °C, 30 min) isoliert. Währenddessen wurde eine QIAGEN Tip 100 Säule mit 4 ml Puffer QBT äquibriert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, über einen Faltenfilter auf die Säule aufgetragen. Nachdem die Säule zweimal mit je 10 ml Puffer QC gewaschen worden war, wurde die DNA mit 5 ml Puffer QF von der Säule eluiert und durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 15.000 g bei 4 °C wurde der Überstand verworfen, die DNA in 2 ml Ethanol aufgenommen und für 10 min erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend in 100 µl TE Puffer gelöst. Die isolierte DNA wurde zur Überprüfung sequenziert und anschließend bei -20 °C weggefroren.

### **3.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Extinktion bei  $\lambda = 260$  nm ist proportional zur Nukleinsäurekonzentration in einer Probe. Dabei entspricht eine Optische Dichte von eins 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA.

Die photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen wurde mit dem Eppendorf Bio Photometer durchgeführt. Die Messungen erfolgten gegen TE Puffer in einer Quarzküvette (Schichtdicke: 1 cm) bei  $\lambda = 260$  nm.

### 3.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient der Amplifikation definierter DNA-Fragmente. Dabei flankieren kurze Oligonukleotide (Primer) den Amplifikationsbereich, indem sie mit dem DNA-Molekül hybridisieren. Eine hitzestabile DNA-Polymerase vervielfältigt den entsprechenden DNA-Abschnitt.

Es wurde nach der Methode von Saiki *et al.* (1988) gearbeitet. In dieser Arbeit wurden dazu folgende Temperaturzyklen angewandt:

**Tabelle 18: PCR Temperaturzyklen**

Die Zeiten und die Temperaturen dieser Schritte wurden auf die Fragmentgrößen und Primer abgestimmt und modifiziert, um optimale Bedingungen zu schaffen und optimale Ausbeuten zu erreichen.

Schritt	Fragmente (<200bp)		Fragmente (>200bp)	
1. Initiale Denaturierung: Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen	4 min 95 °C		4 min 95 °C	
2. Denaturierung	45 s 95 °C	35 mal wiederholen	45 s 95 °C	30 mal wiederholen
3. Anhybridisieren der Primer	30 s 55 °C		30 s 63 °C	
4. Extension: DNA Neusynthese durch Taq-Polymerase	30 s 72 °C		90 s 72 °C	
5.	10 min 72 °C		10 min 72 °C	
6.	Bis zum Wegfrieren 4 °C		Bis zum Wegfrieren 4 °C	

Folgende Bestandteile wurden in einen Ansatz pipettiert:

- Template-DNA: 50 ng
- Primer sense: 0,5  $\mu$ M
- Primer antisense: 0,5  $\mu$ M
- Taq-Polymerase: 0,75 U/ $\mu$ l
- 10 x Taq-Puffer: 2,5  $\mu$ l  
(10 x Taq-Ammonium oder 10 x Taq-KCl-Puffer)
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> : 1 – 4  $\mu$ l
- 10 mM dNTPs 0,5  $\mu$ l
- (DMSO: 1,25  $\mu$ l)
- H<sub>2</sub>O: *ad* 25  $\mu$ l

### 3.3.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode mit Didesoxyribonukleotiden (Sanger *et al.* (1977)) unter Verwendung des Big Dye Cycle Sequencing Kit und des Genetic Analyzers ABI PRISM®.

Mittels des Kits wurden vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide in einer asymmetrischen Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. Der Einbau eines Didesoxynukleotids in einen DNA-Strang führte zum Kettenabbruch. Auf diese Weise entstanden DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge mit einem fluoreszierenden Nukleotid am Ende. Die anschließende automatische Auftrennung mittels Kapillar-Gelelektrophorese und die Auswertung der Fluoreszenzsignale bot Aufschluss über die Basenabfolge.

Für die zyklische Sequenzierung wurde folgender Ansatz genutzt:

- 0,5  $\mu$ g DNA
- 1  $\mu$ l Big Dye Sequencing Puffer (5 x)
- 5 pmol Primer
- HPLC-H<sub>2</sub>O *ad* 9  $\mu$ l

Unmittelbar vor der unidirektionalen PCR wurde dem Ansatz noch 1 µl Terminator Ready Reaction Mix zugefügt:

1. 2 min 96 °C initiale Denaturierung
2. 10 s 96 °C Denaturierung
3. 5 s 50 °C Primeranlagerung
4. 4 min 60 °C Extension
5. bis zur Fällung 4 °C

(die Schritte 2 - 4 wurden 25 mal wiederholt)

Anschließend wurde die DNA durch Zugabe folgender Lösungen gefällt:

- 10 µl H<sub>2</sub>O
- 2 µl 3 M NaAc (pH 4,6) und
- 50 µl 95 %iges Ethanol

Nach dem Mischen des Ansatzes wurde dieser für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min bei 13.000 U/min (Eppendorf 5415 D) zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, um das Pellet an der Luft trocknen zu lassen. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde es in 25 µl HiDi Formamid aufgenommen, gemischt und kurz abzentrifugiert. Abschließend wurde die Lösung für 2 min bei 80 °C erhitzt, erneut gemischt und abzentrifugiert. Bis zur Elektrophorese wurde der Ansatz auf Eis gelagert.

### **3.3.6 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen**

Aufgrund ihrer Phosphatreste ist die Desoxyribonukleinsäure (DNA) negativ geladen. Diese Eigenschaft ermöglicht eine größenabhängige Trennung von DNA-Fragmenten mittels der Gelelektrophorese im elektrischen Feld. Darüber hinaus hängt die Separation von der angelegten Stromstärke und der Agarosekonzentration im Gel ab. Dabei lassen sich beispielsweise DNA-Fragmente einer Größe von 1 – 15 kb in 0,5 %igen Agarosegelen und Fragmente einer Größe von 0,1 - 2 kb besser in 1 - 2 %igem Agarosegelen auftrennen. Durch den Einsatz von Ethidiumbromid, das in die DNA-Doppelhelix interkaliert, kann bis zu 1 ng DNA unter UV-Licht nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurden 1 – 2 %ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde dazu in filtriertem 1 x TAE-Puffer gelöst, indem die Suspension in der Mikrowelle aufgekocht wurde. Die Lösung wurde anschließend abgekühlt, bei höchstens 60 °C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,7 µg/ml) versetzt, in eine entsprechende Kammer gefüllt und dort mit einem Kamm versehen. Nachdem sich das Gel gebildet hatte, wurde es in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt und der Kamm wurde wieder entfernt.

Die DNA-Proben wurden mit L(IV)-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen (in die freien Kammtaschen pipettiert). Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 100 V (kleine Kammer) bzw. 150 V (große Kammer) durchgeführt. Neben den Proben lief jeweils immer auch ein Molekulargewichtsstandard mit, um die separierten Fragmentgrößen der DNA-Gemische am Ende bestimmen zu können.

### **3.4 Proteinanalyse**

#### **3.4.1 Proteinbestimmung**

Die Proteinkonzentrationen wurde mit dem BioRad DC Assay System (Lowry *et al.* (1951)) bestimmt.

Die Kalibriergerade wurde mittels BSA-Lösungen folgender Konzentrationen erstellt: 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,03125 mg/ml und 0 mg/ml. Die Proteinkonzentrationen dieser Standards, sowie der Proben wurden zur Mittlung doppelt gemessen. Dazu wurden je 5 µl der entsprechenden Probe in die Kavitäten einer 96-well-Platte pipettiert. Jeweils 25 µl Lösung A (= 1 ml Lösung A + 20 µl Lösung S) und 200 µl Lösung B wurden jeder Vertiefung hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde die Extinktion in einem Microplate Reader bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 750$  nm gemessen.

Die Proteinkonzentrationen der Proben errechneten sich aus der Kalibriergeraden.

#### **3.4.2 Präparation der Zellen zur Proteinisolierung**

Die Zellen wurden in 10 cm-Schalen (BD. Falcon, Heidelberg, Germany) kultiviert. Im Stadium von ungefähr 90 % Konfluenz wurden diese gewaschen, abgeschabt und das Zellpellet nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1.200 rpm (Labofuge 400e) gewonnen.

Aus den Pellets wurden neben dem Gesamtzelllysat (C) auch die subzellulären Fraktionen Kerne (N), Membranen (M), Mikrosomen (micro) und löslichen Proteine (L) durch differentielle Zentrifugation isoliert und deren Proteine extrahiert.

#### **3.4.2.1 Gewinnung des Gesamtzelllysats**

Zur Anreicherung des Gesamtzelllysats wurde das Pellet zunächst in 100 µl HEPES-Puffer (10 mM HEPES pH 7,4 (HP); ohne DTT → nicht reduzierend) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch eine viermalige, 10 s lange Beschallung im Ultraschallbad. Zwischenzeitliche Inkubationen von je 30 s auf Eis verhinderten eine zu starke Hitzeentwicklung. Auch nach dem Zellaufschluss wurden die Zellen für weitere 20 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proteine des Gesamtzelllysats (C) durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 18.000 g von den Zellresten separiert. Sie befanden sich im Überstand.

#### **3.4.2.2 Gewinnung der Proteine aus den Zellkulturüberständen**

Zur Gewinnung der Proteine aus dem Zellkulturüberstand (Ü), wurden 8 ml Medium aus den 10 cm-Schalen gewonnen, nachdem die Zellen mindestens 24 h in diesem kultiviert wurden waren.

300 µl des Überstandes wurden mit 1 ml Aceton versetzt und mindestens 1 h bei -70 °C gefällt. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C. Danach wurde das entstandene Pellet mit 70 % Ethanol resuspendiert und erneut für 30 min bei 20.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend getrocknet und in 100 µl HEPES-Puffer (10 mM HEPES pH 7,4 (HP); ohne DTT → nicht reduzierend) aufgenommen.

#### **3.4.2.3 Subzelluläre Fraktionierung**

Alle Schritte der subzellulären Fraktionierung erfolgten auf Eis oder bei 4 °C. Zunächst wurde das Zellpellet in 100 µl isotonem HEPES-Puffer (iHP) resuspendiert. Mit einer Kanüle (0,5 x 25 mm) wurden die Zellen solange homogenisiert bis ein Verhältnis von 20:80 zwischen noch intakten Zellen und freigesetzten Nukleii lichtmikroskopisch bestätigt werden konnte. Im Folgenden wurden die Zellkerne (N)



durch Zentrifugation für 10 min bei 1.000 g, anschließender Abnahme des Überstands, erneutem Suspendieren in isotonem HEPES-Puffer und wiederholter Zentrifugation für 10 min bei 1.000 g als Pellet isoliert. Dieses wurde daraufhin wieder in 100 µl isotonem HEPES-Puffer aufgenommen. Die Überstände der beiden Zentrifugationen wurden vereinigt und bei 20.000 g für 30 min zentrifugiert, um das Membranpellet zu erhalten. Die gewonnene flüssige Phase wurde abgenommen und bei 120.000 g für eine Stunde zentrifugiert. Die löslichen Proteine (L) befanden sich im Überstand. Das Pellet wurde in 100 µl isotonem HEPES-Puffer gelöst (micro). Das Membranpellet wurde währenddessen in 100 µl hypotonem HEPES-Puffer (hHP) suspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert, um die in den Vesikeln gefangenen löslichen Proteine durch hypotone Lyse freizusetzen. Anschließend wurde für 30 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen (H, hypotoner Wasch). Das Membranpellet (M) wurde in 100 µl isotonem HEPES-Puffer suspendiert.

Die Volumina der einzelnen Fraktionen, des Gesamtlysats oder der Überstände, welche 100 µg Protein entsprachen, wurden mit vierfach Lämmli-Puffer versetzt und sofort bei 95 °C für 3 min inkubiert, kurz zentrifugiert und anschließend auf das SDS-Gel aufgetragen.

### **3.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mittels der SDS-PAGE werden Proteingemische im elektrischen Feld getrennt. SDS ist ein Detergenz, welches die nativen Strukturen der Proteine auffaltet und an Aminosäurereste bindet. Auf diese Weise entstehen negativ geladene Teilchen, welche hauptsächlich nach der Größe des Proteins durch einen Siebeffekt in den Poren eines Polyacrylamidgels getrennt werden.

Für das Giessen der Gele wurden 10 % Acrylamid, als Vernetzungsreagenz, und APS sowie TEMED, als Polymersierungsstarter, eingesetzt. Es wurden diskontinuierliche Gele mit einem niederprozentigem Sammelgel (pH 6,8) und einem höherprozentigem Trenngel (pH 8,8) angefertigt (s. Abbildung 20). Dabei wurden die Gele mittels ca. 5 ml Sammelgel und ca. 1 ml Trenngel mit einer Dicke von 0,75 mm gegossen. Die Anzahl der Taschen variierte, abhängig von der Probenmenge, zwischen 10 und 14.

**Tabelle 19: Zusammensetzung Polyacrylamidgele**

Felder mit „-----“ markiert, fanden in dem Fall keine Anwendung

Bestandteil	Trenngel (5 ml)	Sammelgel (5 ml)
H <sub>2</sub> O	2,400 ml	3,020 ml
40 % Acrylamid	1,250 ml	0,625 ml
1,5 M Tris HCl (pH 8,8)	12,500 ml	-----
0,5 M Tris HCl (pH 6,8)	-----	1,250 ml
10 % SDS	0,050 ml	0,050 ml
10 % APS	0,050 ml	0,050 ml
TEMED	0,010 ml	0,005 ml

Die proteinhaltigen Proben wurden in einer Relation von 1:4 mit dem 4 x Lämmliprobenpuffer versetzt, 3 min bei 96 °C inkubiert, kurz abzentrifugiert und anschließend in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Als Größenstandard wurde der Prestained Protein Ladder (SM0671) der Firma Fermentas verwendet.

Bis die Lauffront die Trenngelgrenze erreicht hatte, wurde eine Spannung von ca. 60 V angelegt. Anschließend erfolgte eine Erhöhung der Spannung auf ca. 100 V – 120 V. Nachdem die Proben den unteren Rand des Gels erreicht hatten, wurde das Spannungsfeld abgeschaltet und das Gel zum Blotten (s. 3.4.4) aus der Laufkammer entnommen.

### 3.4.4 Western Blot im Semi Dry Verfahren

Beim Western Blot Verfahren werden Proteine in einem elektrischen Feld aus einem Gel auf eine Trägermembran transferiert („*blotting*“). Durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen können diese anschließend charakterisiert werden.

Pro Gel wurden äquivalent zu dessen Größe sechs Filterpapiere (Whatman) zugeschnitten. Diese Blotbestandteile wurden mit Blotpuffer befeuchtet, um den Stromfluss zu gewährleisten. Eine entsprechend große Nitrocellulosemembran wurde durch die Benetzung mit H<sub>2</sub>O aktiviert.

Zum Blotten wurden drei Filterpapiere (Whatman) auf der Anode positioniert. Darüber wurden in entsprechender Reihenfolge die Membran, das Gel und die übrigen drei Filterpapiere (Whatman) gelegt. Dabei war es wichtig Luftblasenbildung zwischen den einzelnen Komponenten zu vermeiden, um ein homogenes elektrisches Feld zu gewährleisten. Nach dem Anschließen der Kathode wurde bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> des Gels für 60 - 90 min geblottet.

Der Erfolg des Proteintransfers wurde mittels einer ca. zweiminütigen Inkubation mit Ponceau-S-Lösung überprüft. Der Azofarbstoff bindet reversibel an Proteine und macht diese dadurch auf der Membran sichtbar. Für die folgende Immundetektion wurde die Lösung mit H<sub>2</sub>O wieder abgewaschen.

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden mittels einer Inkubation mit einer Blockierlösung, bestehend aus 3 % Milchpulver und 2 % BSA in TBS/T, über Nacht bei 4 °C blockiert. Die folgenden Inkubationsschritte wurden bei RT durchgeführt. Der Erstantikörper (s. Tabelle 14) konnte für 60 – 90 min an die entsprechenden Proteine binden, bis die Membran anschließend dreimal mit TBS/T für jeweils ca. 10 min gewaschen wurde. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper (s. Tabelle 15) dauerte ebenfalls 60 – 90 min. Die letzten Waschschrte mit TBS/T wurden erneut dreimalig für jeweils ca. 10 min durchgeführt.

### **3.4.5 Antigennachweis mittels alkalischer Phosphatasereaktion**

Die betreffenden Proteine wurden nach einem Immunoblot (s. 3.4.4) mittels alkalischer Phosphatasereaktionen auf der Membran sichtbar gemacht.

Die Zweitantikörper waren an Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelt. Dieses Enzym hydrolysiert BCIP, welches nach einer folgenden Redox-Reaktion ein blau-violettes Präzipitat auf der Membran ausbildet. Der Nachweis wurde durch das Oxidationsmittel NBT unterstützt, welches nach der Reduktion ebenfalls ein bläuliches Präzipitat bildete. Auf diese Weise konnte die Bindungsstelle des Zweitantikörpers visualisiert werden.

BCIP und NBT befanden sich in der AP-Färbelösung, welcher die Membran solange ausgesetzt wurde, bis ein Farbumschlag auf ihr erkennbar war. Um die Reaktion zu stoppen, wurde die Membran mit 20 mM EDTA in PBS gewaschen. EDTA ist ein Chelatbildner und bindet Mg<sup>2+</sup>-Ionen, welche für die Aktivität der alkalischen Phosphatase benötigt werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellmigrationsexperimente

#### 4.1.1 Etablierung eines Migrationstests in 96-well-Kulturschalen mit B35-Neuroblastomzellen

Zum *screening* von zellmigrationsbeeinflussenden Faktoren sollte in dieser Arbeit ein Migrationstest mit hohem Durchsatz seine Anwendung finden. Dabei standen die Auswirkungen von Überexpressionen verschiedener Kandidatengene sowie die Zugabe diverser Supplemente auf die Zellen im Mittelpunkt der Untersuchungen.

Bereits Dai *et al.* (2005) haben einen Migrationsassay mit Zeitrafferaufnahmen in einer 24-well-Kulturplatte entwickelt. Anlehnend daran sollte der Versuchsaufbau zunächst durch eine Hochskalierung zu einer 96-well-Kulturschale modifiziert werden, um mehr Einzelexperimente pro Versuch durchführen zu können.

Verwendet wurde ein Axiovert 200 Mikroskop mit motorisiertem Kreuztisch, sowie einer beheiz- und begasbaren Inkubationskammer. In Vorversuchen mit farblich markierten 96-well-Kulturschalen (zur Positionsverifizierung wurden die Kavitäten mit einem Stift mit schwarzen Punkten versehen) stellte sich zunächst heraus, dass die nachfolgend genau erklärte Behandlung der Apparaturen sowie die weiter unten erklärten Einstellungen der Software Voraussetzungen für eine konstante und scharfe Bildfolge waren. Die 96-well-Kulturschale musste in einen Halter mit Presspassung platziert werden. Auf diese Weise konnte sie passgenau und stabil auf dem Kreuztisch positioniert werden. Darüber hinaus war ein Vorheizen der Inkubationskammer für mindestens 6 h bei 37 °C notwendig, damit sich die Materialien zum Startzeitpunkt des Experiments in einem maximal ausgedehnten Zustand befanden und sich so während der Aufnahmen nicht mehr verformten. War zusätzlich das Fahren des Mikroskoptisches auf eine 20 %ige Beschleunigung mit einer Maximalgeschwindigkeit von 40 % eingestellt. So war ein wiederholtes genaues Ansteuern von zuvor festgelegten Positionen gesichert, ohne dass es zu einem Verschieben in x-y-Richtung innerhalb der Bildfolgen kam. Über die Software musste zusätzlich ein Fahren mit z-Trieb des Tisches festgelegt werden, um die Fokussierung der bestimmten Positionen zu gewährleisten.

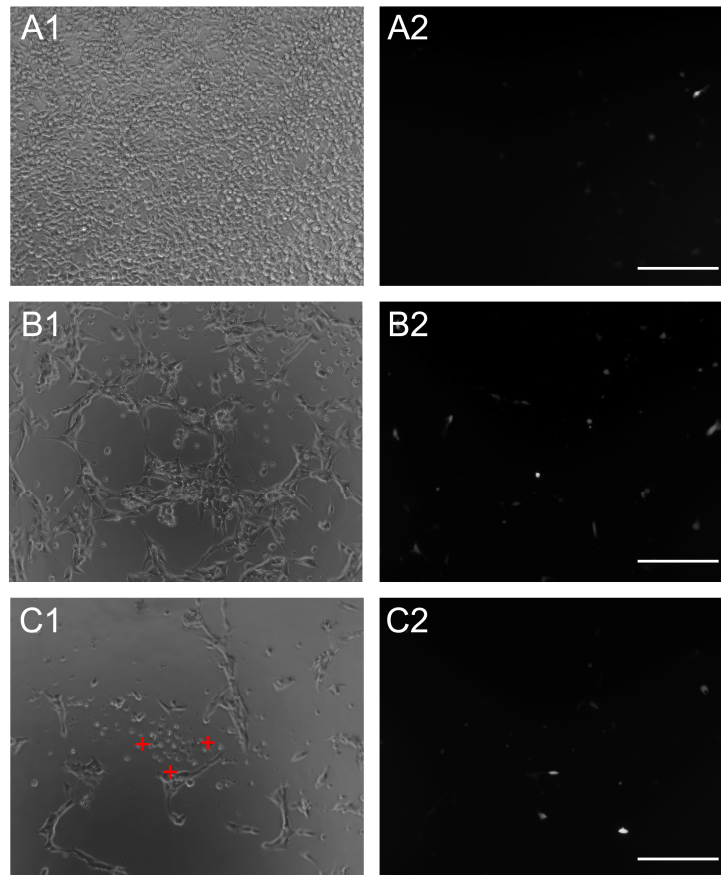
Zur vergleichbaren Auswertung der Filme wurden die Belichtungszeiten konstant gehalten. Wegen leicht abweichender Beleuchtungsverhältnisse wurden die am Rand gelegenen Kavitäten nicht in die Untersuchungen mit einbezogen. Bei den 60

mittleren Vertiefungen der Platte wurden jeweils maximal zwei Positionen zum Filmen festgelegt, so dass bis zu 120 Filme aus einem Experiment hervorgingen.

Zum weiteren Etablieren des Testes wurden B35-Neuroblastomzellen genutzt. Sie stammen aus chemisch induzierten Gehirntumoren der Ratte und dienen als Modellzelllinie, da sie sich durch eine spontane Motilität auszeichnen (Schubert *et al.* (1974)). Darüber hinaus ist die Kultivierung dieser Art von neuronalen Vorläuferzellen unproblematisch. Sie weisen hohe Teilungsraten auf und stellen geringe Ansprüche an die Kultivierungsbedingungen.

Die Quantifizierung der Zellmigration sollte mit der von Dai *et al.* (2005) entwickelten Methode durchgeführt werden, welche den Flächenzuwachs übereinander projizierter Bildstapel von migrierenden Zellen misst. Dazu mussten Einzelzellen durch Fluoreszenz von den übrigen Zellen visuell separierbar gemacht werden. Dafür sollten sie zunächst transient mit pEGFP transfiziert werden. Deshalb wurden die Transfektionsbedingungen in der 96-well-Platte ausgehend von den verwendeten Volumina der Transfektion in der 24-well-Platte, wie von Dai (2005) beschrieben, umgerechnet. Während die Zellen in der 24-well-Platte in einem Volumen von 250 µl/Kavität kultiviert wurden, wurde bei den 96-well-Platten ein Mediumvolumen von 50 µl/Kavität genutzt. Somit wurden DNA-Menge und ExGen 500 Volumen initial ebenfalls auf 1/5 reduziert (s. Tabelle 16). Anschließend wurde die auszusäende Zellzahl/well, die eine für den Test geeignete Transfektionseffizienz (transfizierte Zellen/Gesamtzellzahl) ergab, nach optischer Einschätzung festgelegt. Dazu wurden am ersten Tag Zellen in unterschiedlichen Zelldichten in einer 96-well-Kulturschale ausgesät und am folgenden Tag wurden sie mittels ExGen 500 mit pEGFP transient transfiziert. Am dritten Tag wurde die Transfektionseffizienz mikroskopisch beurteilt (s. Abbildung 11). Während eine Zellzahl von 100.000 Zellen/well zuviel für eine brauchbare Transfektionseffizienz war (s. Abbildung 11A), zeigten die Zellen bei einer Zelldichte von 10.000 Zellen/well eine abnorme Morphologie. Bei dieser geringen Zelldichte rundeten sie sich teilweise ab (s. + in Abbildung 11C1), was eine Migration unmöglich gemacht hätte. Dahingegen erschienen die B35-Zellen bei einer Zelldichte von 20.000 Zellen/well durchgehend vitaler. Auch die Transfektionseffizienz konnte in diesem Fall auf ca. 10 % gesteigert werden

(s. Abbildung 11B). Dies war für den Versuch gut geeignet und wurde folglich für die B35-Zellen als Standardtransfektionsbedingung festgelegt.



**Abbildung 11: B35-Zelldichte für eine optimale Transfektionseffizienz**

Dargestellt sind Aufnahmen von transient transfizierten B35-Zellen. Transfiziert wurde mit ExGen 500 und pEGFP einen Tag nachdem die Zellen in unterschiedlichen Dichten in einer 96-well-Kulturschale ausgesät worden waren (s. Tabelle 16). Am folgenden Tag wurde die für den Migrationsassay optimale Transfektionsbedingung visuell ermittelt. Die Maßstabsbalken entsprechen 200  $\mu\text{m}$ .

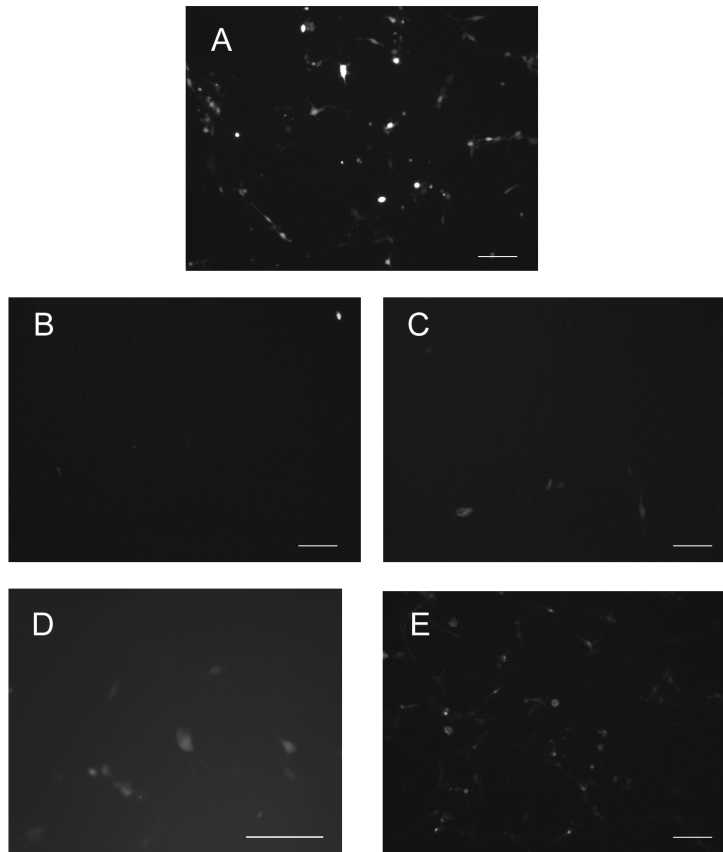
In (A) wurden 100.000 Zellen/well, in (B) 20.000 Zellen/well und in (C) 10.000 Zellen/well ausgesät. In Spalte (1) sind jeweils die Phasenkontrastaufnahmen und in Spalte (2) die dazugehörigen Fluoreszenzaufnahmen dargestellt. In (A) sind weniger als 1 % aller Zellen transfiziert. Diese Effizienz war nicht ausreichend für einen effektiven Migrationsassay. Die „+“-Zeichen in (C1) indizieren abgerundete Zellen, was gegen die Verwendung einer Zelldichte von 10.000 Zellen/Kavität sprach. Die 20.000 Zellen/well in (B) erwiesen sich für den Migrationsassay als effektiv. Die Transfektionseffizienz betrug ca. 10 %.

Zur Examinierung der Zellmigrationsveränderung durch die Überexpression von Kandidatengenen mussten die mit der gewünschten cDNA transfizierten Zellen von den restlichen Zellen unterschieden werden. Aus diesem Grunde wurden die Kandidatengene in verschiedenen Plasmiden zu Beginn unter den optimierten Bedingungen mit pEGFP kotransfiziert (s. Abbildung 12B, C). Dabei war anzunehmen, dass bei einer solchen simultanen Transfektion im Verhältnis 9:1 (Expressionsplasmid : pEGFP) ca. 80% der grünfluoreszierenden Zellen auch die

zweite cDNA exprimierten (Dai (2005)). Die Transfektion mit nur 10% pEGFP erwies sich allerdings als ungenügend für die Experimente, da unter diesen Bedingungen zu wenig grünfluoreszierende Zellen resultierten (s. Abbildung 12B, C).

Alternativ wurden Transfektionen mit pIRES2-EGFP und GFP-Fusionskonstrukten ausgetestet. Die Transfektion mit pIRES führt zu einer bicistronischen Expression, weil zwei ORFs von einem Transkript translatiert werden. Dabei ist davon auszugehen, dass Zellen, welche das Gen aus dem zweiten ORF (ORF B) translatieren, auch das Gen des ersten ORF (ORF A) exprimieren (Rees *et al.* (1996)). Bei dem hier verwendeten pIRES befand sich in ORF B das Gen für EGFP (pIRES2-EGFP). Die Transfektionseffizienz war besser als bei der Kotransfektion, aber nicht vergleichbar mit der 100 %igen pEGFP-Transfektion (vergl. Abbildung 12A und D).

Die Expression der GFP-Fusionsproteine führte als einzige Transfektion zu einer ähnlich guten Transfektionseffizienz, wie nach einer Transfektion mit 100% pEGFP (vergl. Abbildung 12A und E). Dabei wurden die Kandidatenproteine am N-Terminus von EGFP fusioniert. Alle Kandidatengenkonstrukte enthielten die GFP-cDNA am 3'-Ende, so dass von der Bildung von C-terminal mit der GFP-Domäne fusionierter Proteine auszugehen war. Diese Plasmide (Kandidatengen-pEGFP) wurden in allen folgenden Migrationsexperimenten zu Transfektionszwecken herangezogen.

**Abbildung 12: Transfektion der B35-Zellen mit Kandidatengenenkonstrukten und pEGFP**

B35-Zellen wurden unter gleichen Bedingungen in einer 96-well-Platte kultiviert und transfiziert. Ausgesät wurden 20.000 Zellen pro Kavität. Am folgenden Tag wurde mit ExGen 500 unter optimierten Bedingungen mit unterschiedlichen Plasmiden transfiziert (s. Tabelle 16). Die mikroskopische Beurteilung erfolgte hier zwei Tage nach Aussaat. Maßstabsbalken betragen 100  $\mu\text{m}$ . Transfiziert wurde mit (A) 100 % pEGFP, (B) Kotransfektion von CD44-pcMVSPORT + 10 % pEGFP, (C) Kotransfektion von CD44-pCDNA3 + 10 % pEGFP, (D) pIRES2-EGFP; (E) EGFR-pEGFP-N3. Es stellte sich heraus, dass die Transfektion mit dem Fusionsplasmid in (E) am besten für den Migrationsassay geeignet war und somit als Standard festgelegt wurde.

Die Etablierung des Zellmigrationsassays kann folgendermaßen zusammengefasst werden: Die B35-Zellen wurden am ersten Tag in einer Zelldichte von 20.000 Zellen und 50  $\mu\text{l}$  DMEM/F12 mit 10 % FCS pro Kavität ausgesät. Am folgenden Tag wurde die Transfektion mittels ExGen 500 mit den GFP-Fusionskonstrukten unter der Verwendung von 0,1  $\mu\text{g}$  DNA und 0,33  $\mu\text{l}$  ExGen 500 in einem ExGen 500 Transfektionsansatz von 5  $\mu\text{l}$  pro Kavität durchgeführt. Die Zeitrafferaufnahmen erfolgten anschließend am dritten Tag.

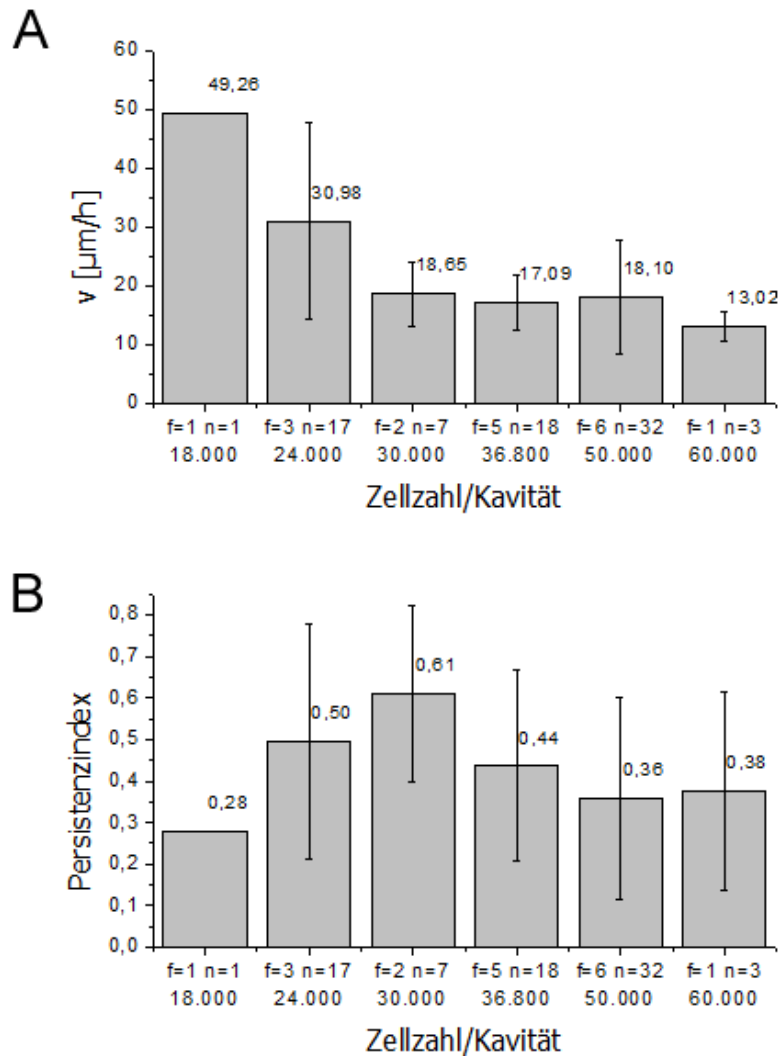


## 4.1.2 Zellmigrationsexperimente mit glialen Vorläuferzellen (N3EFL-Zellen)

### 4.1.2.1 Optimierung des Migrationstests für N3EFL-Zellen

Nach erfolgter Validierung des Migrationsassays mit den B35-Zellen (s. 4.1.1) sollten die etablierten Parameter auf den Migrationstest mit den N3EFL-Zellen übertragen werden. Zunächst wurde die optimale Zelldichte der glialen Vorläuferzellen für den assay in der 96-well-Kulturschale eruiert. Deshalb wurde ein Migrationstest mit verschiedenen Zelldichten der N3EFL-Zellen unter B35-Transfektionsbedingungen (0,1 µg DNA und 0,33 µl ExGen 500 in einem ExGen 500 Transfektionsansatz von 5 µl pro Kavität) in einer 96-well-Kulturschale durchgeführt. Hierfür wurde pEGFP transient überexprimiert. Die Kultivierung der glialen Vorläuferzellen, inklusive Vorbeschichtung, Art des Mediums und Faktorenzugabe, wurde nicht verändert (s. 3.2.6.2).

Die mittlere Migrationsgeschwindigkeit nahm mit ansteigender Zelldichte ab, während die Richtungspersistenz ihr Maximum bei der mittleren getesteten Zellanzahl/Kavität (30.000 Zellen/well) aufwies (s. Abbildung 13). Da mittels des assays eine Steigerung der Migrationsfähigkeit glialer Vorläuferzellen durch diverse Faktoren nachweisbar gemacht werden sollte, wurde die Bedingung der langsamsten Migration (60.000 Zellen/Kavität), welche ebenfalls eine geringe Richtungspersistenz aufwies, als Standardbedingung festgelegt. So konnte davon ausgegangen werden, dass bei dieser Zelldichte der Nachweis einer Migrationssteigerung möglich sein sollte. Darüber hinaus liegen Zellen im Gewebe ebenfalls in einem dichten Zellverband vor, so dass diese Bedingung im Vergleich zu den niedrigeren Zellkonzentrationen den *in vivo* Verhältnissen am nächsten kam.



### Abbildung 13: Migration bei unterschiedlichen N3EFL-Zelldichten in einer 96-well-Platte

Dargestellt sind die mittleren Migrationsgeschwindigkeiten (A) und die Persistenzindices (B) von N3EFL-Zellen bei unterschiedlichen Zelldichten in einer 96-well-Kulturschale. Die Zellen wurden in PO (15  $\mu\text{g/ml}$ ) / Ln (2  $\mu\text{g/ml}$ ) vorbeschichteten Kavitäten in jeweils 50  $\mu\text{l}$  N2-Medium ausgesät und zwei Tage lang unter Standardbedingungen kultiviert. Am dritten Tag erfolgte eine transiente Transfektion mit pEGFP (0,1  $\mu\text{g}$  DNA und 0,33  $\mu\text{l}$  ExGen 500 in einem Transfektionsansatz von 5  $\mu\text{l}$  pro Kavität). Am vierten Tag wurden Zeitrafferaufnahmen der Zellen gemacht.

Die mittlere Migrationsgeschwindigkeit inklusive der Standardabweichung der Werte (A) sowie die Persistenzindices mit den jeweiligen Standardabweichungen der Werte (B) wurden zu einem späteren Zeitpunkt über die Pfadbestimmung kalkuliert. Die Daten gehen aus einem Experiment hervor. „f“ beschreibt die Anzahl der Filme und „n“ die Anzahl der Zellen, welche in die Berechnungen mit einbezogen wurden.

In Folgeexperimenten stellte sich heraus, dass darüber hinaus weitere Modifizierungen der Kultivierungs- und der Transfektionsbedingungen eine noch größere Effizienz für den Test versprochen. Diese beinhalteten ein homogenes

Wachstum, möglichst geringen Zeitaufwand bis zu den endgültigen Zeitrafferaufnahmen und eine möglichst hohe Transfektionseffizienz.

Dazu wurden die Zellen in einer Zelldichte von 60.000 Zellen/Kavität in PO (15 µg/ml) / Ln (4 µg/ml) vorbeschichteten 96-well-Kulturschalen in 100 µl N2-Medium pro Kavität unter Zugabe von EGF (20 ng/ml), bFGF (10 ng/ml) und Forskolin (10 µM) ausgesät. Das Arbeiten mit einer Mehrkanalpipette sicherte ein schnelles Ausplattieren der Zellen und vermied so ein Antrocknen der vorbeschichteten Kavitäten, welches ansonsten ein inhomogenes Wachstum der Zellen zur Folge gehabt hätte. Am zweiten Tag erfolgte eine Faktorenzugabe. Dabei wurden EGF, bFGF und Forskolin in den oben angegebenen Konzentrationen in 50 µl N2-Medium pro Kavität erneut mit einer Mehrkanalpipette in die einzelnen Vertiefungen pipettiert. Am dritten Tag erfolgte die Transfektion mit ExGen 500, so dass bereits am vierten Tag nach der Aussaat der Zellen Zeitrafferaufnahmen von den Zellen möglich waren.

In einem Test zur Transfektionsoptimierung mit verschiedenen Kombinationen aus unterschiedlichen DNA-Konzentrationen von pEGFP und Äquivalenten von ExGen 500 wurden die resultierenden Filmqualitäten beurteilt. Dabei wurden die Vitalität der Zellen und die Transfektionseffizienz von unabhängigen Betrachtern bewertet. Eine Transfektion mit 0,15 µg DNA und 7 Äquivalent ExGen 500 (= 0,6 µl ExGen 500) pro Kavität stellte sich als beste Transfektionsbedingung heraus. Auch nach Überexpression der Fusionsproteine wurde auf diese Weise eine Transfektionseffizienz von ca. 10 % erreicht.

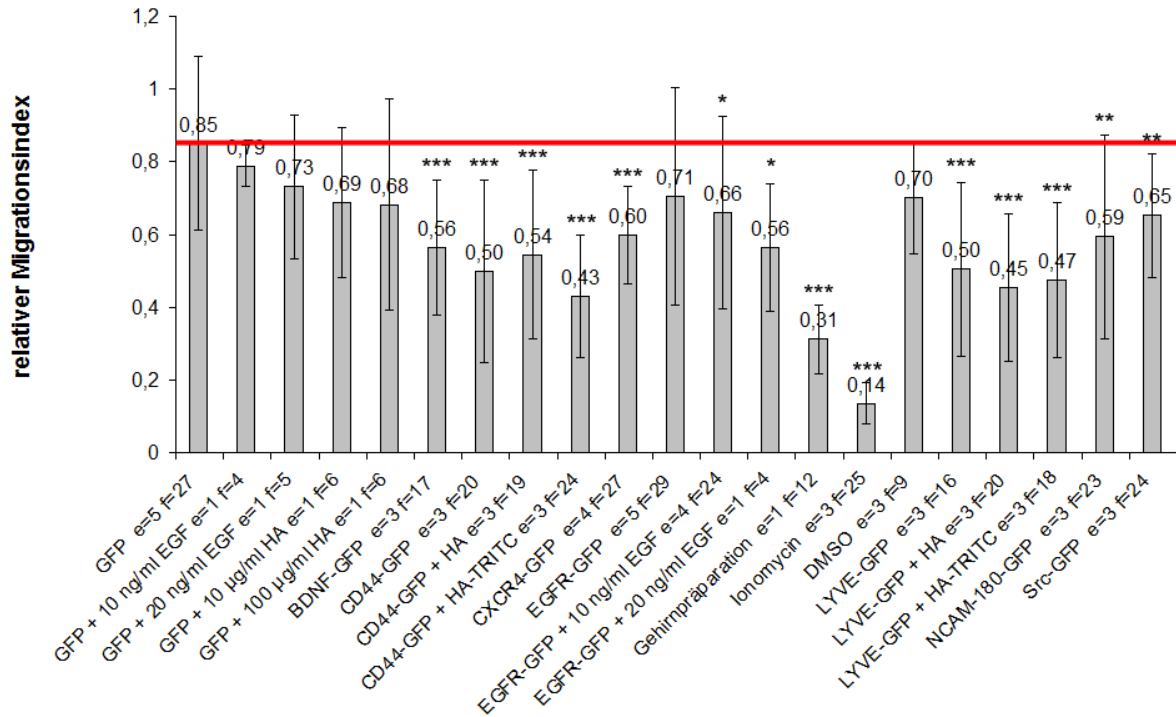
Das Fazit der Optimierung des Migrationsassays für die glialen Vorläuferzellen war, dass die N3EFL-Zellen am ersten Tag in einer Zelldichte von 60.000 Zellen in 100 µl N2-Medium pro Kavität ausgesät wurden. Am zweiten Tag erfolgte eine Faktorenzugabe in 50 µl N2-Medium in jedes *well*. Die Transfektion am dritten Tag wurde mit 0,15 µg GFP-Fusionskonstrukt und 0,6 µl ExGen 500 in einem Transfektionsansatz von 5 µl durchgeführt. Am vierten Tag wurden anschließend die Zeitrafferaufnahmen gemacht.

#### **4.1.2.2 Screening nach N3EFL-zellmigrationsbeeinflussenden Faktoren**

Das *screening* von N3EFL-zellmigrationsbeeinflussenden Faktoren wurde unter den optimierten Bedingungen (s. 4.1.2.1) und nach Überexpression von GFP-Fusionsproteinen durchgeführt.

Dabei wurde GFP als Kontrolle überexprimiert, um die Zellmigration grünfluoreszierender und ansonsten unmodifizierter N3EFL-Zellen untersuchen zu können. Die Transfektion mit EGFR-pEGFP-N3 diente als Positivkontrolle, da bereits von Aguirre *et al.* (2005) durch die Überexpression von EGFR eine migrationssteigernde Wirkung auf neurale Vorläufer *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen wurde. Zusätzliches EGF sollte eine erhöhte Aktivierung des Rezeptors bewirken.

Eine Gehirnpräparation von Mäusen wurde als Supplement benutzt, um *in vivo*-ähnliche Bedingungen zu testen. Die DMSO-Zugaben erfolgten als Negativkontrollen, da diverse Supplemente in DMSO gelöst wurden (s. Tabelle 9). Alle weiteren Überexpressionen und Supplementzugaben werden in 1.3 begründet.



**Abbildung 14: Analyse des relativen Migrationsindexes von N3EFL-Zellen**

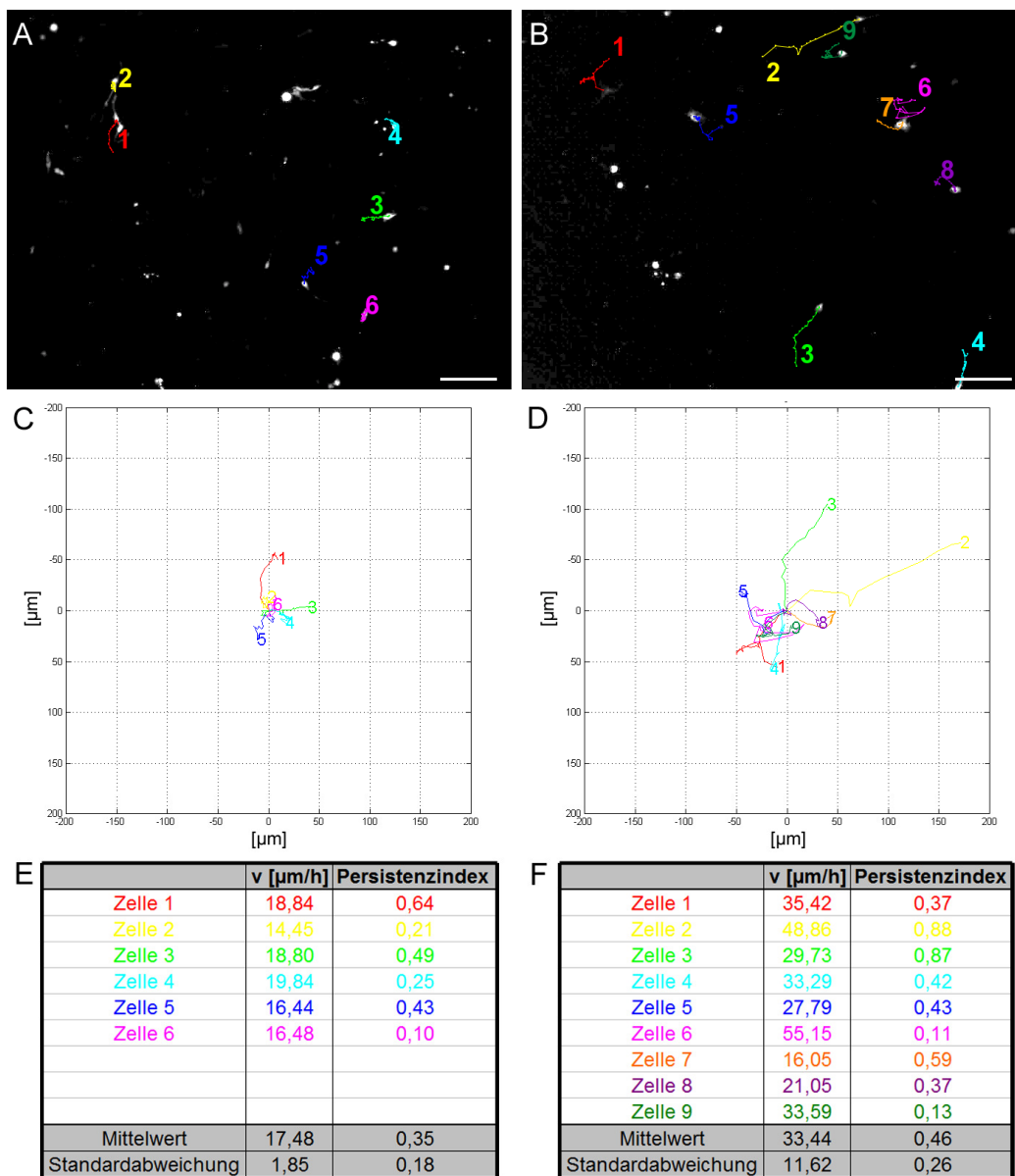
In dem Diagramm ist der relative Migrationsindex der N3EFL-Zellen inklusive der Standardabweichung der Werte graphisch dargestellt. Diese Analyse wurde mittels dem von Dai *et al.* (2005) entwickeltem Makro erhoben. Die Supplementzugabe ist im Material und Methodenteil beschrieben (s. Tabelle 9) und wurde nach GFP-Überexpression durchgeführt, falls nichts anderes angegeben ist. HA wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt, wenn nichts anderes beschrieben wurde.

Die rote Linie indiziert den Migrationsindex der Kontrollzellen. Nach dem t-Test unterscheiden sich die relative Migrationsindices der Bedingungen mit  $p < 0,05$ ,  $p^{**} < 0,01$  und  $p^{***} < 0,001$  statistisch signifikant von der Kontrollbedingung (GFP-Überexpression). „e“ gibt die Anzahl der Experimente und „f“ die Summe der bewerteten Filme an.

Zunächst wurden die Migrationsfilme mit dem von Dai *et al.* (2005) entwickelten Makro ausgewertet (s. Abbildung 14). Der rote Balken in Abbildung 14 indiziert den relativen Migrationsindex der Kontrollzellen, welcher ebenfalls den maximalen Wert aller untersuchten Bedingungen widerspiegelt. In vielen Fällen wurde mittels t-Test eine statistisch signifikante Inhibition der Zellmigration im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt. Die einzigen Ausnahmen bildeten dabei EGFR-überexprimierende N3EFL-Zellen sowie GFP-überexprimierende N3EFL-Zellen unter der Zugabe von 10 ng/ml oder 20 ng/ml EGF, 10 µg/ml oder 100 µg/ml HA sowie nach dem Hinzufügen von DMSO.

Besonders gering waren die Migrationsindices nach der Zugabe der Gehirnpräparation oder Ionomycin (s. Abbildung 14). Bei Betrachtung der entsprechenden Filme war eine extreme Verringerung der Zellmotilität auch deutlich

erkennbar, was bei allen anderen Bedingungen nicht vermutet werden konnte. Nach dieser Auswertemethode schien eine Steigerung der Zellmigration durch Supplementzugabe oder Überexpression von Kandidatengenen nicht möglich zu sein. Auch die Überexpression der Positivkontrolle, EGFR-pEGFP-N3, schien die Zellmotilität nicht positiv zu beeinflussen. Dabei konnte nach Inspizierung dieser Filme eine deutliche Steigerung der Geschwindigkeit vermutet werden. Wegen dieses Widerspruches wurde eine weitere Analyse der Filme über die manuelle Pfadbestimmung durchgeführt (s. Abbildung 15).



**Abbildung 15: Repräsentatives Beispiel für die manuelle Pfadbestimmung**

Die Abbildungen wurden aus einem Migrationsassay mit N3EFL-Zellen, der unter den etablierten Bedingungen durchgeführt wurde (s. 4.1.2.1), generiert. Die beiden Filme stammen aus demselben Experiment, in dem 25 Aufnahmen in einem Abstand von jeweils 10 min und 42 s gemacht wurden.

Dargestellt ist das jeweils letzte Bild zweier Filme inklusive der manuell bestimmten Trajektorien. In (A) ist die Kontrollbedingung mit GFP-überexprimierenden N3EFL-Zellen dargestellt. (B) repräsentiert die Migrationspfade der EGFR-GFP-überexprimierenden N3EFL-Zellen (Positivkontrolle). Der Maßstabsbalken beträgt 100  $\mu\text{m}$ .

In (C) und (D) wurden die Zellpfade in ein Koordinatensystem eingetragen<sup>3</sup>. Der Migrationsstartpunkt jeder Zelle ist dabei der Ursprung. In (C) sind die Trajektorien der GFP-überexprimierenden Zellen zu sehen. (D) zeigt die Zellpfade der Positivkontrolle vom Ursprung aus.

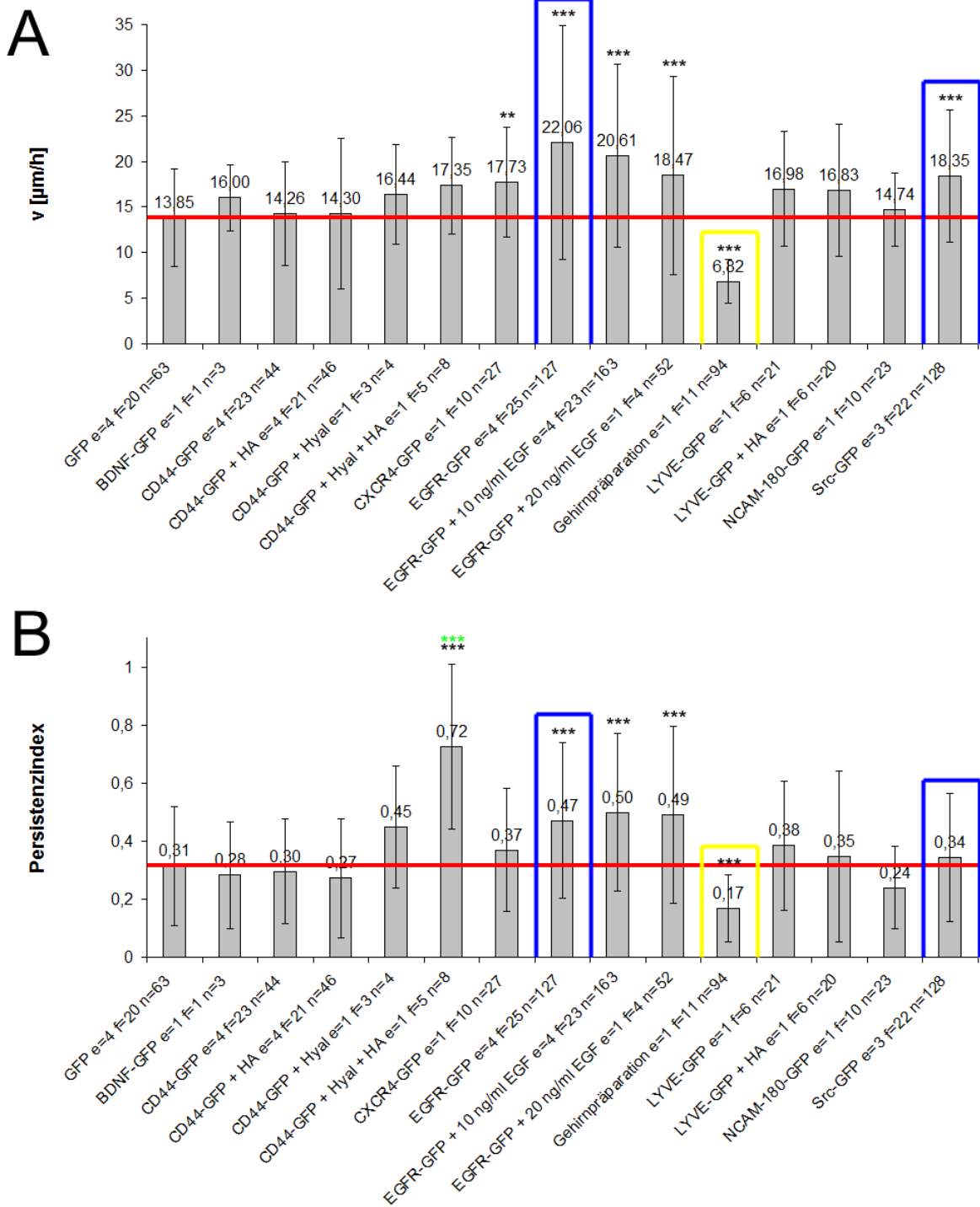
Die tabellarische Auflistung der mittleren Migrationsgeschwindigkeiten und der Persistenzen der einzelnen Zellen, sowie deren Mittelwerte und Standardabweichungen der Werte sind in (E) und (F) aufgeführt. Dabei gibt (E) die Daten der Kontrollbedingung und (F) die Werte der Positivkontrolle wider.

Im Vergleich zu den GFP-überexprimierenden Zellen konnte so eine deutliche Steigerung der mittleren Migrationsgeschwindigkeit, sowie der Richtungspersistenz bei der Positivkontrolle nachgewiesen werden. Der Vergleich der Trajektorien zeigte eindeutige Unterschiede. Während sich die GFP-überexprimierenden Zellen von ihrem Migrationsstartpunkt kaum wegbewegten, migrierten die EGFR-GFP-überexprimierenden Zellen deutlich vom Ursprungsort fort (vergl. Abbildung 15C und D).

Bei der manuellen Pfadbestimmung wurden nur Zellen berücksichtigt, welche sich während der gesamten Filmdauer im Sichtfeld befanden, sich nicht teilten oder abstarben. Bei der Auswertemethode nach Dai *et al.* (2005) gingen alle Zellen, die sich irgendwann während dieses Zeitrahmens im Bildausschnitt befanden in die Analyse mit ein. Nur bei einer extremen Inhibition der Migration bewegten sich die Zellen weder aus dem Sichtfeld hinaus, noch migrierten weitere Zellen in die Aufnahme hinein. Jedoch war die Identifikation migrationsinduzierender Faktoren über die aufwendigere Pfadbestimmung mittels MTrackJ präziser. Aus diesem Grunde wurden in weiteren Versuchen die Migrationsgeschwindigkeiten sowie die Richtungspersistenzen der Zellen auf diese Weise bestimmt (s. Abbildung 16).

---

<sup>3</sup> MatLab-Programm von Tim Kaminski, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Bonn



**Abbildung 16: Manuelle Pfadbestimmung der N3EFL-Zellmigration nach Überexpression von Kandidatengenen und Supplementzugaben**

In der Abbildung sind die mittleren Migrationsgeschwindigkeiten inklusive der Standardabweichungen der Werte (A) sowie die Persistenzindizes mit den jeweiligen Standardabweichungen der Werte (B) von verschieden behandelten N3EFL-Zellen graphisch dargestellt. Die Daten stammen aus Migrationsassays, welche nach den optimierten Bedingungen durchgeführt wurden (s. 4.1.2.1). Diese Analyse wurde mittels manueller Pfadbestimmung erhoben. Die Supplementzugabe ist im Material und Methodenteil beschrieben (s. Tabelle 9) und wurde nach GFP-Überexpression durchgeführt, falls nichts anderes angegeben ist. HA wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt, wenn nichts anderes beschrieben wurde.



Die roten Linien indizieren die Migrationseigenschaften der Kontrollzellen (GFP-überexprimierende N3EFL-Zellen). Nach dem t-Test unterscheiden sich die mittleren Migrationsgeschwindigkeiten oder Persistenzindices der Bedingungen mit  $p^{**}<0,01$  und  $p^{***}<0,001$  statistisch signifikant von der Kontrollbedingung (GFP-Überexpression). Die statistischen Signifikanzunterschiede der Migrationsparameter nach Supplementzugaben bei Kandidatengen-Überexpressionen, im Vergleich zur Kandidatengen-Überexpression alleine, wurden ebenfalls überprüft. Nach Überexpression von CD44-GFP und Zugabe von Hyal und HA war der Persistenzindex mit  $p^{***}<0,001$  statistisch höchst signifikant höher als die Überexpression mit CD44-GFP.

Parameter von Interesse, welche in mehr als einem Experiment registriert worden sind, wurden farblich eingerahmt. Die gelben Rahmen markieren eine statistisch höchst signifikant inhibierende Bedingung. Blau eingerahmt sind migrationsinduzierende Gegebenheiten, welche im Folgenden noch präziser untersucht werden. „e“ gibt die Anzahl der Experimente, „f“ die Summe der bewerteten Filme und „n“ die Anzahl der Zellpfade an.

Mehrfach durchgeführte Experimente mit gleichen Resultaten bewiesen die Reproduzierbarkeit dieser Analysemethode. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass sowohl durch die Überexpression einiger Kandidatengene, sowie durch Supplementzugaben die Migration der N3EFL-Zellen beeinflusst werden konnte.

Mehrere Balken in Abbildung 16 ragen über die roten Linien, welche die endogene Migrationsfähigkeit der glialen Vorläuferzellen repräsentieren, hinaus. Dies bedeutet, dass unter diesen Bedingungen in mindestens einem Versuch die mittlere Migrationsgeschwindigkeit und/ oder der Persistenzindex der Zellen gesteigert wurde(n). Beide Parameter wurden in folgenden Fällen erhöht: CD44-GFP-Überexpression mit Zugabe von Hyal, CD44-GFP-Überexpression mit gleichzeitiger Zugabe von Hyal und HA, Überexpression von CXCR4-GFP, EGFR-GFP-Überexpression alleine oder unter simultanen Zugaben von 10 ng/ml EGF oder 20 ng/ml EGF, Lyve-GFP-Überexpression auch unter Zugabe von HA und die Überexpression von Src-GFP.

Die Berechnungen der statistischen Signifikanz mittels t-Test ergaben, dass die mittlere Migrationsgeschwindigkeit und der Persistenzindex der Positivkontrolle, Überexpression von EGFR-GFP, im Vergleich zu den Parametern der GFP-überexprimierenden N3EFL-Zellen, höchst signifikant anstiegen. Dies war auch nach Zugabe von 10 ng/ml EGF oder 20 ng/ml EGF nach einer EGFR-GFP-Überexpression der Fall. Aus dem Hinzufügen von EGF (10 ng/ml oder 20 ng/ml) nach einer EGFR-GFP-Überexpression resultierte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied der Migrationsparameter im Vergleich zu den Ergebnissen nach einer EGFR-GFP-Überexpression alleine.

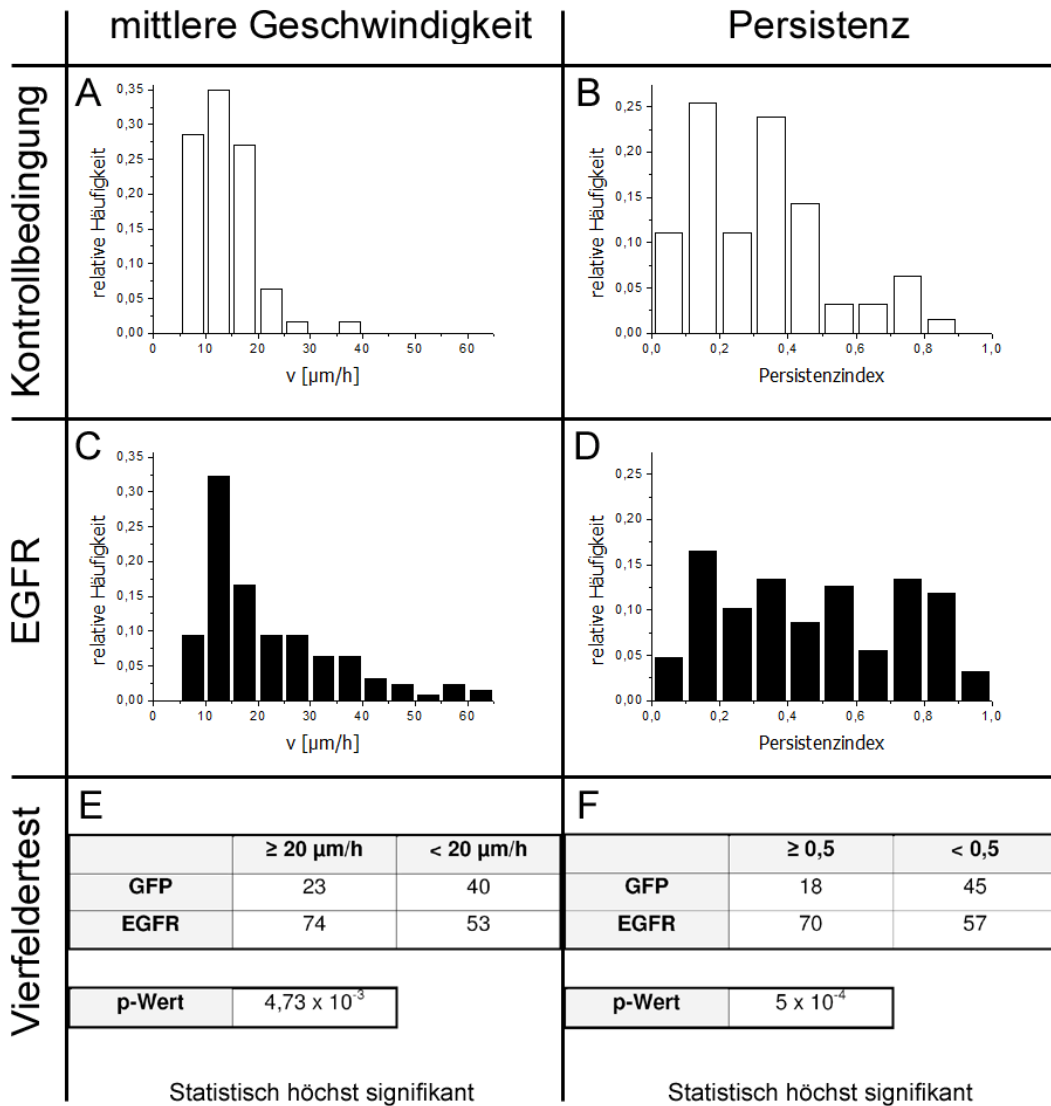
Weiterhin wurde im Vergleich zu den Migrationsparametern nach einer GFP-Überexpression mittels t-Test festgestellt, dass die mittlere

Migrationsgeschwindigkeit nach einer CXCR4-GFP-Überexpression statistisch hoch signifikant und im Falle einer Src-GFP-Überexpression statistisch höchst signifikant anstieg. Die Erhöhung der Richtungspersistenz nach der Überexpression von CD44-GFP unter der Zugabe von Hyal und HA war ebenfalls statistisch höchst signifikant. Auch aus dem Vergleich dieser Bedingung mit der Richtungspersistenz nach einer Überexpression von CD44-GFP alleine, resultierte ein statistisch höchst signifikantes Ergebnis (s. Abbildung 16 \*\*\*). Wurden HA oder Hyal unabhängig von einander nach einer CD44-GFP-Überexpression hinzugefügt, ergab sich keine statistisch signifikante Veränderung der Migrationsparameter.

Eine eindeutige Migrationsinhibition konnte mittels t-Test nach Hinzufügen der Gehirnpräparation eruiert werden (s. Abbildung 16 gelber Rahmen).

Neben der Positivkontrolle, den EGFR-GFP-überexprimierenden N3EFL-Zellen, wurde eine weitere Bedingung, die eine nach dem t-Test statistisch höchst signifikante Steigerung eines Migrationsparameters induzierte und direkt mit der GFP-Kontrolle verglichen werden konnte, identifiziert. Es handelte sich um die mittlere Migrationsgeschwindigkeit nach einer Überexpression von Src-GFP (s. Abbildung 16 blauer Rahmen). Alle anderen statistisch höchst signifikant veränderten Parameter resultierten, neben der Überexpression eines Kandidatengens, gleichzeitig aus einer Supplementzugabe. Die Auswirkungen dieser Bedingungen konnten somit nicht auf ein Kriterium zurückgeführt werden. Aus diesem Grunde stand die genaue Überprüfung der statistischen Relevanz der Migrationsparameter nach einer Src-GFP-Überexpression, sowie die statistische Verifizierung der Migrationsteigerung durch die Positivkontrolle im Fokus der folgenden Untersuchungen.

Auch die Überprüfung durch den Vierfeldertest bestätigte, dass die mittlere Migrationsgeschwindigkeit und die Persistenz im Falle einer EGFR-GFP-Überexpression statistisch höchst signifikant gesteigert wurden (s. Abbildung 17). Dieser Test zeigte ebenfalls, dass eine Überexpression von Src-GFP bei den N3EFL-Zellen eine statistisch signifikante Steigerung der mittleren Migrationsgeschwindigkeit, aber nicht der Richtungspersistenz bewirkte (s. Abbildung 18).

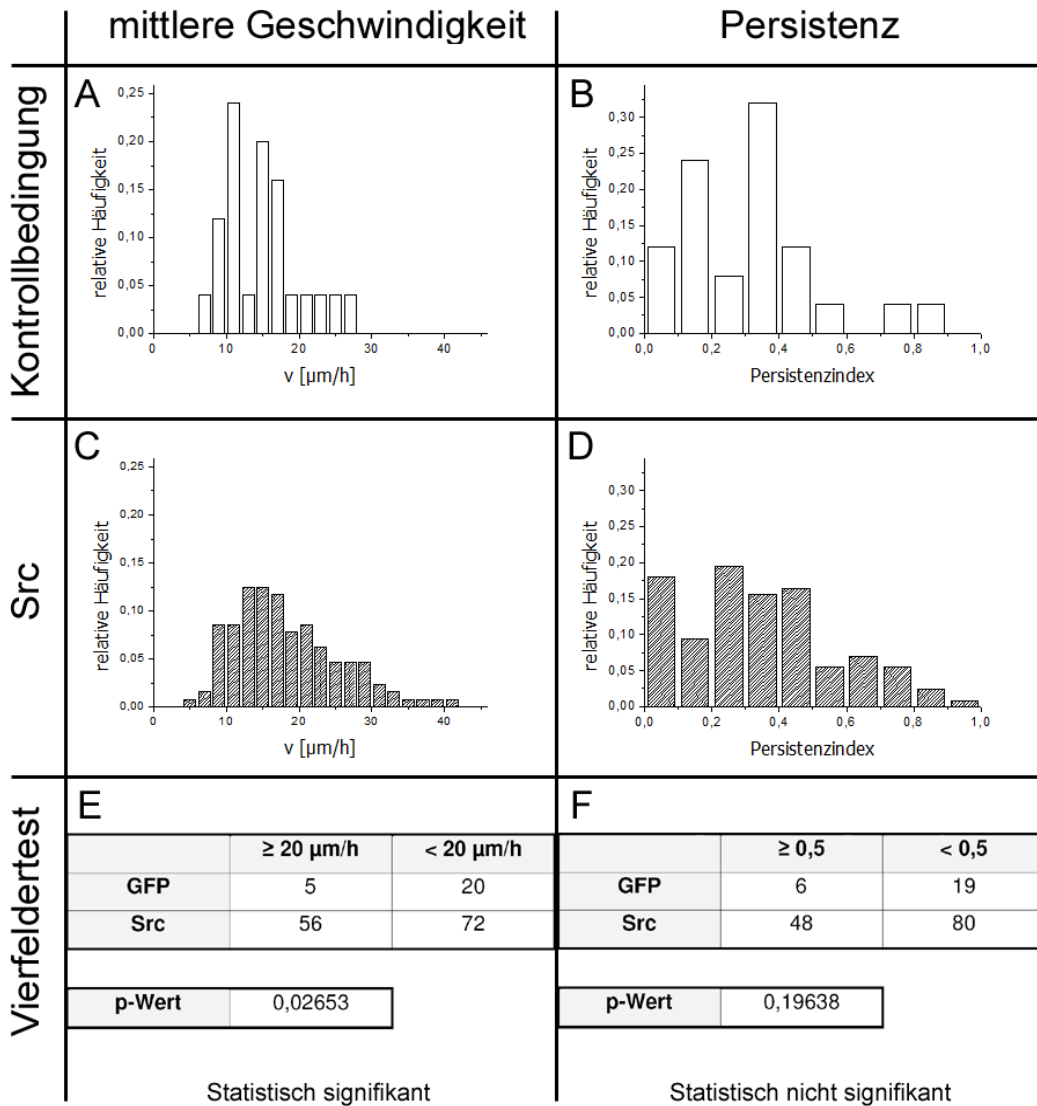


**Abbildung 17: Statistik der Migration von EGFR-GFP-überexprimierenden N3EFL-Zellen**

Graphisch dargestellt sind die relativen Häufigkeitsverteilungen der mittleren Migrationsgeschwindigkeiten sowie der Persistenzindices EGFR-GFP-überexprimierender N3EFL-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (GFP-überexprimierende N3EFL-Zellen). Die Migrationsassays wurden, wie in 4.1.2.1 beschrieben, durchgeführt. Bestimmt wurden die Parameter durch manuelle Pfadbestimmung. Der Vergleich der beiden Bedingungen erfolgte über den Vierfeldertest, um die statistische Signifikanz zu überprüfen.

Die Daten gehen aus vier unabhängigen Experimenten hervor. Pro Zeitrafferaufnahme wurden 25 Bilder gemacht. Im Falle der Kontrollzellen ((A) mittlere Geschwindigkeit, (B) Persistenz) gingen 20 Filme und 63 Zellpfade in die Bewertung mit ein. Bei den EGFR-GFP-überexprimierenden Zellen ((C) mittlere Geschwindigkeit, (B) Persistenz) waren es 25 Filme und 127 Zellpfade. Die mittlere Migrationsgeschwindigkeit wurde zwischen 0 und 65 µm/h in Klassengrößen von 5 µm/h eingeteilt. In einem Bereich von 0 bis 1 lag die Schrittgröße der Persistenz bei 0,1.

Die Bewertungen über den Vierfeldertest ((E) Vierfeldertest der mittleren Geschwindigkeiten, (F) Vierfeldertest der Persistenzen) zeigen einen statistisch höchst signifikanten Unterschied der mittleren Migrationsgeschwindigkeiten, sowie der Persistenzen zwischen den Kontrollzellen und der Positivkontrolle.



**Abbildung 18: Statistik der Migration von Src-GFP-überexprimierenden N3EFL-Zellen**

Graphisch dargestellt sind die relativen Häufigkeitsverteilungen der mittleren Migrationsgeschwindigkeiten sowie der Persistenzindices Src-GFP-überexprimierender N3EFL-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (GFP-überexprimierende N3EFL-Zellen). Die Migrationsassays wurden, wie in 4.1.2.1 beschrieben, durchgeführt. Bestimmt wurden die Parameter durch manuelle Pfadbestimmung. Der Vergleich der beiden Bedingungen erfolgte über den Vierfeldertest, um die statistische Signifikanz zu überprüfen.

Die Daten gehen aus drei unabhängigen Experimenten hervor. Pro Zeitrafferaufnahme wurden 25 Bilder gemacht. Im Falle der Kontrollzellen ((A) mittlere Geschwindigkeit, (B) Persistenz) gingen 12 Filme und 25 Zellpfade in die Bewertung mit ein. Bei den Src-GFP-überexprimierenden Zellen ((C) mittlere Geschwindigkeit, (B) Persistenz) waren es 22 Filme und 128 Zellpfade. Die mittlere Migrationsgeschwindigkeit wurde zwischen 0 und 45 μm/h in Klassengrößen von 2 μm/h eingeteilt. In einem Bereich von 0 bis 1 lag die Schrittgröße der Persistenz bei 0,1.

Die Bewertung über den Vierfeldertest ((E) Vierfeldertest der mittleren Geschwindigkeiten, (F) Vierfeldertest der Persistenzen) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied der mittleren Migrationsgeschwindigkeiten zwischen den Kontrollzellen und den Src-GFP-überexprimierenden N3EFL-Zellen (E). Bei den Persistenzen wurde unabhängig vom Setzen des Schwellenwertes kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt (F).

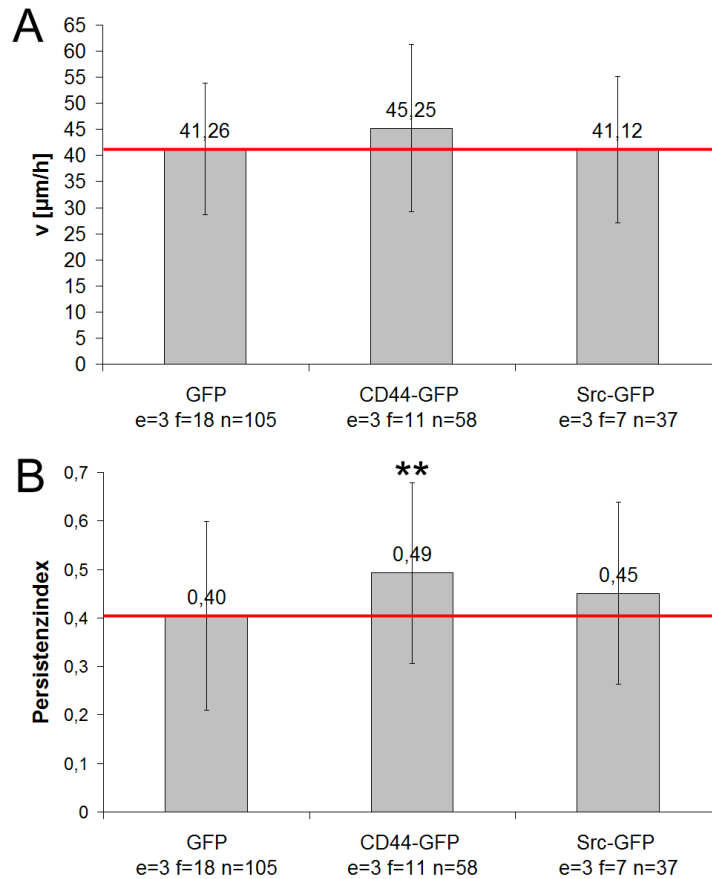
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Zellmigration der glialen Vorläuferzellen, N3EFL-Zellen, durch die Überexpression diverser Kandidatengene und Supplementzugaben positiv beeinflusst wurde. Die statistisch höchst signifikante Steigerung der mittleren Migrationsgeschwindigkeit durch die Überexpression von EGFR-GFP und Src-GFP konnte anhand verschiedener statistischer Bewertungen verifiziert werden. Auch die statistisch höchst signifikante Erhöhung der Richtungspersistenz durch die Positivkontrolle konnte durch unterschiedliche statistische Untersuchungen bestätigt werden.

#### **4.1.3 Zellmigrationsexperimente mit B35-Neuroblastomzellen**

Mit den B35-Neuroblastomzellen wurde der Migrationsassay bereits initial etabliert (s. 4.1.1). Diese Tumorzelllinie sollte auch bei Invasionsstudien als Modelzelllinie fungieren, wie in 4.2 genauer erläutert wird. Aus diesem Grunde waren auch in diesem Fall zunächst die *in vitro* Auswirkungen der Überexpression verschiedener Kandidatengene von Interesse.

Zum einen wurde der Effekt einer CD44-GFP-Überexpression auf die Migration der Neuroblastomzellen einer statistischen Signifikanzuntersuchung unterworfen. Der Grund dafür war, dass bekannt ist, dass der Transmembranrezeptor CD44 eines der Hauptadhäsionsmoleküle bei Tumorzellen ist, welches als Signalmolekül die Zellmigration und -invasion über eine Umorganisation des Aktinzytoskeletts herbeiführt (Turley *et al.* (2002)).

Im Fokus stand zum Anderen die Src-Tyrosinkinase (s. Abbildung 18), welche bereits die N3EFL-Zellmigration positiv beeinflusst hatte. Durch manuelle Pfadbestimmung sollte überprüft werden, ob aus einer Überexpression jeweils einer dieser beiden GFP-Fusionsproteine eine statistisch signifikante Migrationssteigerung der B35-Zellen resultierte.



### Abbildung 19: Manuelle Pfadbestimmung der B35-Zellmigration nach Überexpression von Kandidatengenen

In der Abbildung sind die mittleren Migrationsgeschwindigkeiten inklusive der Standardabweichungen der Werte (A) sowie die Persistenzindices mit den jeweiligen Standardabweichungen der Werte (B) von verschiedenen behandelten B35-Zellen graphisch dargestellt. Die Daten stammen aus Migrationsassays, welche nach den optimierten Bedingungen durchgeführt wurden (s. 4.1.1). Diese Analyse wurde mittels manueller Pfadbestimmung erhoben.

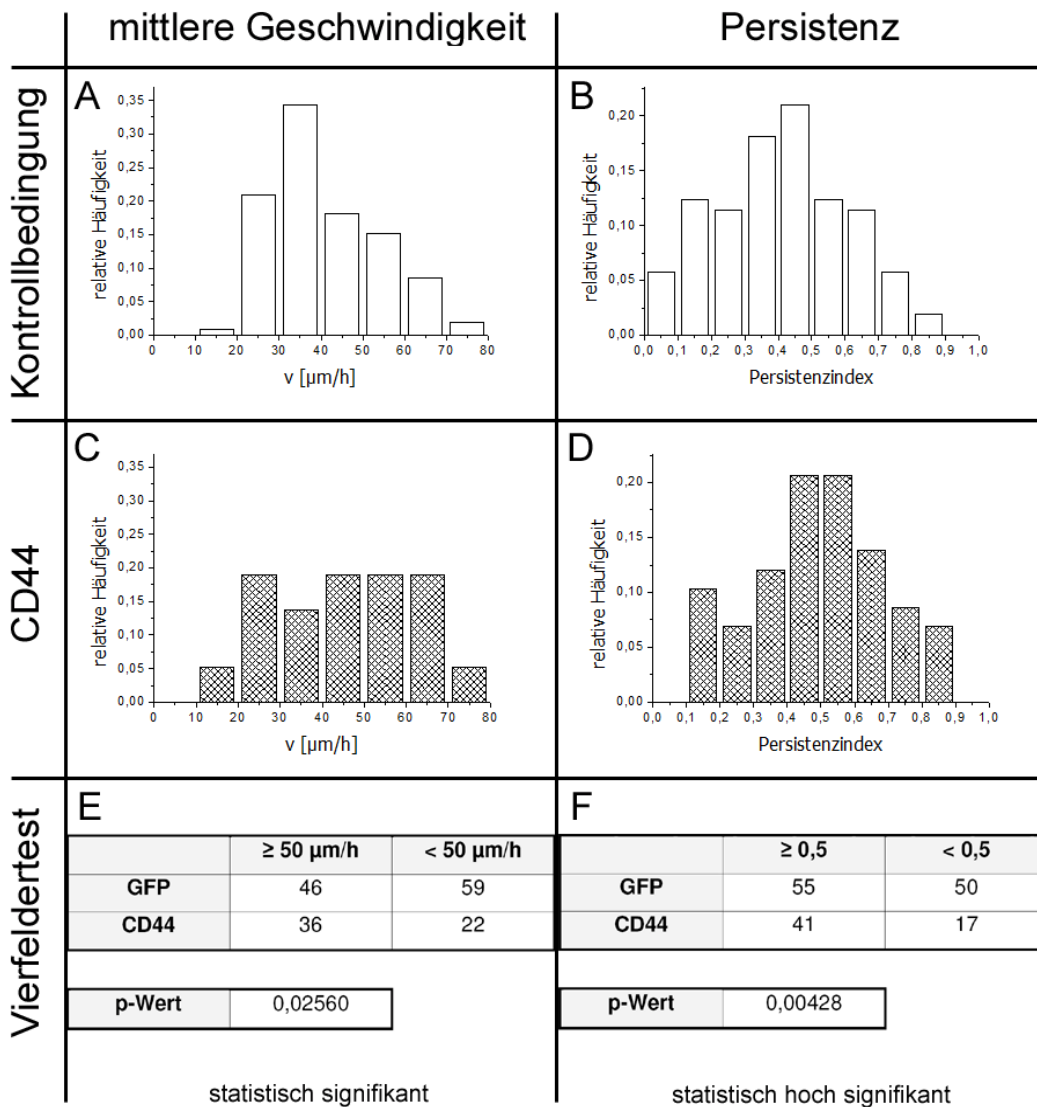
Die Daten gehen aus drei unabhängigen Experimenten hervor<sup>4</sup>. Dabei wurden pro Zeitrafferaufnahme 20 Zyklen mit jeweils einer Aufnahme im Abstand von 15 min gemacht. Die roten Linien indizieren die Migrationseigenschaften der Kontrollzellen (GFP-überexprimierende B35-Zellen). Die Unterschiede der Migrationsparameter der GFP-überexprimierenden Zellen und der Kandidatengen-überexprimierenden Zellen wurden mittels t-Test auf ihre statistische Signifikanz hin überprüft. Der Persistenzindex der CD44-GFP-überexprimierenden Zellen unterschied sich mit  $p^{**} < 0,01$  statistisch hoch signifikant von der Kontrollbedingung (GFP-Überexpression).

In Abbildung 19 wird ersichtlich, dass die CD44-GFP-überexprimierenden Neuroblastomzellen durchschnittlich schneller migrierten als die GFP-Kontrolle, während sich die mittlere Migrationsgeschwindigkeit der Src-GFP-überexprimierenden B35-Zellen kaum von den Kontrollzellen unterschied. Der Persistenzindex der Src-GFP-überexprimierenden Zellen hingegen schien im

<sup>4</sup> Nach den etablierten Bedingungen durchgeführt von Annika Böckenhoff, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Bonn

Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht zu sein. Nach dem t-Test stieg der Persistenzindex der B35-Zellen nach einer CD44-GFP-Überexpression statistisch hoch signifikant an.

Hinsichtlich der statistischen Signifikanz wurden im Folgenden weitere Untersuchungen mittels des Vierfeldertestes durchgeführt.

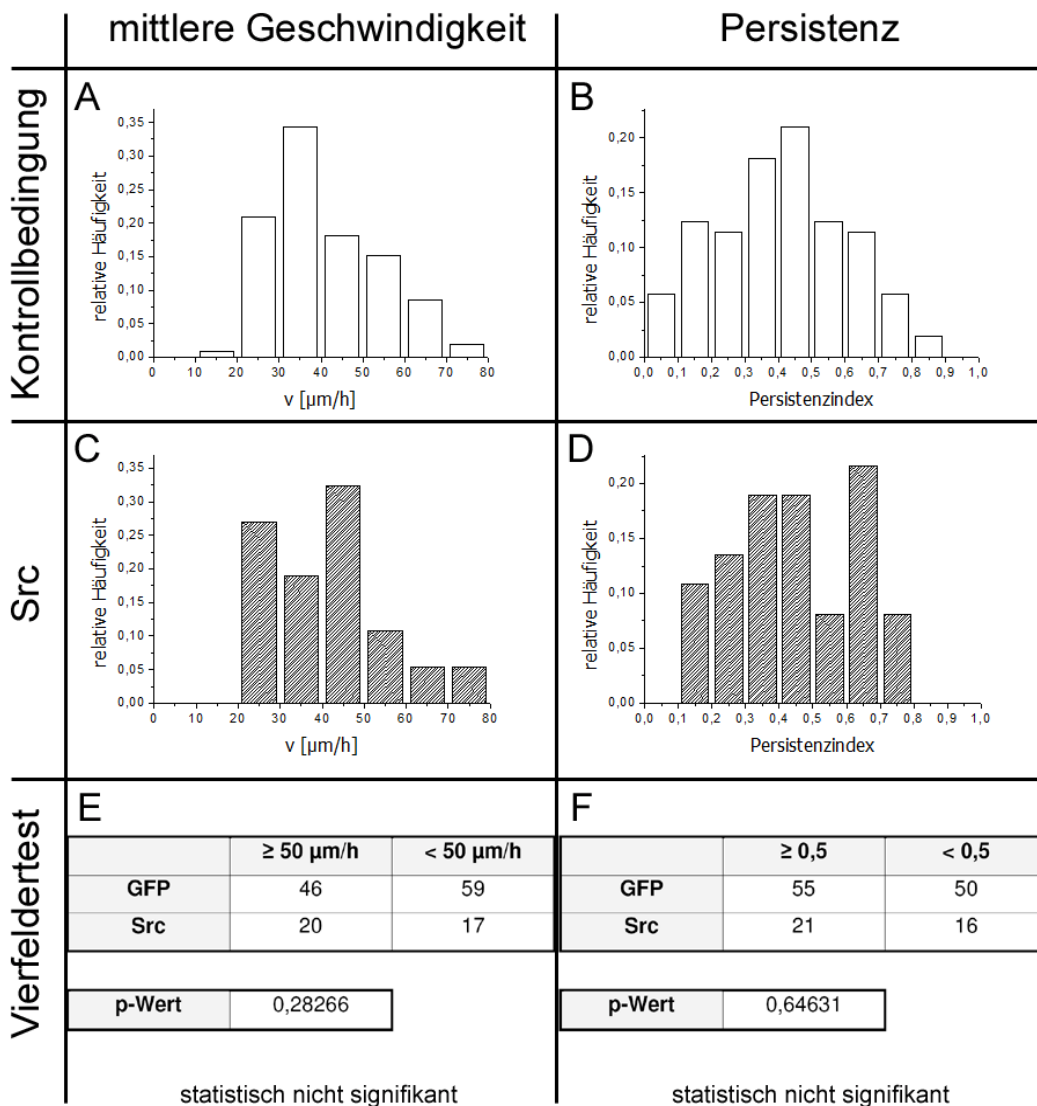


**Abbildung 20: Statistik der Migration von CD44-GFP-überexprimierenden B35-Zellen**

Graphisch dargestellt sind die relativen Häufigkeitsverteilungen der mittleren Migrationsgeschwindigkeiten sowie der Persistenzindices CD44-GFP-überexprimierender B35-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (GFP-überexprimierende B35-Zellen). Die Migrationsassays wurden, wie in 4.1.1 beschrieben, durchgeführt. Bestimmt wurden die Parameter durch manuelle Pfadbestimmung. Der Vergleich der beiden Bedingungen erfolgte über den Vierfeldertest, um die statistische Signifikanz zu überprüfen.

Die Daten gehen aus drei unabhängigen Experimenten hervor<sup>5</sup>. Dabei wurden pro Zeitrafferaufnahme 20 Zyklen mit jeweils einer Aufnahme im Abstand von 15 min gemacht. Im Falle der Kontrollzellen ((A) mittlere Geschwindigkeit, (B) Persistenz) gingen 18 Filme und 105 Zellpfade in die Bewertung mit ein. Bei den CD44-GFP-überexprimierenden Zellen ((C) mittlere Geschwindigkeit, (B) Persistenz) waren es 11 Filme und 58 Zellpfade. Die mittlere Migrationsgeschwindigkeit wurde zwischen 0  $\mu\text{m}/\text{h}$  und 80  $\mu\text{m}/\text{h}$  in Klassengrößen von 10  $\mu\text{m}/\text{h}$  eingeteilt. In einem Bereich von 0 bis 1 lag die Schrittgröße der Persistenz bei 0,1.

Die Bewertungen über den Vierfeldertest ((E) Vierfeldertest der mittleren Geschwindigkeiten, (F) Vierfeldertest der Persistenzen) zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied der mittleren Migrationsgeschwindigkeiten, sowie der Persistenzen zwischen den Kontrollzellen und CD44-GFP-überexprimierenden B35-Zellen.



**Abbildung 21: Statistik der Migration von Src-GFP-überexprimierenden B35-Zellen**

Graphisch dargestellt sind die relativen Häufigkeitsverteilungen der mittleren Migrationsgeschwindigkeiten sowie der Persistenzindizes Src-GFP-überexprimierender B35-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (GFP-überexprimierende B35-Zellen). Die Migrationsassays wurden, wie in 4.1.1 beschrieben, durchgeführt.

<sup>5</sup> Nach den etablierten Bedingungen durchgeführt von Annika Böckenhoff, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Bonn



Bestimmt wurden die Parameter durch manuelle Pfadbestimmung. Der Vergleich der beiden Bedingungen erfolgte über den Vierfeldertest, um die statistische Signifikanz zu überprüfen.

Die Daten gehen aus drei unabhängigen Experimenten hervor<sup>6</sup>. Dabei wurden pro Zeitrafferaufnahme 20 Zyklen mit jeweils einer Aufnahme im Abstand von 15 min gemacht. Im Falle der Kontrollzellen ((A) mittlere Geschwindigkeit, (B) Persistenz) gingen 18 Filme und 105 Zellpfade in die Bewertung mit ein. Bei den Src-GFP-überexprimierenden Zellen ((C) mittlere Geschwindigkeit, (B) Persistenz) waren es 7 Filme und 37 Zellpfade. Die mittlere Migrationsgeschwindigkeit wurde zwischen 0  $\mu\text{m}/\text{h}$  und 80  $\mu\text{m}/\text{h}$  in Klassengrößen von 10  $\mu\text{m}/\text{h}$  eingeteilt. In einem Bereich von 0 bis 1 lag die Schrittgröße der Persistenz bei 0,1.

Die Bewertungen über den Vierfeldertest ((E) Vierfeldertest der mittleren Geschwindigkeiten, (F) Vierfeldertest der Persistenzen) zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied der mittleren Migrationsgeschwindigkeiten, sowie der Persistenzen zwischen den Kontrollzellen und Src-GFP-überexprimierenden B35-Zellen.

Wie in Abbildung 20 dargestellt ist, bewirkte eine CD44-GFP-Überexpression bei diesen gesetzten Grenzen eine statistisch signifikante Steigerung der Zellmigration und der Richtungspersistenz der B35-Zellen. Diese Erkenntnis wurde mit Hilfe des Vierfeldertestes und den Daten aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Versuche wurden nach den etablierten Bedingungen von Annika Böckenhoff aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie in Bonn durchgeführt.

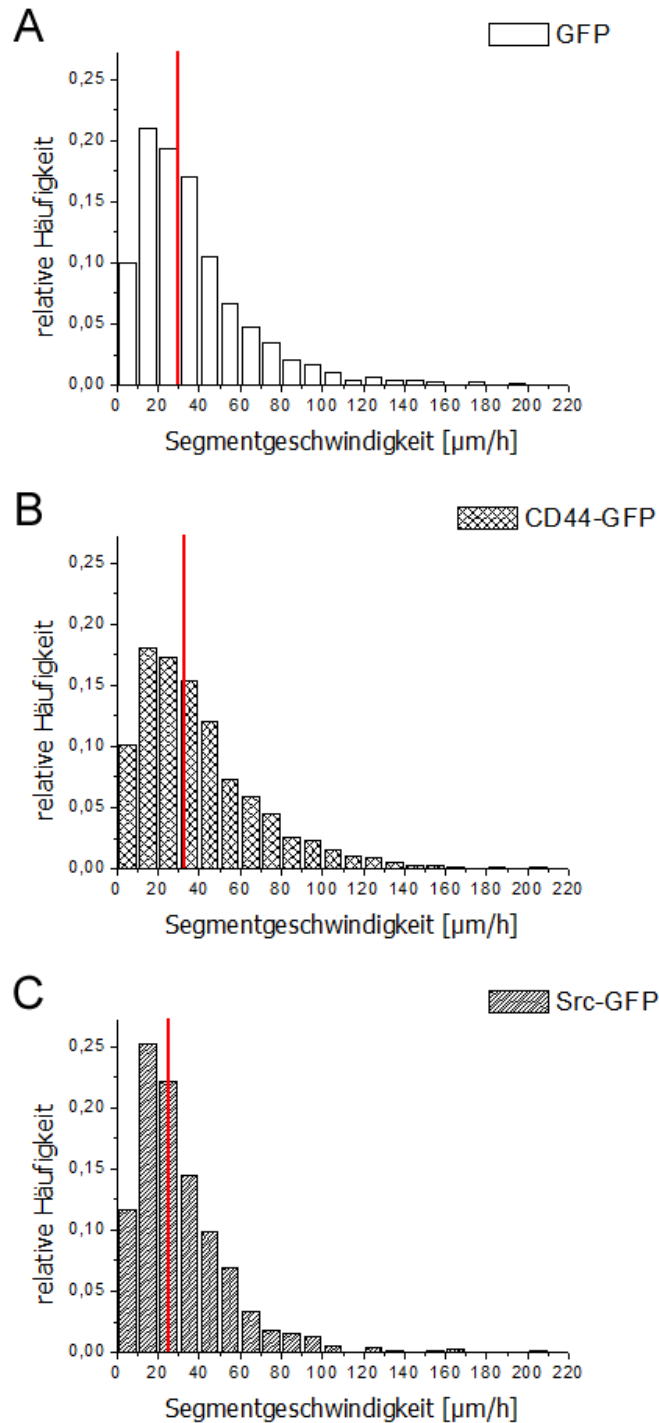
Die gleiche Art der Analyse zeigte, dass die Transfektion der Neuroblastomzellen mit Src-pEGFP-N1 hingegen keine Migrationssteigerung der Zellen zur Folge hatte (s. Abbildung 18). Die Daten wurden durch dieselben Migrationsassays generiert. Dieser Unterschied zu den Resultaten der Überexpression dieser Tyrosinkinase in den N3EFL-Zellen gab Anlass zu genaueren Untersuchungen.

Aus diesem Grunde wurden die Segmentgeschwindigkeiten der Zellen verglichen (s. Abbildung 22). Dazu wurden die Migrationsgeschwindigkeiten zwischen jedem Paar benachbarter Aufnahmezeitpunkte der Zeitrafferaufnahmen ermittelt. Die entsprechenden Segmentgeschwindigkeiten wurden anschließend als relative Häufigkeit graphisch dargestellt. Auf diese Weise wurde nicht nur der Mittelwert der Geschwindigkeit eines kompletten Pfades (mittlere Geschwindigkeit) betrachtet, sondern diese Analyse ermöglichte das Einbeziehen aller einzelnen Trajektorienabschnitte, wodurch auch sehr hohe Geschwindigkeitssprünge und sehr langsame Teilabschnitte in die Berechnung mit einfließen. Zum Vergleich der Segmentgeschwindigkeiten der Src-GFP-überexprimierenden B35-Zellen (s. Abbildung 22C) wurden ebenfalls die Segmentgeschwindigkeiten der

---

<sup>6</sup> Nach den etablierten Bedingungen durchgeführt von Annika Böckenhoff, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Bonn

GFP-überexprimierenden Zellen (s. Abbildung 22A) und der mit CD44-pEGFP-N2 (s. Abbildung 22B) transfizierten Zellen dargestellt.

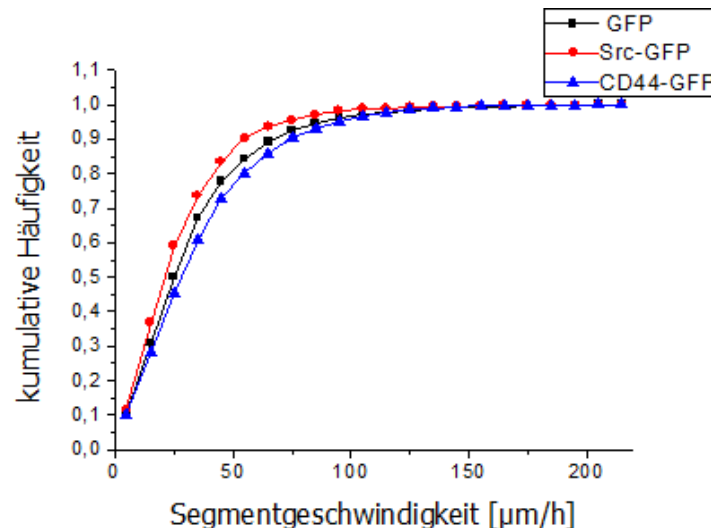


**Abbildung 22: Segmentgeschwindigkeiten von Kandidatengen-überexprimierenden B35-Zellen**  
Dargestellt sind die Segmentgeschwindigkeiten von unterschiedlich behandelten B35-Zellen. Der Migrationsassay wurde wie in 4.1.1 beschrieben durchgeführt. Die Geschwindigkeiten wurden durch die manuelle Pfadbestimmung ermittelt.

Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten<sup>7</sup>. Dabei wurden pro Zeitrafferaufnahme 20 Bilder alle 15 min gemacht. Die Geschwindigkeiten wurden zwischen jedem Aufnahmezeitpunkt ermittelt und zwischen 0-220  $\mu\text{m}/\text{h}$  in Schrittgrößen von 10  $\mu\text{m}/\text{h}$  eingeteilt. Die Häufigkeiten wurden relativ zur Gesamtheit aller entsprechenden Segmentgeschwindigkeiten aufgetragen.

Die roten Linien indizieren die entsprechenden Mediane der Verteilungen. In (A) ist die relative Häufigkeitsverteilung der Segmentgeschwindigkeiten der Kontrollzellen, GFP-überexprimierende B35-Zellen, dargestellt. (B) repräsentiert die gleiche Analyse nach einer CD44-GFP-Überexpression und (C) nach einer Src-GFP-Überexpression in B35-Zellen.

Zum direkten Vergleich wurden in Abbildung 23 die Häufigkeitsverteilungen der Segmentgeschwindigkeiten kumulativ aufgetragen. Bei dieser Art von Auftragung wird ersichtlich, dass sich im Falle der CD44-GFP-Zellen (--▲--) die Werte später asymptotisch der maximalen Häufigkeit von eins approximieren, als die Kontrollzellen (--■--). Bei den Src-GFP-Zellen (--●--) ist dies schon früher der Fall.



**Abbildung 23: Kumulative Darstellung der Segmentgeschwindigkeiten von Kandidatengen-überexprimierenden B35-Zellen**

Kumulativ dargestellt sind die Segmentgeschwindigkeiten von unterschiedlich behandelten B35-Zellen (B35-Zellen transfiziert mit --■-- pEGFP-C2; --●-- Src-pEGFP-N1, --▲-- CD44-pEGFP-N2). Der Migrationsassay wurde wie in 4.1.1 beschrieben durchgeführt. Die Geschwindigkeiten wurden durch die manuelle Pfadbestimmung ermittelt.

Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten<sup>8</sup>. Dabei wurden pro Zeitrafferaufnahme 20 Bilder alle 15 min gemacht. Die Geschwindigkeiten wurden zwischen jedem Aufnahmezeitpunkt ermittelt und zwischen 0-220  $\mu\text{m}/\text{h}$  in Schrittgrößen von 10  $\mu\text{m}/\text{h}$  eingeteilt. Die Häufigkeiten wurden relativ zur Gesamtheit aller entsprechenden Segmentgeschwindigkeiten aufgetragen.

<sup>7</sup> Nach etablierten Bedingungen durchgeführt von Annika Böckenhoff, Institut für Biochemie und Molekularbiologie; Bonn

<sup>8</sup> Nach etablierten Bedingungen durchgeführt von Annika Böckenhoff, Institut für Biochemie und Molekularbiologie; Bonn

Auch die Anordnung der Mediane der relativen Häufigkeitsverteilungen der Segmentgeschwindigkeiten (s. Abbildung 22 rote Linien) bestätigte diese Korrelationen:  $\tilde{v}_{Src-GFP} < \tilde{v}_{GFP} < \tilde{v}_{CD44-GFP}$ . Die genauen Medianwerte sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Die Verteilungen der Segmentgeschwindigkeiten entsprachen keiner Normalverteilung. Deshalb wurden die Unterschiede der verschiedenen Bedingungen mittels des Mann-Whitney Tests auf ihre statistische Signifikanz hin untersucht. Dieser ergab, dass die Segmentgeschwindigkeiten der Src-GFP-überexprimierenden Zellen höchst signifikant langsamer waren als die der Kontrollzellen, während die CD44-GFP-Zellen hoch signifikant schneller migrierten.

Tabelle 20 stellt die Daten der mittleren Geschwindigkeiten und der Segmentgeschwindigkeiten der Kandidatengen-überexprimierenden Zellen vergleichend dar.

**Tabelle 20: Mittlere Geschwindigkeiten und Segmentgeschwindigkeiten der Kandidatengen-überexprimierenden B35-Zellen im Vergleich**

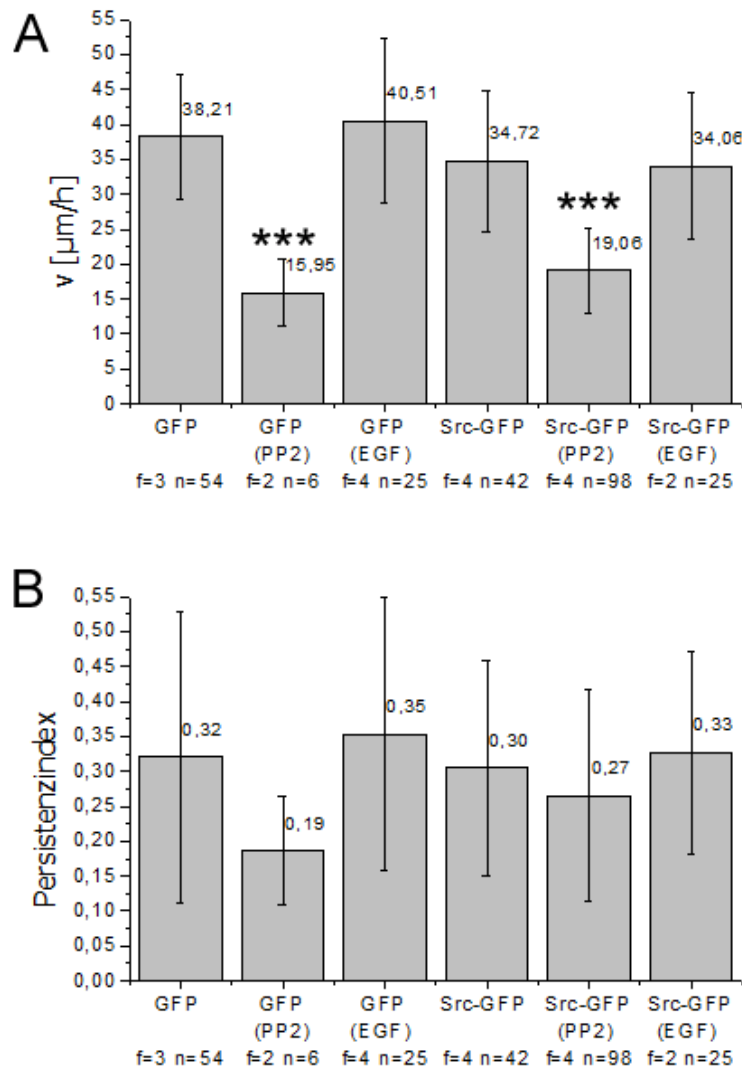
	<b>Mittlere Geschwindigkeit Mittelwert [<math>\mu\text{m}/\text{h}</math>]</b>	<b>Segmentgeschwindigkeit Median [<math>\mu\text{m}/\text{h}</math>]</b>
<b>GFP</b>	41,26	29,88
<b>CD44-GFP</b>	45,25	33,06
<b>Src-GFP</b>	41,12	25,33

Die Bewertungen der mittleren Geschwindigkeiten der CD44-GFP-überexprimierenden B35-Zellen ergaben, dass diese, im Vergleich zu den Kontrollzellen, statistisch signifikant gesteigerte Migrationsparameter aufwiesen. Auch die Segmentgeschwindigkeiten waren nach einer CD44-GFP-Überexpression statistisch signifikant erhöht.

Während sich die mittlere Geschwindigkeit der Src-GFP-überexprimierenden B35-Zellen kaum von der mittleren Geschwindigkeit der GFP-überexprimierenden Neuroblastomzellen unterschied, war die Segmentgeschwindigkeit der Src-GFP-überexprimierenden B35-Zellen statistisch höchst signifikant geringer.

In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob eine Veränderung der Zellmigration der Src-GFP-überexprimierenden B35-Zellen nach EGF-Zugabe möglich war. Aus der Studie von Ren *et al.* (2004) war bekannt, dass eine EGF-Stimulation eine Shp2-abhängige Dephosphorylierung von Paxillin und eine Abspaltung von Csk von dem Paxillin-Src-Komplex zur Folge hat, was somit zu einer Src-Aktivierung führt. Da Paxillin ein Protein Fokaler Adhäsionskomplexe ist, könnte die EGF vermittelte Src-Aktivierung aus einer Kombination von Integrin- und Wachstumsfaktoren vermittelten Signalwegen entstehen (Playford und Schaller (2004)). Diese Befunde wiesen auf einen Zusammenhang zwischen EGF-Stimulation, Src-Aktivierung und Zellmigration hin.

Ebenfalls wurde eine mögliche Inhibition der Bewegungen der Zellen durch den Tyrosinkinaseinhibitor PP2 überprüft (s. Abbildung 24). Bereits Hsia *et al.* (2005) konnten mittels einer Art *Boyden chamber assay* eine Dosis-Wirkungs-Beziehung des Tyrosinkinaseinhibitors auf die Inhibition der Zellmigration von FAK<sup>-/-</sup> Fibroblasten nachweisen.



#### Abbildung 24: Inhibition der B35-Zellmigration durch PP2

Graphisch dargestellt sind die mittleren Migrationsgeschwindigkeiten (A) sowie die Persistenzindices (B) mit den jeweiligen Standardabweichungen der Werte von verschiedenen behandelten B35-Zellen.

Der Migrationsassay wurde, wie in 4.1.1 beschrieben, durchgeführt. Dazu wurde entweder „GFP“ oder „Src-GFP“ überexprimiert. Nach der Transfektion wurden die Zellen in serumfreiem DMEM/F12 kultiviert. Als Supplemente wurden „PP2“ oder „EGF“ hinzugefügt (s. Tabelle 9). Die Daten stammen aus einem Experiment. „f“ gibt die Anzahl der Filme und „n“ die Anzahl der Zellen an, welche in die Berechnungen mit eingingen.

Nach dem t-Test wurde die mittlere Migrationsgeschwindigkeit durch die Zugabe von PP2 nach Überexpression von GFP sowie von SRC-GFP gegenüber der einfachen Überexpression ohne Supplementzugabe, oder der Kontrollbedingung, statistisch höchst signifikant inhibiert ( $p^{***} < 0.001$ ). Die Inhibition der Persistenz war nicht statistisch signifikant. Die EGF-Stimulation hatte in keinem Fall eine statistisch signifikante Auswirkung auf die Zellmigration.

Die Überexpression von Src-GFP bewirkte auch in diesem Experiment keine Migrationssteigerung der B35-Zellen. Eine Zugabe von EGF hatte ebenfalls keine signifikante Veränderung der Zellmotilität zur Folge. Dahingegen wirkte sich die Zugabe von PP2 inhibierend auf die mittlere Migrationsgeschwindigkeit und die Persistenz der Neuroblastomzellen aus. Dies konnte sowohl nach einer GFP-Überexpression, der Kontrollbedingung, als auch nach der Src-GFP-Überexpression beobachtet werden. Mittels t-Test konnte auf diese Weise bei den vorangegangenen Bedingungen eine statistisch höchst signifikante Inhibition der Zellmigration durch PP2 gegenüber den einfachen Überexpressionen ohne Supplementzugabe, oder der Kontrollbedingung, nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zur B35-Zellmigration kann festgehalten werden, dass die Überexpression von CD44-GFP eindeutig migrationssteigernd wirkte. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Neuroblastomzellen durch die Zugabe des Tyrosinkinaseinhibitors PP2 statistisch höchst signifikant in ihrer Motilität eingeschränkt wurden. Die Überexpression von Src-GFP steigerte die Zellmigration nicht.

## 4.2 Zellinvasionsexperimente

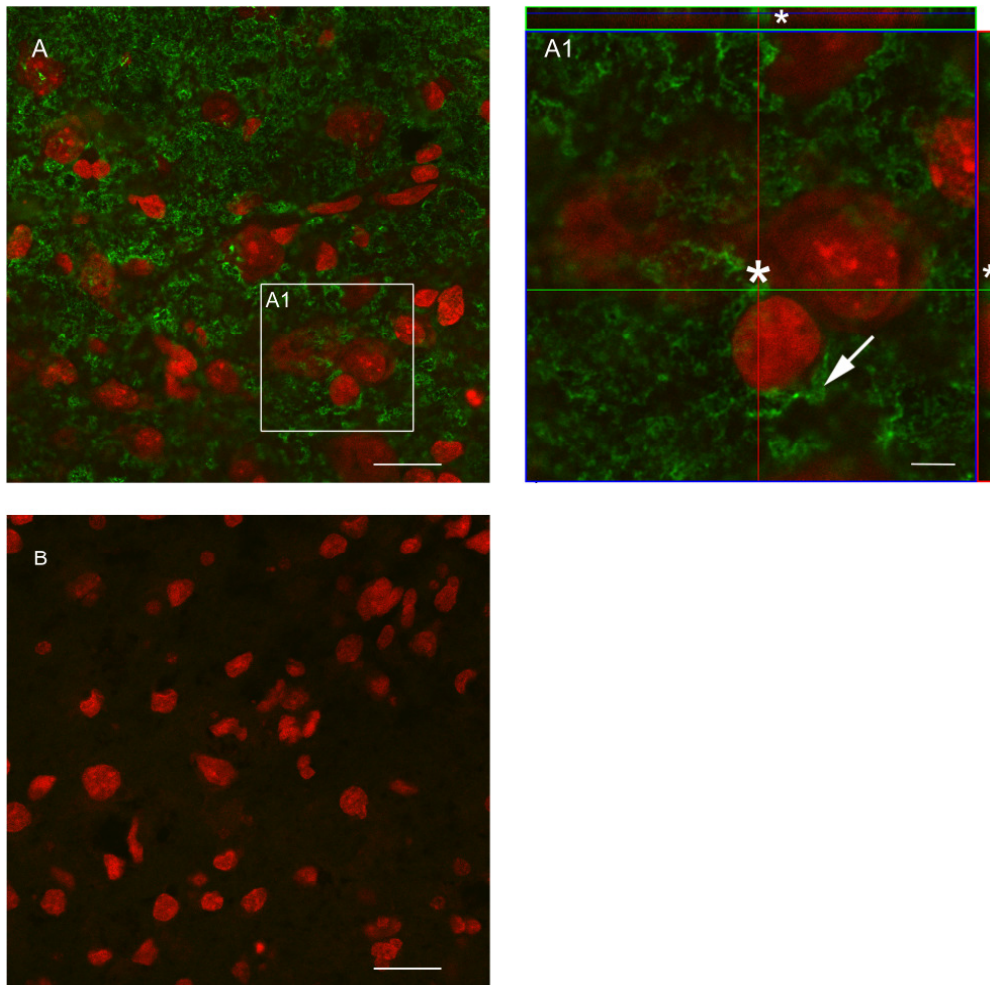
Nach dem *screening* beeinflussender Faktoren auf die zweidimensionale Zellmigration (s. 4.1) sollte ebenfalls der Effekt der Überexpression relevanter Kandidatengene unter *in vivo* Bedingungen getestet werden. Als relevant galten CD44-GFP, aufgrund der Resultate der Migrationsassays mit den B35-Zellen (s. 4.1.3) und Src-GFP wegen der Ergebnisse aus den Experimenten mit den N3EFL-Zellen (s. 4.1.2.2). Als Kontrolle wurde wieder pEGFP-C2 transient transfiziert und als Positivkontrolle wurde abermals die Überexpression von EGFR-GFP genutzt. Durch einen von Scheffler *et al.* (2003) entwickelten *slice assay* war es möglich, 4-6 verschiedene *in vivo* ähnliche Bedingungen, anstatt einer Transplantation, pro Tier zu untersuchen. Dazu wurden Kandidatengen-GFP-überexprimierende Zellen auf den Entorhinalen Cortex von Hippocampusschnitten von P9 *Sprague Dawley* Ratten transplantiert (s. 3.2.11) und unter anderem die Auswirkungen auf ihre horizontale und vertikale Zellmigration ermittelt.

### 4.2.1 Hyaluronan im Hippocampus

Zunächst wurden Kryoschnitte des Hippocampus von P9 *Sprague Dawley* Ratten durch eine HK2-GFP Färbung charakterisiert (s. 3.2.9.2). Auf diese Weise konnte das ggf. vorhandene Hyaluronan grün fluoreszierend sichtbar gemacht werden. Dies war von Interesse, weil endogenes Hyaluronan eine Stimulation von CD44-GFP bewirken könnte.

Im Hippocampus von P9 Ratten konnten sowohl vertikal (s. Sterne in Abbildung 25A1) als auch horizontal (Pfeil in Abbildung 25A1) ausgerichtete Hyaluronanfasern detektiert werden, welche in der Negativkontrolle nicht zu sehen waren (s. Abbildung 25).





#### Abbildung 25: Hyaluronan im Hippocampus von P9 Ratten

Dargestellt sind konfokale Laser-Scanning-Aufnahmen von immunzytochemisch behandelten Kryoschnitten des Hippocampus von P9 Ratten. Diese wurden nach der PFA-Fixierung mit HK2-GFP inkubiert (grüne Fluoreszenz) und die Zellkörper mit Propidiumiodid gegengefärbt (rote Fluoreszenz). Die Bilder sind als Überlagerung grüner und roter Fluoreszenz dargestellt.

In (A) ist ein Bereich der Transplantationsstelle im Entorhinalen Cortex gezeigt. Der Maßstabsbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ . Der weiße Rahmen indiziert die Position eines höher aufgelösten Bildstapels (Der Abstand zwischen den einzelnen z-stacks beträgt 0,1  $\mu\text{m}$ ), welcher in (A1) dargestellt ist. Die Sterne zeigen Hyaluronanstrukturen, die sich entlang der z-Achse orientieren (vertikale Ausrichtung). Der Pfeil zeigt auf horizontale faserartige Strukturen, welche Hyaluronan beinhalten. Der Maßstabsbalken hier beträgt 2  $\mu\text{m}$ . In (B) ist die Negativkontrolle zu sehen, bei der kein HK2-GFP, aber das ansonsten gleiche Färbeprotokoll angewandt wurde (Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.2.2 Zellinvasionsexperimente mit B35-Neuroblastomzellen

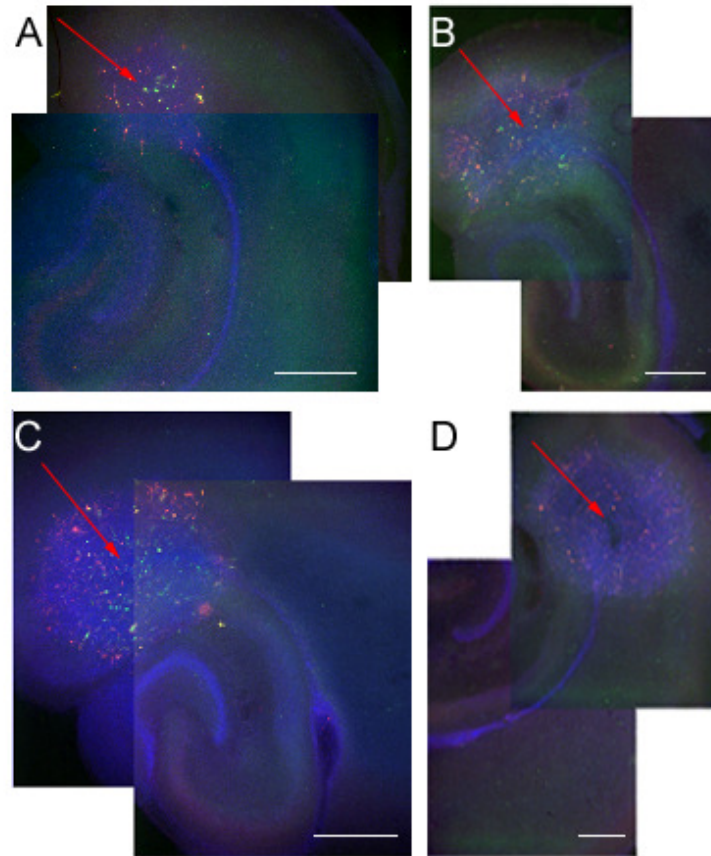
Aus den bereits bei den Migrationsexperimenten (s. 4.1.1) angeführten Gründen wurde auch der *slice assay* zunächst mit den B35-Neuroblastomzellen durchgeführt. Die verhältnismäßig unkompliziert zu kultivierende Zelllinie wurde genutzt, um die Versuche mit den Gewebeschnitten sowie die entsprechenden Auswertungen zu etablieren.

Dazu wurden initial Zeitrafferaufnahmen der Zellen einen Tag nach der Transplantation auf den Hippocampusschnitt durchgeführt. Dies sollte ggf. vorhandene Unterschiede in der Art der Zellmigration und/ oder der Invasion zwischen den Kontrollzellen, GFP-überexprimierende Zellen, und den Kandidatengen-überexprimierenden Zellen unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen hervorheben. Zu diesem Zwecke wurden die organotypischen Gewebeschnittkulturen auf speziellen Membranen von Millipore (PICM ORG 50) eine Woche lang kultiviert, bevor die Transplantation mit den transfizierten Zellen erfolgte. Am folgenden Tag wurden die Zeitrafferaufnahmen durchgeführt, wie in 4.1 mit einem Axiovert 200 Mikroskop mit motorisiertem Kreuztisch, sowie einer beheiz- und begasbaren Inkubationskammer. Trotz der annähernd transparenten Membranen erwies sich die Fokussierung der Zellen als problematisch. Im Allgemeinen konnte jedoch visuell durch verschiedene Beobachter festgestellt werden, dass die Kandidatengen-GFP-überexprimierenden Zellen ihre Fortsatzstrukturen im Gewebe schneller vorzuschieben schienen. Die B35-Neuroblastomzellen wiesen nach den Überexpressionen aller drei Kandidatengene (CD44-GFP, Src-GFP, und EGFR-GFP) im Vergleich zu den GFP-überexprimierenden B35-Neuroblastomzellen jeweils eine erhöhte Beweglichkeit, sowie vermehrt motile Strukturen auf. Beide Befunde sollten in weiterführenden Experimenten genauer untersucht werden. Dazu wurden die Gewebeschnitte mit den transplantierten Zellen nach festgelegten Zeitpunkten fixiert, GFP durch eine Immunfärbung verstärkt dargestellt (s. 3.2.11.1) und verschiedenen mikroskopischen Untersuchungen unterzogen.

Bereits beim ersten Experiment mit den Neuroblastomzellen konnte anhand von Übersichtsaufnahmen der *slices* festgestellt werden, dass sich die horizontale Migration der Kandidatengen-GFP-überexprimierenden Zellen nicht offensichtlich von der Kontrolle unterschied. In Abbildung 26 ist zu sehen, dass sich die fluoreszierenden Zellen an der Sliceoberfläche unter allen Bedingungen nach drei Tagen in ähnlicher Weise kreisförmig um die Transplantationsstelle herum ausgebreitet hatten. Auch nach einer Inkubation der Gewebeschnitte mit den Zellen für eine Dauer von fünf Tagen konnten keine Unterschiede eruiert werden<sup>9</sup>.

---

<sup>9</sup> Daten nicht gezeigt.



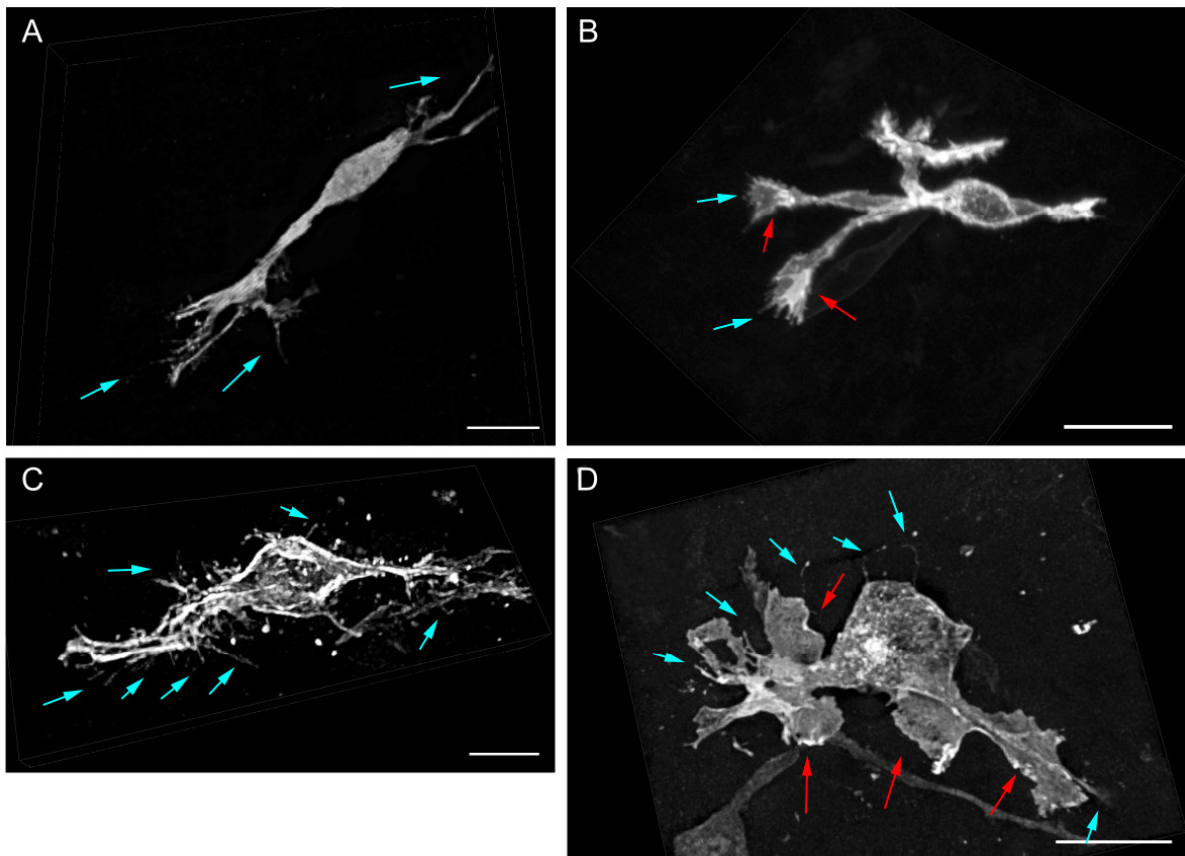
**Abbildung 26: Übersichtsaufnahmen der Hippocampuschnitte nach Transplantation von B35-Zellen**

Dargestellt sind Übersichtsaufnahmen von Hippocampuschnitten mit transplantierten B35-Zellen. Transient transfizierte B35-Zellen wurden *in vitro* auf P9 Rattenhippocampuschnitte transplantiert. Nach drei Tagen wurden diese fixiert, mit einem anti-GFP Antikörper (ab290) gegengefärbt (s. 3.2.11.1) und anschließend mikroskopiert. Die transplantierten Zellen überexprimierten (A) GFP; (B) EGFR-GFP; (C) Src-GFP; (D) CD44-GFP. Die roten Pfeile zeigen auf die Transplantationsstellen, den Entorhinalen Cortex. Die Maßstabsbalken betragen 800  $\mu\text{m}$ .

Die verschiedenen Bedingungen hatten keinen ersichtlichen Einfluss auf die horizontale Migration.

Aus diesem Grunde wurden anschließend die Gewebeintegration sowie die Ausbildung motiler Strukturen der transplantierten Kandidatengen-überexprimierenden B35-Zellen überprüft. Dazu wurden die Schnitte drei Tage nach der Transplantation fixiert, mit einem anti-GFP Antikörper (ab290) gegengefärbt (s. 3.2.11.1) und anschließend Aufnahmen der fluoreszierenden Zellen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie gemacht (s. 3.1). In Abbildung 27 sind transplantierte B35-Zellen im Gewebe dargestellt. Während die Kontrollzellen, GFP-überexprimierende Neuroblastomzellen, relativ wenige Fortsätze besaßen (s. Abbildung 27A), waren alle Kandidatengen-GFP-überexprimierenden Zellen flächig und reicher an Fortsätzen. Die blauen Pfeile zeigen auf filopodienartige Fortsätze und die roten Pfeile deuten auf blattähnliche lamellipodienartige Ausläufer

der Zellen. Letztere konnten bei den Kontrollzellen nicht registriert werden, schienen aber charakteristisch für die EGFR-GFP- (s. rote Pfeile in Abbildung 27B) und Src-GFP-überexprimierenden (s. rote Pfeile in Abbildung 27D) B35-Zellen zu sein. Die CD44-GFP-überexprimierenden Zellen bildeten im Gewebe vermehrt längliche Fortsätze aus (s. blaue Pfeile in Abbildung 27C).



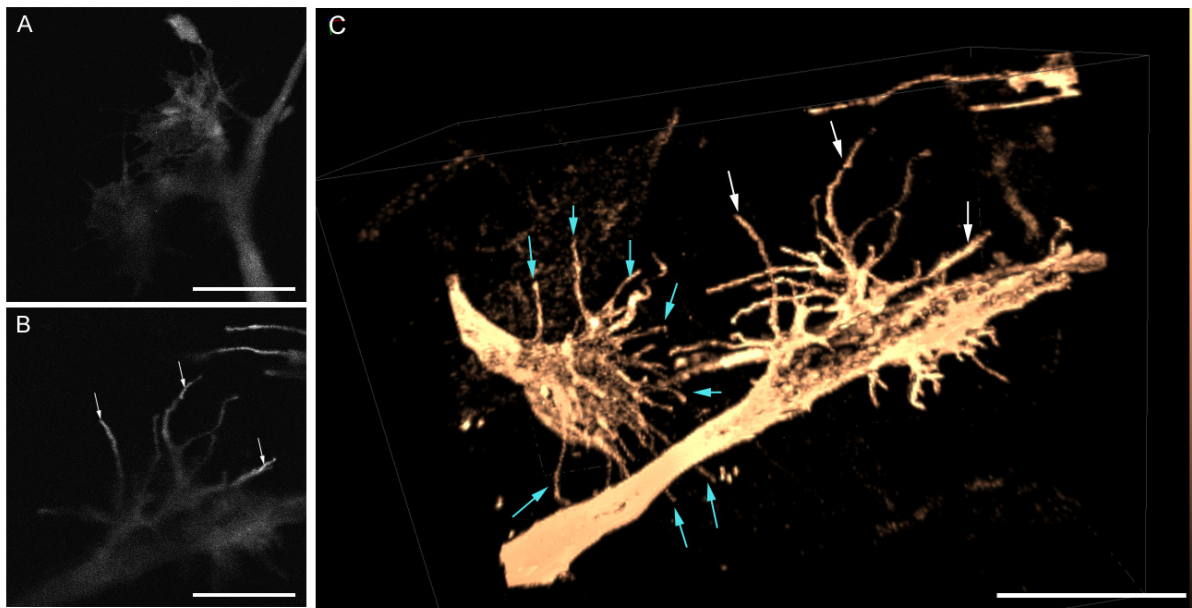
### Abbildung 27: Morphologie transplantiertter B35-Zellen

Dreidimensional dargestellt sind transplantierte B35-Neuroblastomzellen. Diese wurden transient transfiziert und *in vitro* auf P9 Rattenhippocampuschnitte transplantiert. Nach drei Tagen wurden diese fixiert, mit einem anti-GFP Antikörper (ab290) gegengefärbt (s. 3.2.11.1) und anschließend mit einem Zwei-Photonenmikroskop (LSM 510-META-NLO) mikroskopiert.

Die Aufnahmen wurden mit dem Programm AutoVisualize + AutoDeblur bearbeitet<sup>10</sup>. Dabei wurden teilweise die  $\gamma$ -Werte leicht modifiziert. In (A) ist eine GFP-überexprimierende B35-Zelle ( $\gamma = 1,0$  Maßstabsbalken = 40  $\mu\text{m}$ ) abgebildet. Die Zelle in (B) überexprimiert EGFR-GFP ( $\gamma = 1,3$  Maßstabsbalken = 30  $\mu\text{m}$ ). Die Abbildung (C) stellt eine CD44-GFP überexprimierende B35-Zelle dar ( $\gamma = 1,3$  Maßstabsbalken = 30  $\mu\text{m}$ ) und (D) zeigt eine Src-GFP-überexprimierende Zelle ( $\gamma = 1,2$  Maßstabsbalken = 30  $\mu\text{m}$ ). Die roten Pfeile in den Abbildungen deuten auf flächige Zellfortsätze, die blauen Pfeile zeigen auf dünnere Zellfortsätze.

<sup>10</sup> Durchgeführt von Dr. Michael Hans, Institut für Physiologie II, Bonn

Darüber hinaus konnte anhand von konfokalen Laser-Scanning-Aufnahmen festgestellt werden, dass in CD44-GFP-überexprimierenden Zellen, das Fusionsprotein verstärkt in den Zellfortsätzen lokalisiert war (s. Pfeile in Abbildung 28B). Bei den Kontrollzellen war dies nicht der Fall, wie in Abbildung 28A zu sehen ist. Eine hochauflösende dreidimensionale Rekonstruktion der Fortsätze von CD44-GFP-überexprimierenden Zellen im Gewebe verifiziert das vermehrte Vorhandensein filigraner filopodienartiger Zellfortsätze (s. Pfeile in Abbildung 28C).



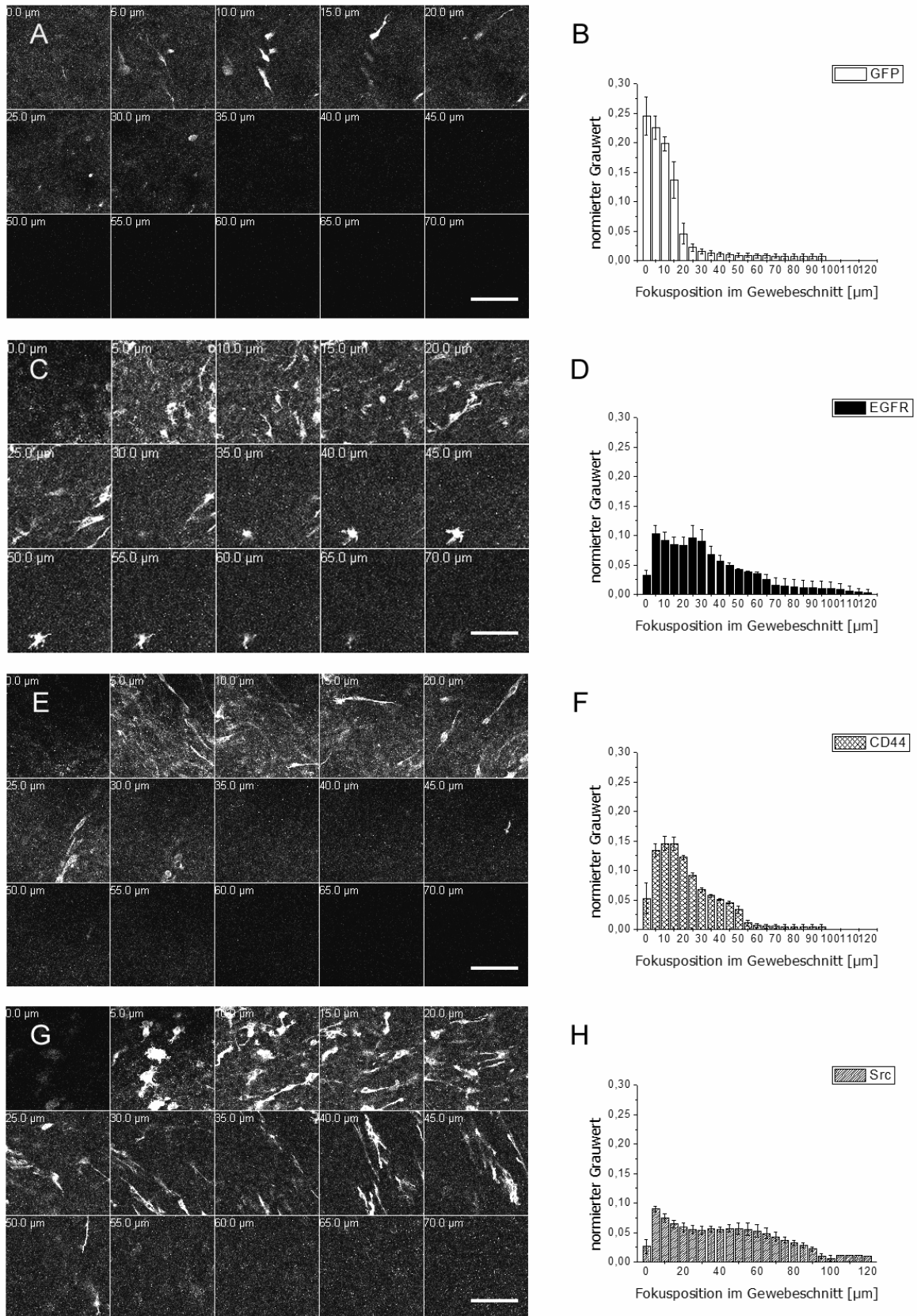
#### Abbildung 28: Lokalisation von CD44-GFP in Zellfortsätzen transplanteder B35-Zellen

Dargestellt sind konfokale Laser-Scanning-Aufnahmen von (CD44)-GFP-überexprimierenden B35-Zellen, welche transplanted wurden. Diese wurden transient transfiziert und *in vitro* auf P9 Rattenhippocampuschnitte transplanted. Nach drei Tagen wurden diese fixiert und anschließend mit einem LSM 510-META mikroskopiert. Dabei wurden *stack*-Aufnahmen in einem Abstand von 0,5 µm angefertigt.

Abbildung (A) zeigt Kontrollzellen, GFP-überexprimierende B35-Zellen (Maßstabsbalken = 10 µm). In (B) sind CD44-GFP-überexprimierende B35-Zellen zu sehen (Maßstabsbalken = 10 µm). (C) stellt eine dreidimensionale Rekonstruktion der CD44-GFP-überexprimierenden Zellen aus (B) dar. Diese wurde von Dr. M. Hans aus dem Institut für Physiologie II in Bonn mittels AutoVisulize + AutoDeblur bearbeitet ( $\gamma = 1,1$ ). Der Maßstabsbalken beträgt 15 µm. Die weißen Pfeile in (B) und (C) zeigen auf dieselben CD44-GFP-reichen Zellfortsätze. Die blauen Pfeile in (C) deuten auf weitere Strukturen dieser Art.

Zusammenfassend zu den vorangegangenen Untersuchungen kann festgehalten werden, dass alle Fusionskonstrukte eine vermehrte Ausbildung von motilen Strukturen der transplantierten B35-Zellen zur Folge hatten.

Aus diesem Grunde wurde anschließend die Invasionsfähigkeit der Zellen nach Kandidatengen-Überexpression untersucht. Dazu wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie die Eindringtiefe der Zellen ins Gewebe nahe der Transplantationsstelle ausgewertet. Als objektive Analyse wurde beim ersten Experiment die Grauwertberechnung, wie in 3.2.11.2.2 beschrieben, durchgeführt. In Abbildung 29 ist zu erkennen, dass aus der Überexpression aller Kandidatengene im Vergleich zur GFP-Kontrolle eine Invasionssteigerung resultierte. Nicht nur die exemplarisch dargestellten *stack*-Aufnahmen verifizieren dies (s. Abbildung 29A, C, E, F), auch die z-Abhängigkeit der durch unabhängige Berechnungen normierten Grauwerte von jeweils fünf *stacks* verifizierten diese Beobachtungen (s. Abbildung 29B, D, F, G). Durch die normierte Darstellung sind auf diese Weise Vergleiche der diversen Bedingungen zulässig. Die Gegenüberstellungen der Grauwertdiagramme zwischen der Kontrolle (s. Abbildung 29B) und den Kandidatengen-GFP-überexprimierenden Zellen (s. Abbildung 29D, F, H) stellt durch unterschiedliche Kurvenverläufe dar, dass die zuletzt genannten Zellen invasiver waren. Während sich bei der Kontrolle ein deutliches Maximum der normierten Grauwerte nahe der Gewebeoberfläche zeigt (*ca.* 10  $\mu\text{m}$  Eindringtiefe), verlaufen die Kurven der restlichen Untersuchungen eher flacher. Dies spiegelt ein stärkeres Eindringen der Zellen in die Tiefe des Gewebes wider.

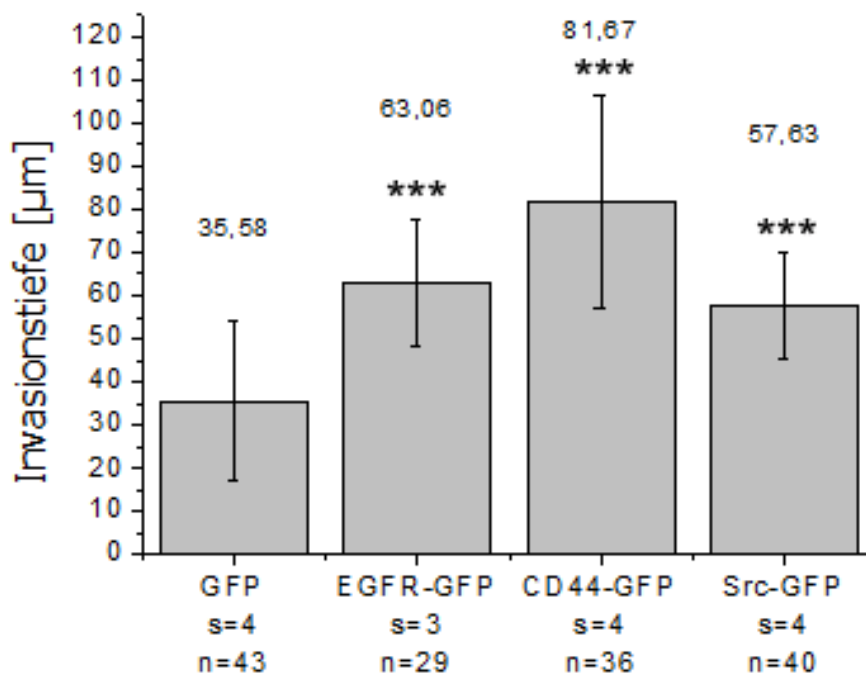


**Abbildung 29: Invasionstiefenverteilungen von Kandidatengen-überexprimierenden B35-Zellen**  
 Dargestellt sind repräsentative Beispiele für die Ermittlung der Invasionstiefe über die Grauwertberechnung (s. 3.2.11.2.2) aus einem Experiment. Transient transfizierte B35-Zellen wurden *in vitro* auf P9 Rattenhippocampuschnitte transplantiert. Nach drei Tagen wurden diese fixiert und mit einem anti-GFP Antikörper (ab290) gegengefärbt (s. 3.2.11.1).

An der Transplantationsstelle wurden *z-stacks* konfokaler Laser-Scanning-Aufnahmen in einem Abstand von je 5  $\mu\text{m}$  in das Gewebe hinein gemacht (linke Spalte, Maßstabsbalken betragen 20  $\mu\text{m}$ ). Die erste Aufnahme wurde jeweils an der Oberfläche des Schnittes aufgenommen. Die berechneten normierten Grauwerte (rechte Spalte) ergeben sich aus den Mittelwerten der Grauwerte von fünf an der Transplantationsstelle kreuzförmig angeordneten Schichtaufnahmen (s. Abbildung 10). Als Fehlerbalken sind die Standardabweichungen der Werte dargestellt.

Die transplantierten B35-Zellen überexprimierten GFP (A & B), EGFR-GFP (C & D), CD44-GFP (E & F) und Src-GFP (G & H). Nach allen Kandidatengen-Überexpressionen waren auch in den tieferen Gewebeschichten deutlich höhere Grauwerte als bei der Kontrolle (GFP-Überexpression) zu verzeichnen.

Zur Verifizierung der positiven Resultate wurde das Sliceexperiment mit den B35-Zellen wiederholt. Auch die zusammengefassten Werte beider Versuche der Auswertung über die am tiefsten ins Gewebe eingedrungenen Zellen (s. 3.2.11.2.1) ergaben, dass alle Kandidatengen-überexpressionen eine statistisch höchst signifikante Invasionssteigerung bewirkten (s. Abbildung 30).



**Abbildung 30: Maximale Invasionstiefe von Kandidatengen-überexprimierenden B35-Zellen**

Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Werte der invasivsten B35-Zellen nach diversen Kandidatengen-Überexpressionen (s. Beschriftung der x-Achse). Transient transfizierte B35-Zellen wurden *in vitro* auf P9 Rattenhippocampusschnitte transplantiert. Nach drei Tagen wurden diese fixiert und mit einem anti-GFP Antikörper (ab290) gegengefärbt (s. 3.2.11.1). An der Transplantationsstelle wurden *z-stacks* konfokaler Laser-Scanning-Aufnahmen mit einem Abstand von je 5  $\mu\text{m}$  in das Gewebe hinein gemacht. Die erste Aufnahme wurde jeweils an der Oberfläche des Schnittes aufgenommen. In die Berechnungen flossen die Invasionstiefen [ $\mu\text{m}$ ] der jeweils am weitesten in das Gewebe eingedrungenen grünfluoreszierenden Zelle ein.



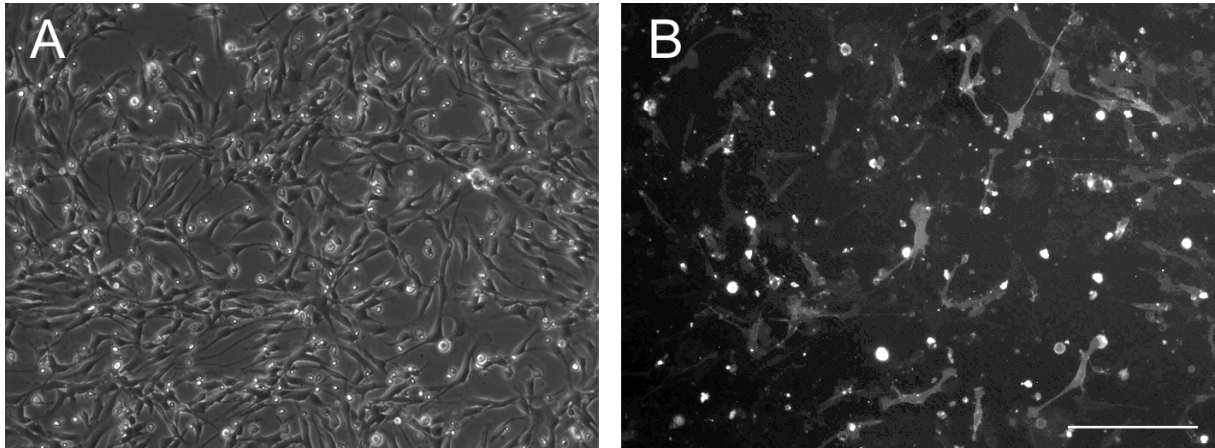
Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Werte gehen aus zwei Transplantationsexperimenten hervor. „s“ gibt die Anzahl der untersuchten Schnitte und „n“ die Summe der untersuchten *stacks* an. Nach dem t-Test sind die Bedingungen mit  $p^{***}<0,001$  statistisch höchst signifikant invasiver als die Kontrolle (mit pEGFP-C2 transfizierte Zellen). Alle Überexpressionen bewirkten im Vergleich zu der Kontrolle eine Invasionssteigerung der transfizierten B35-Zellen ins hippocampale Gewebe.

Zusammenfassend zu den Sliceexperimenten mit den B35-Zellen konnte festgestellt werden, dass neben der Überexpression der Positivkontrolle, EGFR-GFP, auch die Überexpression von CD44-GFP und Src-GFP in einer Invasionssteigerung im Vergleich zur Kontrolle mit der GFP-Überexpression resultierte. Diese Ergebnisse gingen aus zwei unterschiedlichen Analysemethoden hervor. Zusätzlich wiesen alle Kandidatengen-GFP-überexprimierenden B35-Zellen vermehrt motile Strukturen im Gewebe auf.

#### **4.2.3 Zellinvasionsexperimente mit glialen Vorläuferzellen (N3EFL-Zellen)**

Nach der Invasionssteigerung der B35-Zellen durch die Überexpression der relevanten Kandidatengene sollten die Auswirkungen dieser auch auf die glialen Vorläuferzellen ermittelt werden.

Zunächst wurde die Transfektion der N3EFL-Zellen optimiert, um eine möglichst hohe Effizienz zu erhalten. Die bei den Neuroblastomzellen angewandte Transfektionstechnik mit ExGen 500 hatte bei den glialen Vorläuferzellen eine für die Transplantation ungenügende Transfektionseffizienz zur Folge. Nach Transplantation von auf diese Weise transfizierten N3EFL-Zellen, konnten anschließend keine fluoreszierenden Zellen im Gewebe wieder gefunden werden. Aus diesem Grunde wurde die Nucleofektion mittels Amaxa zur Transfektion der N3EFL-Zellen vor der Transplantation herangezogen. In Abbildung 31 sind exemplarisch N3EFL-Zellen dargestellt, welche mit dem Plasmid CD44-pEGFP-N2 mittels Nucleofektion transfiziert wurden. Nach optischer Beurteilung ist zu erkennen, dass die Nucleofektion (s. Abbildung 31) eine gute Transfektionseffizienz zur Folge hatte. Die durch Nucleofektion transfizierten N3EFL-Zellen konnten nach der Transplantation mikroskopisch im Gehirngewebe detektiert werden. Folglich ermöglichte die Transfektion der N3EFL-Zellen mittels Amaxa die Untersuchungen des Einflusses von Expressionskonstrukten auf das invasive Wachstum in das Gehirngewebe. Somit konnten die Transplantationsversuche mit den glialen Vorläuferzellen unter Bedingungen durchgeführt werden, die den *in vivo* Verhältnissen ähnlich waren.

**Abbildung 31: Verbesserung der Transfektionseffizienz bei N3EFL-Zellen durch Nucleofektion**

Dargestellt sind die Resultate der Nucleofektion bei den N3EFL-Zellen. Zu sehen ist das Phasenkontrast- (A) und das Fluoreszenzbild (B). Der Maßstabsbalken beträgt 200  $\mu\text{m}$ .

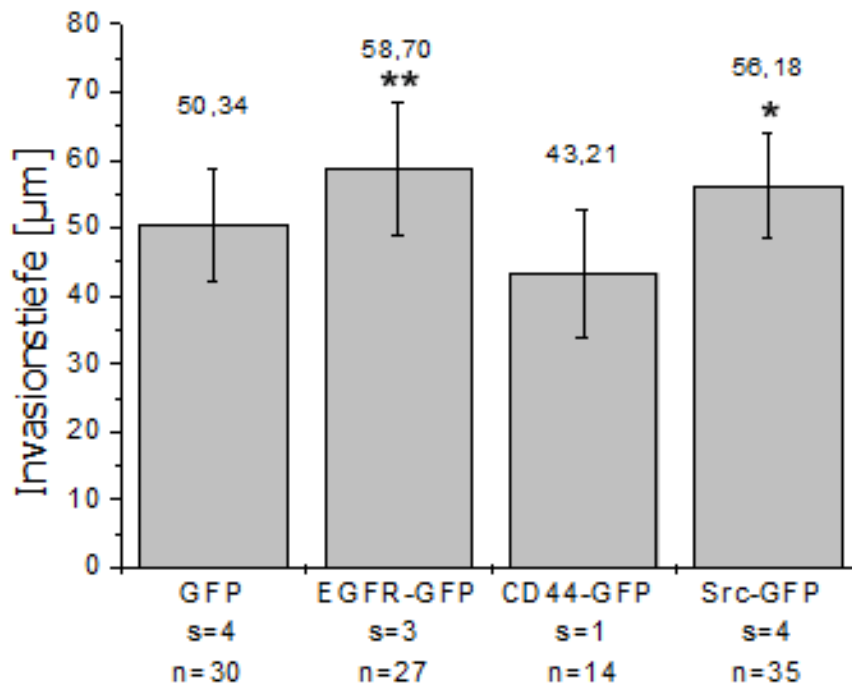
In dem repräsentativen Beispiel wurde CD44-GFP überexprimiert. Die Abbildungen zeigen die Zellen einen Tag nach der Nucleofektion mit Amaxa in einer 10 cm-Kulturschale. Die Zellen wurden mit 18  $\mu\text{g}$  DNA in Puffer V unter Verwendung des Amaxa-programmes A-030 transfiziert und anschließend in N2-Medium überführt (s. 3.2.7.2).

Auch in diesem Fall wurden die Fusionskonstrukte EGFR-GFP, als Positivkontrolle, CD44-GFP und Src-GFP, als relevante Kandidatengene, sowie GFP, als Kontrolle, überexprimiert. Bei dieser Zelllinie konnten, wie bei den B35-Zellen (s. Abbildung 26) weder nach drei noch nach fünf Tagen Unterschiede der horizontalen Migration im Gewebe verzeichnet werden<sup>11</sup>.

Die Invasionstiefe der N3EFL-Zellen ins Gewebe wurde über die Ermittlung der am weitesten ins Gewebe eingedrungenen Zellen überprüft (s. Abbildung 32).

---

<sup>11</sup> Daten nicht gezeigt.



**Abbildung 32: Maximale Invasionstiefe von Kandidatengen-überexprimierenden N3EFL-Zellen**

Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Werte der invasivsten N3EFL-Zellen nach diversen Kandidatengen-Überexpressionen (s. Beschriftung der x-Achse). Transient transfizierte N3EFL-Zellen wurden *in vitro* auf P9 Rattenhippocampusschnitte transplantiert. Nach drei Tagen wurden diese fixiert und mit einem anti-GFP Antikörper (ab290) gegengefärbt (s. 3.2.11.1). An der Transplantationsstelle wurden z-stacks konfokaler Laser-Scanning-Aufnahmen in einem Abstand von je 2,5 µm in das Gewebe hinein gemacht. Die erste Aufnahme wurde an der Oberfläche des Schnittes vorgenommen. In die Berechnungen flossen die Invasionstiefen [µm] der jeweils am weitesten in das Gewebe eingedrungenen grünfluoreszierenden Zelle ein. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Werte gehen aus einem Transplantationsexperiment hervor. Dabei gibt „s“ die Anzahl der untersuchten Schnitte und „n“ die Summe der untersuchten stacks an. Nach dem t-Test sind die Bedingungen mit  $p^* < 0,05$ ;  $p^{**} < 0,01$  statistisch signifikant invasiver als die Kontrolle (mit pEGFP-C2 transfizierte Zellen). Die Überexpressionen mit EGFR-GFP und Src-GFP bewirkten eine Invasionssteigerung der N3EFL-Zellen ins hippocampale Gewebe im Vergleich zu der Kontrolle.

Im Falle der glialen Vorläuferzellen konnte mittels des Sliceinvasionsassays festgestellt werden, dass eine Überexpression von EGFR-GFP, sowie des Kandidatengens Src-GFP im Vergleich zur Kontrolle die Invasionsfähigkeit statistisch signifikant steigerte. Diese Effekte waren jedoch kleiner als bei den B35-Neuroblastomzellen. CD44-GFP förderte das invasive Wachstum der N3EFL-Zellen nicht.

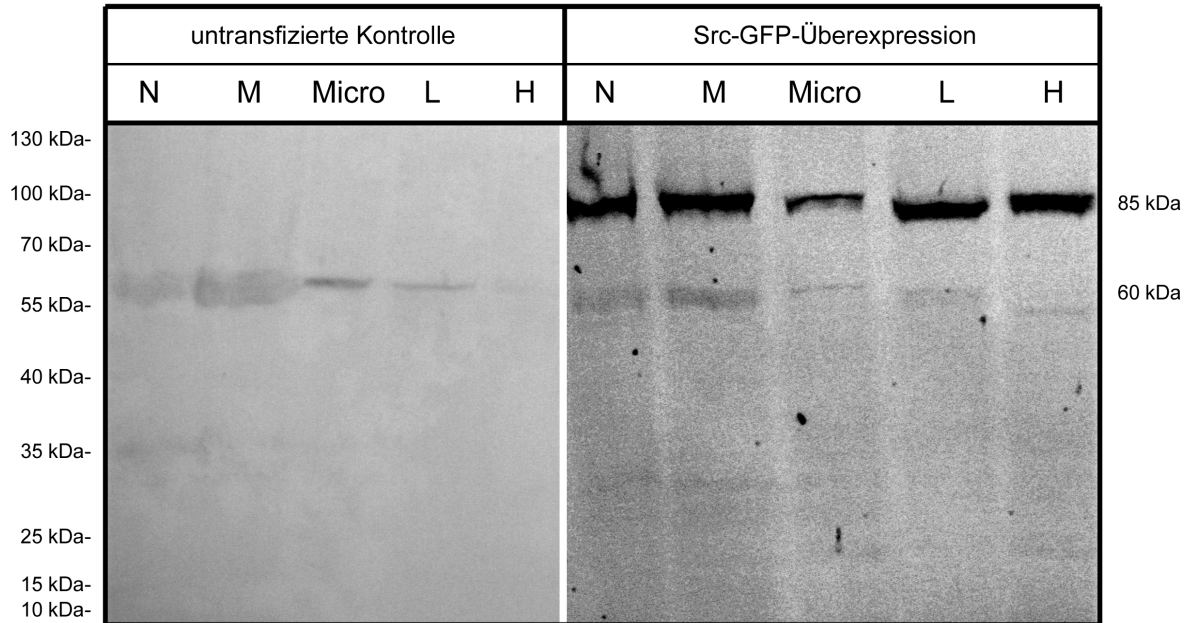
### **4.3 Weitere Charakterisierung migrations- und invasionsfördender Kandidatengene**

Zur Interpretation der Resultate (s. 5.3) der Migrations- (s. 4.1) und Invasionsstudien (s. 4.2) war es notwendig, die endogene Expression von Src und CD44 bei den B35-Zellen und den N3EFL-Zellen zu überprüfen (s. 4.3.1). Über die Untersuchungen der Zellmorphologie *in vivo* hinaus, sollten auch die Veränderungen der Phänotypen Kandidatengen-überexprimierender Zellen *in vitro* (s. 4.3.2) untersucht werden.

Auch die Auswirkungen der Überexpression der Kandidatengene auf die Differenzierung oder Proliferation der glialen Vorläuferzellen waren relevant, um die Effektivität einer Zellersatztherapie abschätzen zu können (s. 4.3.3).

#### **4.3.1 Endogene Expression von Src und CD44**

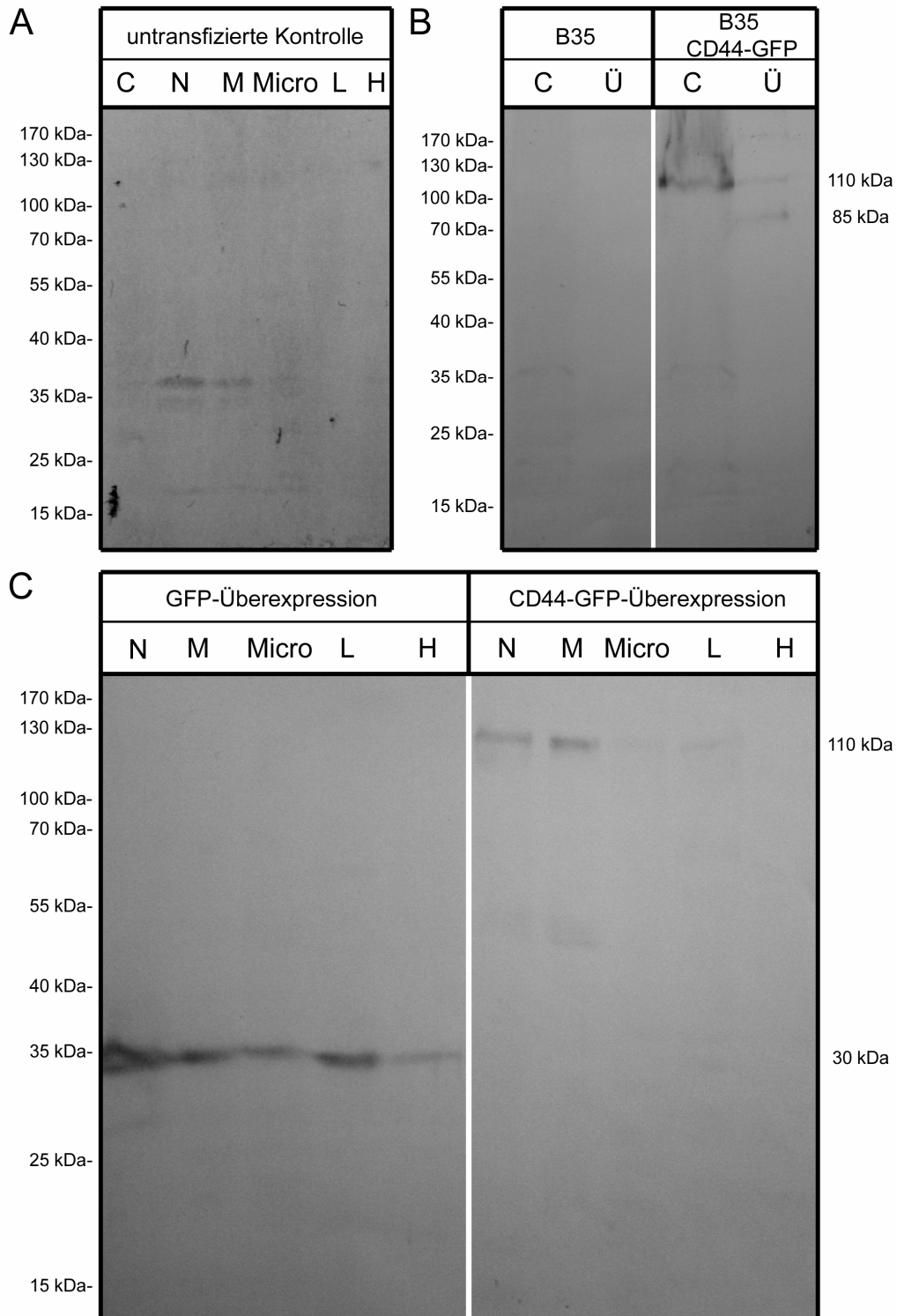
Die endogene Expression der entsprechenden Proteine wurde mittels Western Blot analysiert. Als Positivkontrollen dienten bei diesen Experimenten immer Kandidatengen-GFP-überexprimierende Zellen. Die Zellen wurden mittels Nucleofektion transient transfiziert (s. 3.2.7.2). Untersucht wurde das Vorhandensein der relevanten Kandidatengene CD44 und Src. Zunächst wurden die Analysen an B35-Zellen durchgeführt (s. Abbildung 33 und Abbildung 34).



**Abbildung 33: Western Blot Analyse von Src (-GFP) in B35-Zellen**

Dargestellt ist die Western Blot Analyse von endogener Src und transient überexprimierter Src-GFP in B35-Zellen. Die einzelnen Fraktionen wurden durch Zentrifugation getrennt, die Proteine durch SDS-PAGE separiert und anschließend geblottet. Der *blot* wurde mit dem Antikörper AHO1152 (anti-Src) behandelt und ggf. vorhandene Banden mittels der Alkalischen Phosphatasereaktion sichtbar gemacht.

Über den einzelnen Bahnen sind die aufgetragenen Fraktionen beschrieben (N = Zellkerne, M = Membranfraktion, Micro = Mikrosomen, L = lösliche Fraktion, H = hypotoner Wasch; s. 3.4.2). Links sind die Positionen des Molekularmarkers in kDa indiziert. Rechts werden die ungefähren Größen der detektierten relevanten Banden in kDa angegeben.



**Abbildung 34: Western Blot Analyse von CD44 (-GFP) in B35-Zellen (mit anti-CD44 (A, B) und anti-GFP (C))**

Dargestellt ist die Western Blot Analyse von endogenem CD44 und transient überexprimiertem CD44-GFP und transient überexprimiertem GFP in B35-Zellen. Die einzelnen Fraktionen wurden durch Zentrifugation getrennt, die Proteine durch SDS-PAGE separiert und anschließend geblottet. Der *blot* wurde mit den Antikörper IM7 (anti-CD44) oder ab290 (anti-GFP) inkubiert und ggf. vorhandene Banden mittels der Alkalischen Phosphatasereaktion sichtbar gemacht.

Über den einzelnen Bahnen sind die aufgetragenen Fraktionen beschrieben (s. 3.4.2, C = Gesamtzellysat, Ü = Überstand). Bei den einzelnen *blots* sind links die Positionen des Molekularmarkers in kDa indiziert. Rechts der *blots* werden die ungefähren Größen der detektierten relevanten Banden in kDa angegeben.

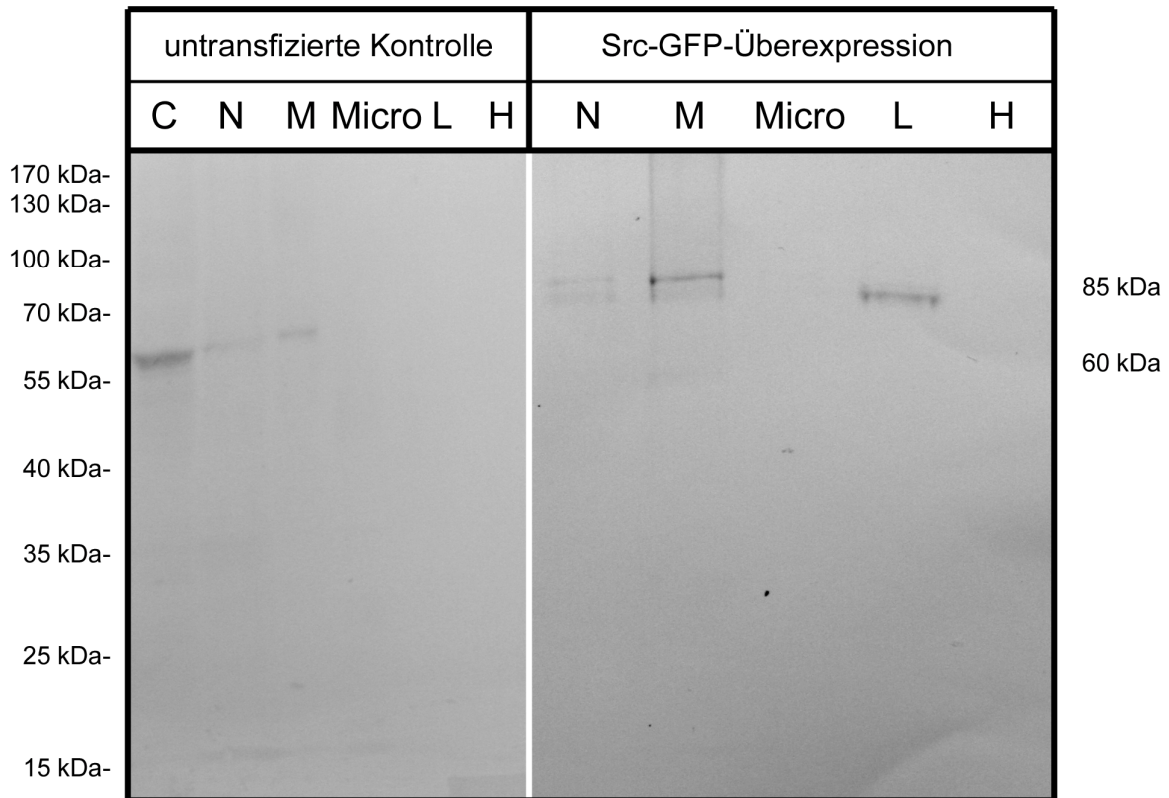
(A) zeigt einen Western Blot nach einer subzellulären Fraktionierung von B35-Zellen mit dem IM7-Antikörper. In (B) wurde derselbe Antikörper verwendet, um eine Western Blot Analyse von B35-Zellen und CD44-GFP-überexprimierenden B35-Zellen anzufertigen. Untersucht wurden die Gesamtzellysate und die Überstände. (C) stellt eine Western Blot Analyse nach einer subzellulären Fraktionierung von B35-Zellen und CD44-GFP-überexprimierenden B35-Zellen dar. Hier wurde der ab290-Antikörper verwendet.

Bei den B35-Zellen konnte eine endogene Expression der Src-Tyrosinkinase in allen Zellfraktionen festgestellt werden (s. Banden auf der Höhe von  $\approx 60$  kDa in Abbildung 33). Eine endogene Expression von CD44 konnte mit dem IM7-Antikörper nicht festgestellt werden, während bei der Positivkontrolle im Gesamtzellysat und im Kulturüberstand Banden der entsprechenden Größe zu sehen waren (s. Banden der Größe  $\approx 110$  kDa  $\approx$  CD44 (85kDa) + GFP (27kDa) in Abbildung 34B). Auch mit dem 5G8-Antikörper wurde keine endogene CD44-Expression detektiert<sup>12</sup>. Eine Western Blot Analyse mit einem GFP-Antikörper verifizierte die Überexpression des Fusionskonstruktes (CD44-GFP) in allen Fraktionen, außer in der hypotonen Waschfraktion (s. Abbildung 34C).

Im Folgenden wurde ebenfalls die endogene Expression von Src und CD44 in den N3EFL-Zellen mittels Western Blot analysiert (s. Abbildung 35 und Abbildung 36).

---

<sup>12</sup> Daten nicht gezeigt.

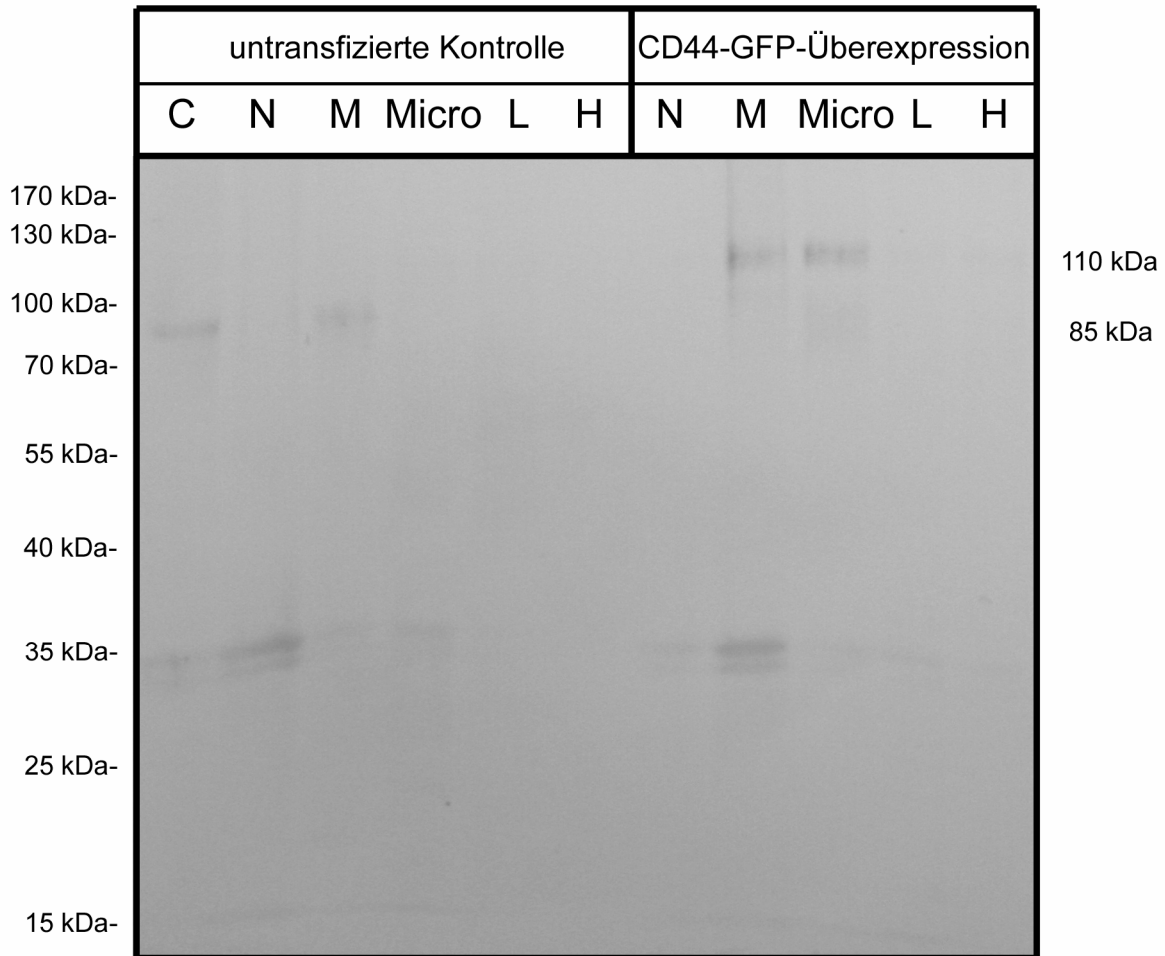


**Abbildung 35: Western Blot Analyse von Src (-GFP) in N3EFL-Zellen**

Dargestellt ist die Western Blot Analyse von endogener Src und transient überexprimierter SRC-GFP in N3EFL-Zellen. Die einzelnen Fraktionen wurden durch Zentrifugation getrennt, die Proteine durch SDS-PAGE separiert und anschließend geblottet. Der *blot* wurde mit dem Antikörper AHO1152 (anti-Src) behandelt und ggf. vorhandene Banden mittels der Alkalischen Phosphatasereaktion sichtbar gemacht.

Über den einzelnen Bahnen sind die aufgetragenen Fraktionen beschrieben (s. 3.4.2). Links sind die Positionen des Molekulargewichtsmarkers in kDa indiziert. Rechts sind die ungefähren Größen der relevanten Banden in kDa angegeben.





**Abbildung 36: Western Blot Analyse von CD44 (-GFP) in N3EFL-Zellen**

Dargestellt ist die Western Blot Analyse von endogenem CD44 und transient überexprimierten CD44-GFP in N3EFL-Zellen. Die einzelnen Fraktionen wurden durch Zentrifugation getrennt, die Proteine durch SDS-PAGE separiert und anschließend geblottet. Der *blot* wurde mit dem Antikörper IM7 (anti-CD44) behandelt und ggf. vorhandene Banden mittels der Alkalischen Phosphatasereaktion sichtbar gemacht.

Über den einzelnen Bahnen sind die aufgetragenen Fraktionen beschrieben (s. 3.4.2). Links sind die Positionen des Molekularmarkers in kDa indiziert. Rechts sind die ungefähren Größen der relevanten Banden in kDa angegeben.

Aufgrund der sichtbaren Banden in Abbildung 35 ( $\approx 60$  kDa) und Abbildung 36 ( $\approx 85$  kDa) konnte festgestellt werden, dass die N3EFL-Zellen sowohl Src, als auch CD44 endogen exprimierten. Dabei wurde endogene Src im Gesamtzelllysate, in der Kern- und in der Membranfraktion detektiert. Die Überexpression der Positivkontrolle, Src-GFP, wurde in der Kern- und der Membranfraktion sowie in der Fraktion der löslichen Proteine gefunden. Endogenes CD44-Protein wurde bei den glialen Vorläuferzellen im Gesamtzelllysate und in der Membranfraktion detektiert. Die Überexpression des Fusionskonstruktes äußerte sich neben einer Bande in der Membranfraktion auch mit einer Bande in der Mikrosomenfraktion.

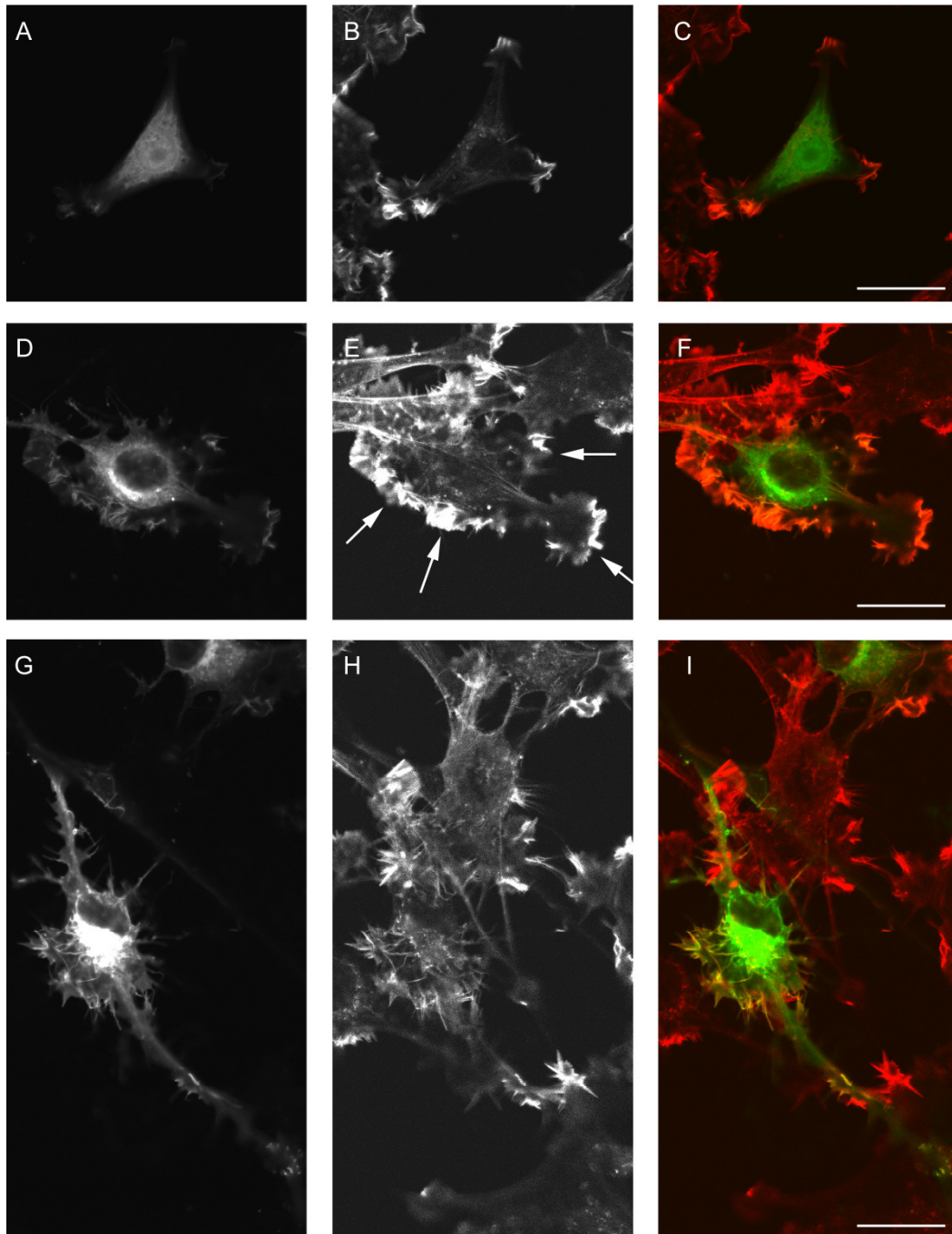
### **4.3.2 Zellmorphologische Veränderung durch Überexpression relevanter Kandidatengene *in vitro***

Durch die Überexpression der GFP-Fusionskonstrukte konnten die transfizierten Zellen optisch von den untransfizierten Zellen durch ihre grüne Fluoreszenz differenziert werden. Somit konnte die Morphologie der betreffenden Zellen mikroskopisch untersucht werden. Von Interesse waren dabei vor allem Zellfortsätze, wie z.B. Filopodien oder Lamellipodien, welche ggf. Hinweise auf die Migrationsfähigkeit der Zellen zuließen.

Bereits Böckenhoff (2008) konnte feststellen, dass eine CD44-GFP-Überexpression in B35-Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Induktion von filopodienartigen Fortsätzen bewirkte. Eine entsprechende Untersuchung sollte auch hinsichtlich des zweiten relevanten Kandidatengens, der Src-Tyrosinkinase, durchgeführt werden.

Diese wurde in B35-Zellen überexprimiert und die Zellen wurden zunächst optisch mit der Kontrolle, GFP-überexprimierenden B35-Zellen, verglichen (s. Abbildung 37). Die vermehrten filopodien- sowie lamellipodienartigen Fortsatzstrukturen der Src-GFP-überexprimierenden B35-Zellen wiesen Src sowie Aktinanreicherungen auf (s. Abbildung 37). Über die Aktin- und Src-reichen Zellfortsätze hinaus exprimierten die Zellen das Fusionsprotein ebenfalls in der Nähe des Zellkerns (s. Abbildung 38). Während in Kernnähe lokalisiertes Src-GFP nicht mit einem Src-Antikörper anfärbbar war, war dies für Src-GFP in den Zellfortsätzen möglich. Aufgrund der Lokalisation des Proteins und den Aktinanreicherungen in den Zellfortsätzen wurde quantitativ überprüft, ob die Src-Überexpression einen Einfluss auf die Bildung von filopodienartigen Zellfortsätzen hatte.

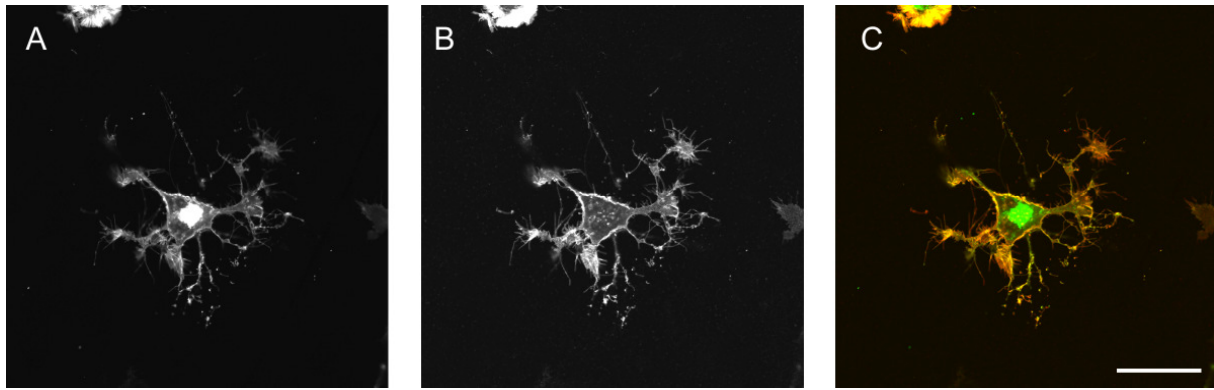
Dazu wurden die Neuroblastomzellen mit pEGFP-C2 oder Src-pEGFP-N1 transient transfiziert und das F-Aktin mit Phalloidin-TRITC gegengefärbt. Zusätzlich wurde der Einfluss einer Stimulation mit EGF überprüft. Pro Bedingung wurden jeweils die Fortsätze von fünf Zellen mittels des Makros NeuronJ der Software ImageJ ausgemessen. Die Anzahl und die Länge dieser Zellstrukturen wurden anhand der F-Aktinfärbung grünfluoreszierender Zellen ermittelt und die Unterschiede mittels t-Test auf die statistische Signifikanz hin überprüft (s. Abbildung 39).



### Abbildung 37: Morphologie nach Src-GFP-Überexpression in B35-Zellen

Dargestellt sind konfokale Laser-Scanning-Aufnahmen von verschiedenen behandelten B35-Zellen. Die linke Spalte stellt die Verteilung von GFP (A) bzw. Src-GFP (D, G) dar. In der mittleren Spalte sind F-Aktin-Färbungen mit Phalloidin-TRITC zu sehen. Die rechte Spalte stellt die farbige Überlagerung der beiden Fluoreszenzfärbungen dar (grün: GFP-Fluoreszenz, rot: Phalloidin-TRITC).

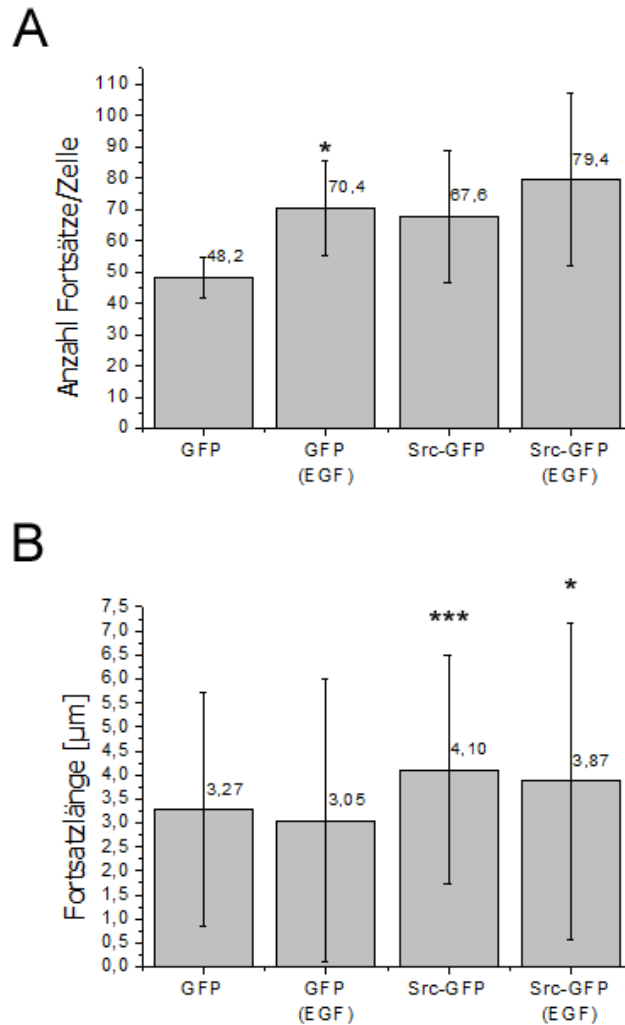
Die B35-Zellen wurden in 24-well-Kulturschalen auf Deckgläsern in DMEM/F12 mit 10 % FCS ausgesät, am folgenden Tag in serumfreiem Medium mit 0,5 µg DNA und 1,65 µl ExGen 500 pro Kavität transient transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion und serumfreier Kultivierung erfolgte die Fixierung mit PFA. Anschließend wurden die Präparate mit DAPI und Phalloidin-TRITC gegengefärbt. In (A-C) sind GFP-überexprimierende (grüne Fluoreszenz) B35-Zellen nach einer Phalloidin-TRITC-Gegenfärbung (rote Fluoreszenz) dargestellt. Der Maßstabsbalken beträgt 20 µm. Die B35-Zellen in (D-F) und (G-I) überexprimieren Src-GFP (grüne Fluoreszenz) und wurden ebenfalls mit Phalloidin-TRITC (rote Fluoreszenz) gegengefärbt. Die Pfeile in (E) zeigen auf F-Aktin-reiche Zellfortsätze. Die Maßstabsbalken stellen 20 µm dar.

**Abbildung 38: Immunfluoreszenzfärbung von Src-GFP-überexprimierenden B35-Zellen**

Dargestellt sind konfokale Laser-Scanning-Aufnahmen von immunfluoreszenzgefärbten Src-GFP-überexprimierenden B35-Zellen.

(A) stellt die Verteilung von Src-GFP dar. In (B) ist die anti-Src-Färbung zu sehen. (C) stellt die farbige Überlagerung der beiden Fluoreszenzfärbungen dar. (grün: GFP-Fluoreszenz, rot: Cy3-gekoppelter Src-Antikörper).

Die B35-Zellen wurden in 24-well-Kulturschalen auf Deckgläsern in DMEM/F12 mit 10 % FCS ausgesät, am folgenden Tag in serumfreiem Medium mit 0,5 µg DNA und 1,65 µl ExGen 500 pro Kavität transient transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion und serumfreier Kultivierung erfolgte die Fixierung mit PFA. Anschließend wurden die Präparate mit DAPI gegengefärbt und immunzytochemisch behandelt. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit dem AH01152-Antikörper (anti-Src) nach dem Standardprotokoll (s. 3.2.9.1). Der Sekundärantikörper war mit Cy 3 markiert. Der Maßstabsbalken beträgt 30 µm.



### Abbildung 39: Zellfortsatzinduktion nach Src-GFP-Überexpression in B35-Zellen

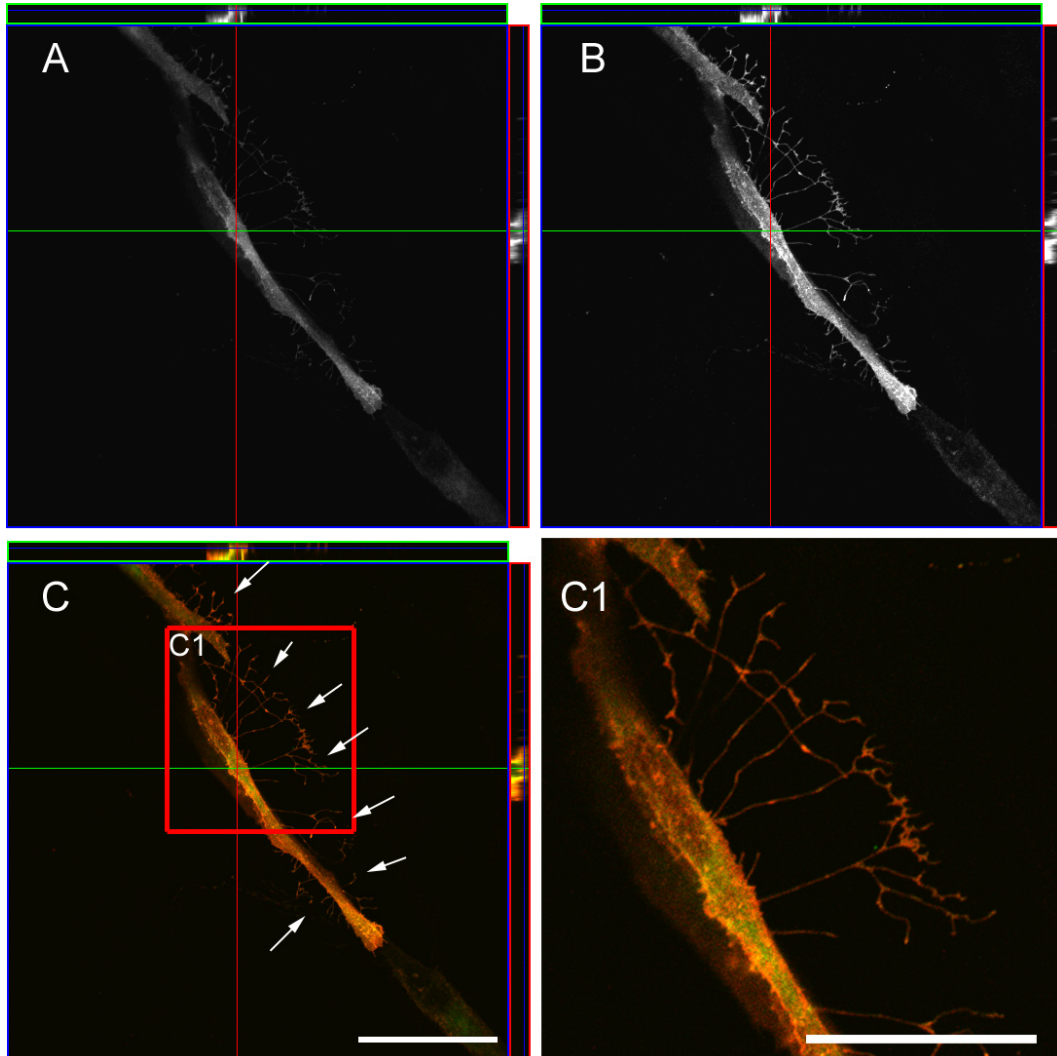
Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl sowie der Länge von Fortsätzen verschieden behandelter B35-Zellen. Diese überexprimierten entweder GFP oder Src-GFP und wurden teilweise mit „EGF“ inkubiert (s. X-Achsenbeschriftung). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Werte.

Die B35-Zellen wurden in 24-well-Kulturschalen auf Deckgläsern in DMEM/F12 mit 10 % FCS ausgesät, am folgenden Tag in serumfreiem Medium mit 0,5 µg DNA und 1,65 µl ExGen 500 pro Kavität transient transfiziert. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel zu erneut serumfreiem DMEM/F12 mit oder ohne 20 ng/ml EGF (s. X-Achsenbeschriftung). Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Fixierung mit PFA. Anschließend wurden die Präparate mit DAPI und Phalloidin-TRITC gegengefärbt und mikroskopiert. Pro Bedingung wurden mittels NeuronJ die Längen und die Anzahl der Fortsätze von jeweils fünf Zellen ermittelt. Dabei wurden die phalloidingefärbten Fortsätze grünfluoreszierender Zellen berücksichtigt.

Die Balken in (A) repräsentieren die entsprechenden Daten für die Anzahl der Fortsätze pro Zelle. In (B) sind die Resultate der Längenmessungen der Fortsätze graphisch dargestellt. Nach dem t-Test sind die Bedingungen mit  $p^* < 0.05$  und  $p^{***} < 0.001$  gegenüber der Kontrolle (GFP-Überexpression) statistisch signifikant.

Die Src-GFP-Überexpression hatte eine statistisch höchst signifikante Erhöhung der Länge der filopodienartigen Fortsätze zur Folge. Eine EGF-Zugabe hob in jedem Fall die Anzahl an, hatte aber keinen Einfluss auf die Länge der Fortsätze.

Auch bei den glialen Vorläuferzellen konnte Src-GFP in Fortsatzstrukturen nachgewiesen werden (s. Pfeile in Abbildung 40C und Abbildung 40C1). Diese standen seitlich vom Zellkörper ab.



**Abbildung 40: Zellfortsätze nach Src-GFP-Überexpression in N3EFL-Zellen**

Dargestellt ist ein *z-stack* konfokaler Schnitte durch eine Src-GFP-überexprimierende (grüne Fluoreszenz) und gleichzeitig immunfluoreszenzgefärbten (rote Fluoreszenz) N3EFL-Zelle.

Die glialen Vorläuferzellen wurden in 24-well-Kulturschalen mit Deckgläschen in N2-Medium ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Zwei Tage später wurden die N3EFL-Zellen mit 1 µg DNA und 3,3 µl ExGen 500 transient transfiziert und einen weiteren Tag später mit PFA fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit dem AH01152-Antikörper (anti-Src) nach dem Standardprotokoll (s. 3.2.9.1). Der Sekundärantikörper war Cy 3-gekoppelt. Es wurden *z-stacks* im Abstand von 2,0 µm aufgenommen.

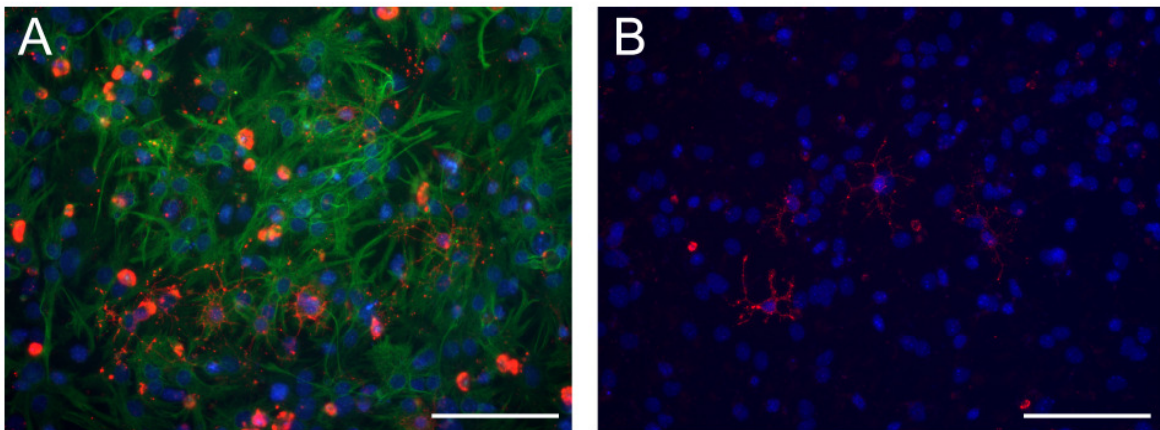
In (A) ist die Src-GFP-Überexpression der Zelle dargestellt. (B) repräsentiert das Resultat der Immunfluoreszenzfärbung und (C) zeigt die Überlagerung beider Fluoreszenzen.

Die Pfeile zeigen auf Src-angereicherte seitliche Fortsätze der Zelle. Der Maßstabsbalken beträgt 20 µm. (C1) stellt die Vergrößerung des roten Rahmens aus (C) dar. Der Maßstabsbalken beträgt 50 µm.

### 4.3.3 Differenzierungs- und Proliferationseinfluss relevanter Kandidatengene

Neben den Resultaten aus den Migrations- und Invasionsstudien sollte die Wirkung der Überexpression von Src-GFP, CD44-GFP und EGFR-GFP auf die Proliferation und Differenzierung der glialen Zellen überprüft werden.

Das Differenzierungspotential wurde, wie von Glaser *et al.* (2007) beschrieben, überprüft. Die Zellen wurden nach dem Erreichen einer annähernd 100 %igen Konfluenz durch Faktorenentzug und T3- sowie AA-Zugabe ausdifferenziert und anschließend wurde eine Markerfärbung durchgeführt (s. 3.2.9.3). Das visuell festgestellte Resultat ergab einen Anteil von ca. 20 % Oligodendrozyten (rote O4-Färbung: s. Abbildung 41A) und ca. 40-50 % Astrozyten (grüne GFAP-Färbung: s. Abbildung 41A). Die rote A2B5-Färbung (s. Abbildung 41B) machte ca. 5% aus.



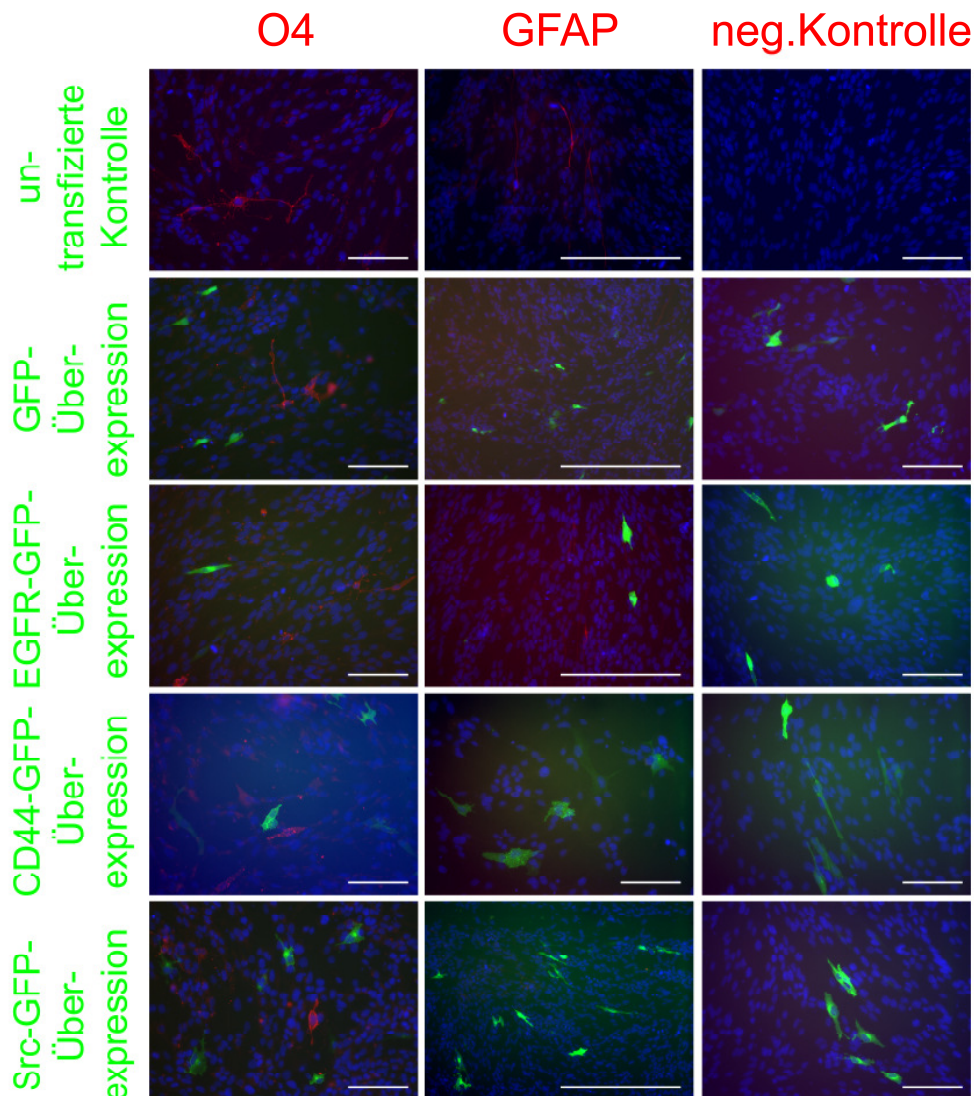
**Abbildung 41: Markerfärbung nach Ausdifferenzierung der glialen Vorläuferzellen**

Dargestellt sind Markerfärbungen von ausdifferenzierten N3EFL-Zellen. Nachdem die N3EFL-Zellen nach Faktorenzugabe (s. 3.2.6.2) eine annähernd 100 %ige Konfluenz in 3 cm-Kulturschalen erreicht hatten, wurden sie, wie in 3.2.6.3 beschrieben, unter Faktorenentzug und T3- sowie AA-Zugabe zum Ausdifferenzieren gebracht. Anschließend folgten die Fixierung mit PFA und Immunfärbungen nach dem Protokoll zur Markerfärbung (s. 3.2.9.3). Die Zellkerne wurden durch eine DAPI-Gegenfärbung sichtbar gemacht (blau).

In (A) ist in grün eine GFAP-Färbung und in rot eine O4-Färbung zu sehen. Die rote Färbung in (B) zeigt A2B5-positive Zellen. Die Maßstabsbalken betragen 100 µm.

Dieses Ergebnis zeigte das erwartungsgemäße Differenzierungspotential der glialen Vorläuferzellen zu O4-, GFAP- und A2B5-positiven Zellen.

Neben dem Effekt der Migrations- oder Invasionssteigerung waren die Auswirkungen der Überexpressionen der einzelnen Kandidatengene auf eine mögliche Differenzierung ebenfalls von Interesse. Aus diesem Grunde wurden die Kandidatengen-GFP-Konstrukte in den Zellen überexprimiert und anschließend Markerfärbungen vorgenommen. Durch die grüne Fluoreszenz der Kandidatengen-exprimierenden Zellen konnten Kolokalisationsstudien mit den Markerfärbungen (rot) gemacht werden (s. Abbildung 42 und Abbildung 43).



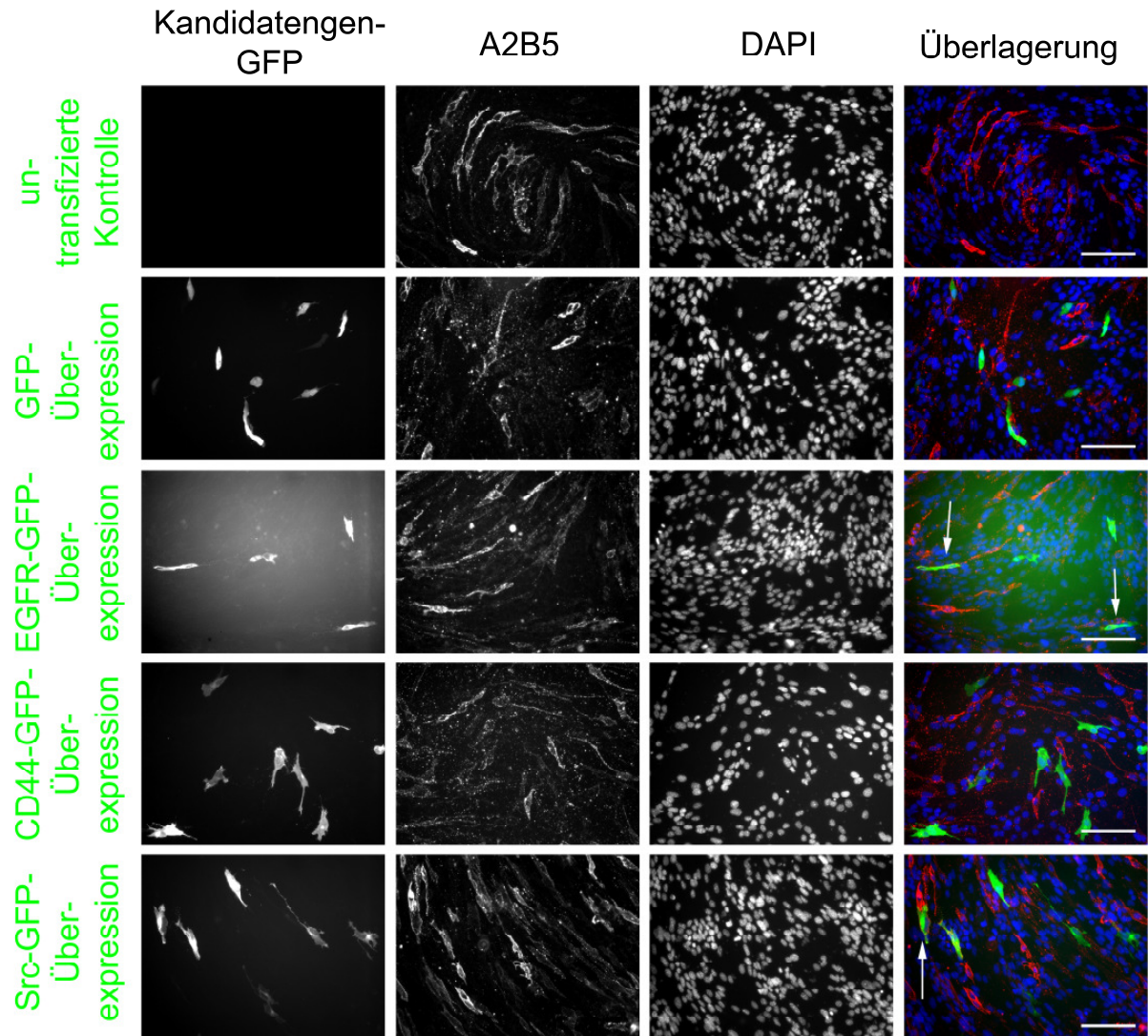
**Abbildung 42: Markerfärbung nach Überexpression der Kandidatengene**

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen Kandidatengen-GFP-überexprimierender (grüne Fluoreszenz) und gleichzeitig immunfluoreszenzgefärbter (rote Fluoreszenz) N3EFL-Zellen. Die glialen Vorläuferzellen wurden in 3 cm-Kulturschalen in N2-Medium ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert.



Zwei Tage später wurden die N3EFL-Zellen mit 3 µg DNA und 9,87 µl ExGen 500 transient transfiziert und einen weiteren Tag später mit PFA fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten nach dem Protokoll für die Markerfärbung (s. 3.2.9.3) mit anschließender DAPI-Gegenfärbung (blau). Der Sekundärantikörper war in allen Fällen Cy 3-gekoppelt. Welche Kandidatengene überexprimiert wurden, ist in grüner Schrift in der linken Spalte aufgeführt und beschreibt die Bedingungen der entsprechenden Reihen. Welche Primärantikörper bei den Immunfluoreszenzfärbungen verwendet wurden, ist in der oberen Reihe in rot beschrieben und repräsentiert alle Färbungen der entsprechenden Spalte. Die Maßstabsbalken betragen 100 µm.

Die Markerfärbung an untransfizierten Zellen erwies, dass die N3EFL-Zellen unter anderem O4-, GFAP- und A2B5-positive Zellen hervorbrachten. Nach jeder (Kandidatengen-)GFP-Überexpression konnten relativ wenige GFAP-positive Zellen ausgemacht werden. Bei den Kolokalisationsstudien (s. Abbildung 42) wurden GFP-überexprimierende Zellen als Negativkontrolle verwendet. Es konnte festgestellt werden, dass die transiente Expression von GFP nicht die Differenzierung der glialen Vorläuferzellen zu Oligodendrozyten oder Astrozyten zur Folge hatte. Dies galt auch für alle Fusionskonstrukte. Eine Kolokalisation des Markers A2B5 für Oligodendrozytenvorläuferzellen (s. 1.1.1.1) konnte bei Zellen festgestellt werden, welche Src-GFP oder EGFR-GFP überexprimierten. Diese Kolokalisationen sind in Abbildung 43 durch weiße Pfeile markiert.

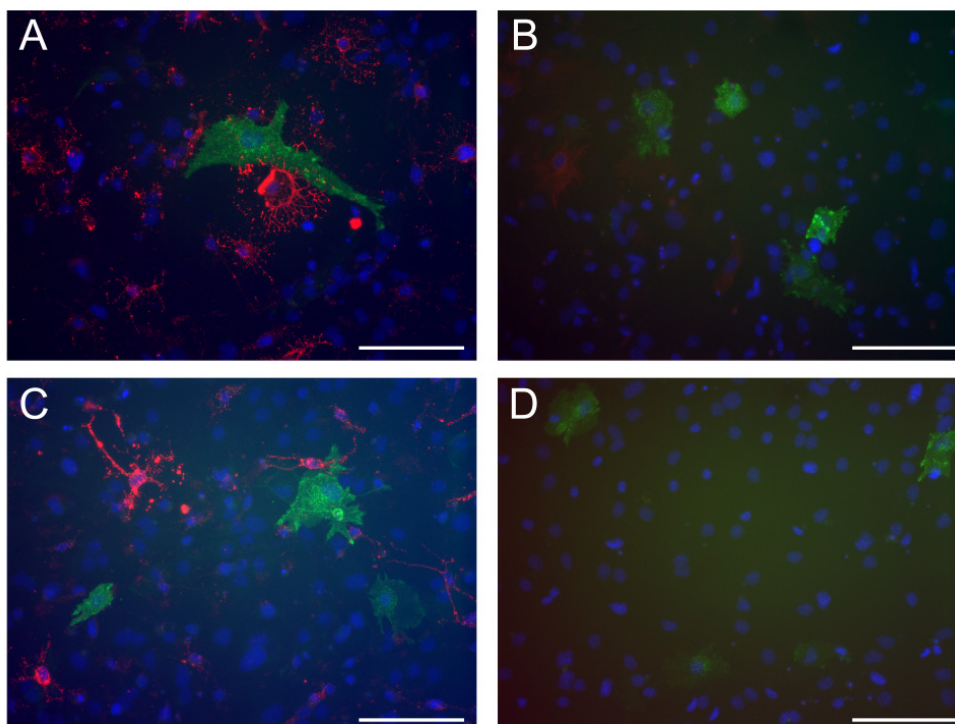


**Abbildung 43: Kolokalisation von A2B5 und EGFR oder Src in N3EFL-Zellen**

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen Kandidatengen-GFP-überexprimierender (grüne Fluoreszenz) und gleichzeitig A2B5-immunfluoreszenzgefärbter (rote Fluoreszenz) N3EFL-Zellen. Die glialen Vorläuferzellen wurden in 3 cm-Kulturschalen in N2-Medium ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Zwei Tage später wurden die N3EFL-Zellen mit 3 µg DNA und 9,87 µl ExGen 500 transient transfiziert und einen weiteren Tag später mit PFA fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten nach dem Protokoll für die Markerfärbung (s. 3.2.9.3) mit anschließender DAPI-Gegenfärbung (blau). Der Sekundärantikörper war in allen Fällen Cy 3-gekoppelt (rot). Welche Kandidatengene überexprimiert wurden (grün), ist in grüner Schrift in der linken Spalte aufgeführt und beschreibt die Bedingungen der entsprechenden Reihen. Die weißen Pfeile deuten auf Kolokalisationen von Kandidatengen-GFP-Überexpressionen und A2B5-Färbungen hin. Die Maßstabsbalken betragen 100 µm.

Liu *et al.* (2004b) beschreiben, dass Astrozytenvorläuferzellen durch die Expression von CD44 identifiziert werden können und dass CD44 die Differenzierung zu Oligodendrozyten hemmt. Von Interesse war folglich, ob eine CD44-Überexpression bei glialen Vorläuferzellen das Differenzieren zu Astrozyten zur Folge hat und die Differenzierung zu Oligodendrozyten verhindert.

Aus diesem Grunde wurden die Auswirkungen einer CD44-Überexpression mit anschließender Ausdifferenzierung nach Glaser *et al.* (2007) an den N3EFL-Zellen überprüft. Die Zellen wurden folglich transient mit CD44-pEGFP-N2 transfiziert und nach entsprechender Proliferation wurden die Faktoren entzogen, während T3 und AA als Supplemente hinzugefügt wurden (s. 3.2.6.3). Die Resultate sind in Abbildung 44 dargestellt. Eine Kolokalisation mit oder eine vermehrte Differenzierung zu GFAP-positiven Zellen konnte nicht verifiziert werden (s. grünfluoreszierende Zellen in Abbildung 44).



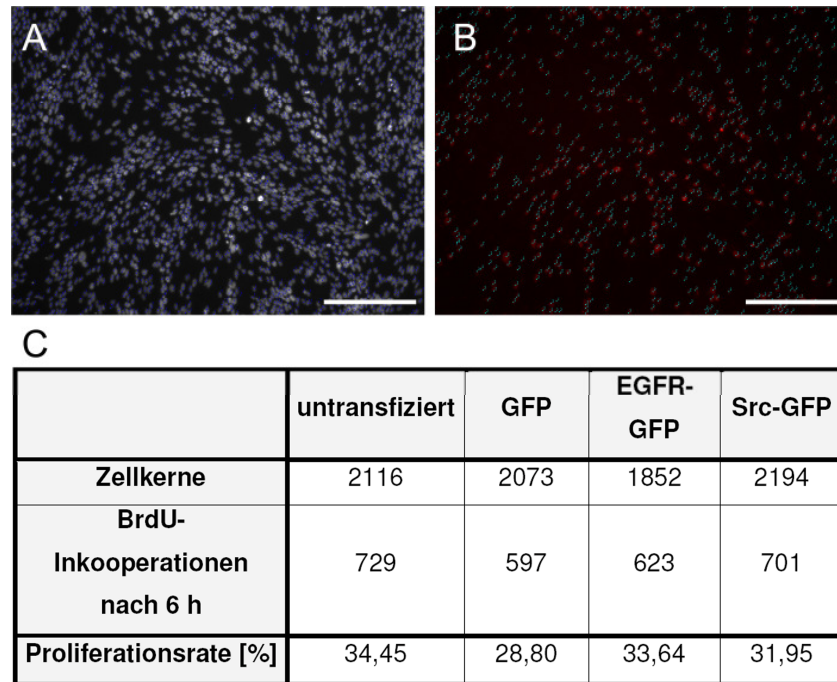
**Abbildung 44: Markerfärbung nach CD44-Überexpression und Faktorentzug**

Dargestellt sind Markerfärbungen (rote Fluoreszenz) von CD44-GFP-überexprimierenden (grüne Fluoreszenz) und ausdifferenzierten N3EFL-Zellen.

Die glialen Vorläuferzellen wurden in 3 cm-Kulturschalen in N2-Medium ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Zwei Tage später wurden die N3EFL-Zellen mit 3 µg DNA und 9,87 µl ExGen 500 transient transfiziert. Nachdem die N3EFL-Zellen durch entsprechende Faktorenzugabe (s. 3.2.6.2) eine annähernd 100 %ige Konfluenz in 3 cm-Kulturschalen erreicht hatten, wurden sie, wie in 3.2.6.3 beschrieben, unter Faktorentzug und T3- sowie AA-Zugabe zum Ausdifferenzieren gebracht. Anschließend folgten die Fixierung mit PFA und Immunfärbungen nach dem Protokoll zur Markerfärbung (s. 3.2.9.3). Die Zellkerne wurden durch eine DAPI-Gegenfärbung sichtbar gemacht (blau). Der Sekundärantikörper war in allen Fällen Cy 3.

In (A) war der Primärantikörper O4, in (B) war es GFAP, in (C) A2B5 und in (D) ist die Negativkontrolle dargestellt. Die Maßstabsbalken betragen 100 µm.

Der Proliferationseinfluss der Überexpression der diversen Kandidatengene wurde, wie in 3.2.9.4 beschrieben, überprüft. Aufgrund des fehlenden Effektes der CD44-GFP-Überexpression auf die Zellmigration (s. 4.1.2.2) und –invasion (s. 4.2.3) der N3EFL-Zellen wurde die Proliferation der CD44-überexprimierenden glialen Vorläuferzellen nicht genauer untersucht. In Abbildung 45 ist exemplarisch die Auswertung untransfizierter Zellen dargestellt.



**Abbildung 45: Proliferationsnachweis mittels BrdU-Färbung**

Dargestellt ist die Quantifizierung der Proliferation mittels Cell Counter bei N3EFL-Zellen nach einer BrdU-Behandlung (s. 3.2.9.4).

Die glialen Vorläuferzellen wurden drei Tage lang nach Standardbedingungen auf 3 cm-Schalen kultiviert. In einem Zeitraum von 6 h vor ihrer Fixierung mit PFA wurden die Zellen mit der BrdU-Stammlösung im Medium (1:1000 = 10µM) inkubiert. Es folgte eine Immunfärbung nach dem Protokoll der BrdU-Färbung (s. 3.2.9.4).

In (A) ist die DAPI-Färbung inklusive der durch Cell Counter entstandenen Markierungen zu sehen. (B) stellt die BrdU Färbung mit den Markierungen von Cell Counter dar. Die Maßstabsbalken betragen 200 µm.

In (C) ist die Proliferationsrate aller untersuchten Bedingungen tabellarisch aufgeführt. In allen Fällen hatten ca. 30 % der Gesamtzellen innerhalb von 6 h proliferiert.

Die mit ExGen 500 transfizierten N3EFL-Zellen wiesen sowohl untransfiziert, als auch nach der Überexpression der angegebenen Kandidatengen-GFP-Konstrukte (s. Abbildung 45C) immer eine ca. 30 %ige Proliferationsrate nach 6 h auf. Somit konnten keine Veränderungen der Mitoserate nach einer transienten Transfektion eruiert werden.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung des Migrations- sowie Invasionspotentials von Zellen, welche für exogene Therapien von zentralem Nervengewebe mit Läsionen, genutzt wurden. Zum Beispiel transplantierten Klein *et al.* (2006) gliale Vorläuferzellen in ein MLD-Mausmodell, ohne dass die Zellen weit von der Transplantationsstelle wegmigrierten.

Durch ein *screening* von Kandidatengenen, welche aus der Literatur als migrations- und/ oder invasionsfördernd bekannt waren, sollten Bedingungen gefunden werden, unter denen die Zellen besser migrieren und invasiver wachsen. Dazu wurden die Kandidatengene transient überexprimiert und die entsprechenden Zellen wurden in Migrations- sowie Invasionsstudien untersucht. Verbesserte Migrations- und/ oder Invasionseigenschaften sollten dazu führen, dass die Zellen nach einer Transplantation ins ZNS sich möglichst weit und homogen im Gewebe verteilen sollten, um so die multifokalen Läsionen des ZNS therapieren zu können.

So wurden nach der Etablierung eines Migrations- sowie eines Invasionsassays drei Kandidatengene (CD44, Src, EGFR) identifiziert, welche nach Überexpression in zwei verschiedenen Zelllinien (B35-Zellen und N3EFL-Zellen) positive Auswirkungen auf die Migrations- und/ oder Invasionsfähigkeit sowie auf die verstärkte Ausbildung motiler Zellstrukturen hatten. Dabei unterschieden sich teilweise die Effekte bei den unterschiedlichen Zelllinien.

### 5.1 Die Zelllinien

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet. Zum einen wurde mit B35-Neuroblastomzellen der Ratte, zum anderen mit den aus ES-Zellen der Maus abgeleiteten glialen Vorläuferzellen, den N3EFL-Zellen, gearbeitet.

Die B35-Zellen dienten als Modell für neurale Vorläuferzellen. Sie stammen aus chemisch induzierten Gehirntumoren der Ratte und wurden bereits bezüglich ihrer Morphologie, Enzym- und Proteinausstattung charakterisiert. Von den B35-Zellen ist bekannt, dass sie eine hohe Migrationsfähigkeit aufweisen (Schubert *et al.* (1974)). Diese neuronale Zelllinie wurde bereits früher schon in *transwell assays* benutzt, um die Migration von neuronalen Vorläuferzellen zu testen (Thelen *et al.* (2002)). Auch Dai *et al.* (2005) zogen diese Zelllinie zur Etablierung ihrer Methode zur Messung der Zellmigration heran. Neben dem migratorischen Potential sind die Zellen auch relativ

einfach zu kultivieren. Sie proliferieren schnell (Verdopplung in ca. 24 h). Eine Transfektion mit ExGen 500 erzielte eine für beide assays ausreichende Transfektionseffizienz (ca. 10 %). Kotransfektionen von Kandidatengenen mit GFP oder die Transfektion mit einem IRES-Vektor erzielten keine ausreichende Transfektionseffizienz (s. Abbildung 12). Mit der ExGen 500 Transfektion konnten mit dieser Zelllinie die Handhabung, sowie die Analysemethoden und die Auswertungen für den Migrationstest und für den Invasionstest etabliert werden. Da es sich bei den B35-Zellen um eine Tumorzelllinie handelt, konnten diese Zellen zwar für die Methodenentwicklung herangezogen werden, eigneten sich aber nicht für die Zellersatztherapie.

Aus diesem Grunde wurden die Versuche ebenfalls mit Zellen durchgeführt, welche für eine Zellersatztherapie eingesetzt werden können. Dies waren die diffiziler zu kultivierenden N3EFL-Zellen aus der Maus. Die N3EFL-Zellen wurden abgeleitet nach einem Protokoll von Okabe *et al.* (1996) und Brüstle *et al.* (1999) aus ES-Zellen zu glialen Vorläuferzellen vordifferenziert. Gliale Vorläuferzellen können migrieren und sich nach einer Transplantation unter anderem in Oligodendrozyten differenzieren, was die Voraussetzung für eine Remyelinisierung ist.

Durch tägliche Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF und durch die Zugabe von Forskolin oder Mediumwechsel sowie rechtzeitige Passagierung wurde ein Ausdifferenzieren der Zellen, was ihre Migrationsfähigkeit erheblich beeinträchtigt hätte, vermieden und die Proliferation (Verdopplung in ca. drei Tagen) gefördert. Nach Lindvall und Kokaia (2006) ist die Voraussetzung für den Einsatz einer Stammzelltherapie, dass die Proliferation und die Differenzierung der Zellen kontrolliert werden können. Das Differenzierungspotential, der in dieser Arbeit verwendeten N3EFL-Zellen, wurde nach Glaser *et al.* (2007) überprüft (s. Abbildung 41) und stand im Einklang mit den veröffentlichten Daten. Die Kandidatengene wurden somit in nachgewiesenermaßen glialen Vorläuferzellen überexprimiert und die so behandelten Zellen konnten in den Migrations- sowie Invasionstests eingesetzt werden.

## 5.2 Der Zellmigrations- und invasionsassay

Die migrations- sowie invasionssteigernden Faktoren sollten durch das *screening* von Kandidatengenomen ermittelt werden.

Dabei sollte das primäre *screening* einen ersten Überblick über die Migrationsfähigkeit der verschieden behandelten Zellen liefern. Dazu musste ein möglichst robuster Test mit hohem Durchsatz gefunden werden, um die zu testenden Bedingungen für die folgenden Invasionsstudien vorab selektionieren zu können. Das sekundäre *screening* sollte dann Auskunft über die Invasivität der positiven Befunde aus den Migrationstests liefern.

### 5.2.1 Das primäre *screening* – die Analyse der Zellmigration

Eine von Dai *et al.* (2005) entwickelte Methode versprach einen hohen Durchsatz von Untersuchungen der Migrationsfähigkeit von Zellen. Dabei wird aus Zeitrafferaufnahmen der RDI durch den Flächenzuwachs von Binärbildern, wie in 3.2.10.1 beschrieben, berechnet. Der in dieser Arbeit angewandte Zellmigrationsassay basierte auf dem Migrationstest, welcher von Dai (2005) in seiner Dissertation erarbeitet wurde. Die Zeitrafferaufnahmen wurden durch die Verwendung einer 96-well- anstatt einer 24-well-Kulturplatte optimiert (s. 4.1.1). Dies versprach einen höheren Durchsatz von Experimenten.

Die verschiedenen GFP-Fusionskonstrukte sollten folglich in den Zellen in 96-well-Kulturschalen transient überexprimiert werden, um Zeitrafferaufnahmen machen und die Analysemethode von Dai *et al.* (2005) anwenden zu können. In initialen Experimenten wurde jedoch festgestellt, dass in diesem Falle diese Methodik lediglich die Inhibition der Migration, jedoch nicht eine Migrationssteigerung ermitteln konnte (s. Abbildung 14). Die basale Migration der Zellen erwies sich auch bei hohen Zelldichten als zu schnell. Die Zellen migrierten teilweise mehrmals über die gleichen Koordinaten oder verließen die Bildebene, wodurch eine Flächenberechnung der zurückgelegten Wege nach Dai *et al.* (2005) nicht die Migrationsfähigkeit der Zellen widerspiegeln konnte. Zellen, welche sich beispielsweise mehrmals vor und zurück bewegten, migrierten viel und auch teilweise weite Strecken, verblieben aber die ganze Zeit auf der gleichen Fläche. Kreuzten sich die Zelltrajektorien verschiedener Zellen, so migrierten sie ebenfalls über dieselbe Fläche. Durch diese Gegebenheiten konnte eine Flächenberechnung keine Steigerung der Migration wiedergeben, weil aus derartigen Migrationen kein Flächenzuwachs resultierte. Wurde die

Migrationsfähigkeit der Zellen jedoch extrem inhibiert und ihre Migrationspfade brachten kaum einen Flächenzuwachs mit, so konnte dies durch diese Methodik vermutet werden.

Inhibiert wurden GFP-überexprimierende N3EFL-Zellen nach der Zugabe von Ionomycin oder einer Gehirnpräparation (s. gelbe Rahmen in Abbildung 16). Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin verringerte vermutlich die Adhäsionskontakte der Zellen zum Untergrund, so dass diese keine Ankermöglichkeiten zum Vorschieben des Leitsaum sowie zur Retraktion des Zellendes knüpfen konnten. Durch den erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in den intrazellulären Raum wurden vermutlich Calpaine aktiviert, die Integrine, Cadherine und Fokale Adhäsionskinasen spalten können (Franco und Huttenlocher (2005)), welche für die Bildung von Adhäsionskontakten notwendig sind.

Das Gehirngewebe scheint bei Zelltransplantationen *in vivo* das Hauptproblem darzustellen. Wie bereits mehrmals erwähnt, migrieren transplantierte Zellen nicht weit von der Transplantationsstelle weg. Aus diesem Grunde wurde die Migrationskapazität der Zellen unter ähnlichen Bedingungen durch die Zugabe einer Gehirnpräparation (s. oben) auch *in vitro* getestet. Die Zellmigration wurde dadurch auch bei diesem primären *screening* inhibiert. Eine Inhibition der Zellmigration kann in diesem Falle verschiedene Gründe haben. Eine Ursache könnte die simultane Wirkung verschiedener EZM-Komponenten sein, was einen migrationshemmenden Effekt zur Folge haben kann. Während Laminin zum Beispiel eine gute Basis für die Zellmigration von Tumorzellen *in vitro* liefert (Bellail *et al.* (2004)), ändert sich dies sobald eine kleine Menge Keratin Sulfat Glykosaminoglycan hinzu gegeben wird. Die Migration wird deutlich inhibiert (Giese *et al.* (1995), Giese und Westphal (1996)). Dieses Resultat ließ die Rückschlüsse zu, dass Ergebnisse aus dem zweidimensionalen *assay* übertragbar auf die *in vivo* Bedingungen waren.

Jedoch ging es in dieser Arbeit nicht um die Detektion von migrationsinhibierenden Faktoren, sondern es sollten primär migrationsteigernde Bedingungen gefunden werden. Dies war, wie bereits oben erwähnt, mit der Auswertung von Dai *et al.* (2005) nicht möglich. Dieser Test war nicht ausreichend robust. Er konnte keine Migrationssteigerung anzeigen. Folglich wurde eine alternative Analysemethode getestet. So spiegelte eine Auswertung der Filme über die manuelle Pfadbestimmung mittels der freiverfügbaren Software MTrackJ von ImageJ die aus visueller Betrachtung resultierende Annahme wider, dass die Überexpression einzelner



Kandidatengene die Migration auch steigerte (s. Abbildung 15). Durch das exakte Verfolgen der Zelltrajektorien stellten Zellen, die die gleiche Fläche mehrmals überquerten oder andere Zellpfade kreuzten im Vergleich zu der vorangegangenen Analyse keine Probleme dar. Die Trajektorien der Zellen, welche den Bildausschnitt verließen oder abstarben, wurden nicht in die Berechnungen mit einbezogen. Auf diese Weise konnten von den Kandidatengen-überexprimierenden migrierenden Zellen die Migrationsgeschwindigkeiten, sowie die Richtungspersistenzen festgestellt werden. Die Werte, der aus mehreren Experimenten gewonnenen Zellpfadanalysen, konnten gemittelt werden und die Standardabweichungen der Werte wurden berechnet (s. Abbildung 16). Hier bestätigte sich auch die Inhibition der N3EFL-Zellmigration durch die Zugabe der Gehirnpräparation. Auch in diesem Fall sind die gleichen Ursachen, wie bereits oben erwähnt, in Betracht zu ziehen. Mit Hilfe dieser Auswertemethode konnten Kandidatengene eruiert werden, welche die Zellmigration steigerten (s. unten). In Zukunft könnte, vor der Überprüfung der Zellinvasion (s. 5.2.2), zusätzlich durch Zugabe einer Gehirnpräparation (s. oben), getestet werden, ob aus der Überexpression dieser Kandidatengene auch unter diesen *in vivo* ähnlichen Bedingungen eine Verbesserung der Zellmigration resultieren kann.

Andere Versuchsaufbauten, wie z.B. der so genannte *Boyden chamber assay* sind zwar zumeist in der Auswertung weniger zeitaufwendig, jedoch hinsichtlich einzelner Migrationsparameter nicht so präzise. Diese Kammer besteht aus zwei Kompartimenten, welche durch eine Membran getrennt sind. Diese Membran besitzt Poren, welche von den Zellen durchwandert werden können. Einer der beiden Teilkammern kann ein chemotaktischer Faktor hinzugefügt werden. In dem selbem oder in dem anderen Kompartiment werden die Zellen ausgesät, welche sich auf der Membran anheften. Die Migration der Zellen wird von dem entstandenen Gradienten über der Membran beeinflusst und kann nach einem festgesetzten Zeitpunkt, oft auch automatisiert, über Flächenberechnungen des Verteilungsmusters auf der Membran bewertet werden. Mit diesem Test konnten Jarjour *et al.* (2003) zum Beispiel herausfinden, dass Netrin-1 chemorepulsiv die Migration von Oligodendrozyten Vorläuferzellen inhibiert. Einen höheren Durchsatz für diese Methode bieten *Transwell*-Systeme, die sich in Multiwellplatten befinden und simultan durchgeführt werden können. So konnten beispielsweise Erlandsson *et al.*

(2004) mittels mehrerer gleichzeitig durchgeführter Experimente nachweisen, dass SCF (*stem cell factor*) eine Rolle bei der Zellmigration von neuronalen Stammzellen spielt. Diese Arten der Migrationsassays können zwar Aufschluss über diverse chemotaktische Reize auf die Zellen liefern, bieten jedoch keine Auskunft über die Verteilung von unterschiedlichen Migrationstypen und -geschwindigkeiten innerhalb der Zellpopulation. Ein so genannter *scratch assay*, der ebenfalls weniger Zeit für die Auswertung beansprucht, wird auch für Zellmigrationsuntersuchungen herangezogen. Dabei wird ein konfluenter Zellrasen durch äußere Einwirkungen mit z.B. einer Pipettenspitze „aufgekratzt“. Die entstandene zellfreie Fläche wird anschließend nach festgesetzten Zeitpunkten inspiziert. Dabei werden zumeist mikroskopische Aufnahmen von den *scratches* gemacht, um die dort hineinmigrierten Zellen zu eruieren. Anhand von Resultaten aus einem solchen Versuchsaufbau zeigten Bourguignon *et al.* (2007), dass eine HA-CD44-Interaktion wichtig für die Astrozytenmigration nach ZNS-Verletzungen ist. Bei einem solchen *assay* sollte nicht außer Betracht gelassen werden, dass der Zellrasen immer durch äußere Einwirkungen zerrissen und damit verletzt wird.

Jeder Versuchsaufbau hat seine Vor- und Nachteile. Die richtige Wahl der Methodik sowie der entsprechenden Auswertung ergeben sich aus der Fragestellung der Untersuchungen. In dieser Arbeit sollten die Zellen hauptsächlich schneller werden und möglichst persistent migrieren, um sich nach einer Transplantation weit von der Transplantationsstelle wegzubewegen. Dabei standen die Bedingungen, wie Chemotaxie, welche in einem *transwell assay* überprüft werden, und Zellmigration nach Verletzung der Zellpopulation eines *scratch assays*, zunächst nicht im Vordergrund. Dies könnte in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Wünschenswert wäre jedoch eine automatisierte Methode der Auswertung für die Zellmigrationsparameter von transient transfizierten Zellen, um Zeit zu sparen.

So konnten Keller *et al.* (2008) zum Beispiel dreidimensionale Trajektorien von Zellen sich entwickelnder Zebrafischembryonen erhalten. Dabei verfolgten sie die Migration von allen Zellen des Embryos, bis zu 55 Millionen Kerne, innerhalb von 24 h. Zur automatisierten Verfolgung dürfte sich eine Zelle bei diesem Ansatz nur um einen Kerndurchmesser pro Bild fortbewegen. Eine Übertragung dieser Trajektorienbestimmungen zum automatisierten Verfolgen der Zellmigration hätte eine Aufnahmerate bedeutet, die mit den gegebenen technischen Mitteln nicht erreichbar war. Keller *et al.* (2008) verwendeten ein "Scanned Light Sheet

Microscope". Darüber hinaus wäre eine Kernfärbung nötig gewesen, um nicht auch mitotisch aktive Zellen in die Berechnungen mit einzubeziehen. In diesem Falle wären aber auch die Zellpfade nicht transfizierter Zellen automatisch berechnet worden, was für die Einflussbestimmung der Kandidatengene irrelevant war.

Somit ist die manuelle Pfadbestimmung nach Zeitrafferaufnahmen bei Anwendungen, wie in dieser Arbeit, zwar die aufwendigste, aber auch die derzeit sicherste. Für den Zweck eines breiten *screenings* müsste jedoch eine andere Methode mit höherem Durchsatz entwickelt werden.

### **5.2.2 Das sekundäre *screening* – die Analyse der Zellinvasion**

Im sekundären *screening* sollten die Treffer des primären *screenings* bestätigt werden. Es war von Interesse, ob der migrationshemmende Effekt des Gehirngewebes durch die Überexpression der Kandidatengene überwunden werden konnte.

Der Prozess der Invasion von malignen Zellen wird von Bellail *et al.* (2004) in ein drei-Phasen-Modell eingeteilt: (1) Tumorzellen an der invasiven Seite der Zellmasse lösen sich von dem Verband (2) heften sich über spezifische Rezeptoren an die EZM, (3) bauen lokal die EZM-Komponenten ab und schaffen sich so einen Weg in das angrenzende Gewebe. Bei dem Migrationsprozess in Zellkultur wandern die Zellen über die EZM und nicht durch die EZM (s. 1.2). Studien mit Melanom- sowie Gliomzellen konnten trotzdem nachweisen, dass es eine Korrelation zwischen der gesteigerten Migration im zweidimensionalen *assay in vitro* und dem gesteigerten invasiven Wachstum *in vivo* gibt (Bittner *et al.* (2000), Chicoine und Silbergeld (1995)). Jedoch können selbst *in vitro assays* auf definierten EZM-Bestandteilen nicht 100 %ig das komplexe Zusammenspiel von Zellen und Umgebung, wie bei einer Invasion *in situ*, widerspiegeln (De Wever und Mareel (2003)). Deshalb ist eine Etablierung eines *in vivo* ähnlichen Invasionsassays zur Untersuchung der dreidimensionalen Migration wichtig.

Aus diesem Grunde wurde die Invasionsfähigkeit der Kandidatengen-überexprimierenden Zellen mit einem *slice assay* nach Scheffler *et al.* (2003) getestet. Dies ist ein *ex vivo* System, das den *in vivo* Verhältnissen sehr ähnelt. Die betreffenden Zellen wurden am Entorhinalen Cortex von Hippocampusschnitten 8-9 Tage alter Ratten transplantiert. Bei initialen Zeitrafferaufnahmen einen Tag nach der Transplantation konnten die Zellen methodisch bedingt noch nicht lange genug

fokussiert werden, um anschließend zur Gewinnung diverser Migrationsparameter durch *in vivo* ähnliche Analysen, wie von Hecker *et al.* (2008) beschrieben, durchzuführen. In Folge dessen mussten die Gewebeschnitte nach einem bestimmten Zeitraum fixiert und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert werden.

Da die GFP-Fusionskonstrukte transient transfiziert wurden und die Fluoreszenz der Zellen als Analysekriterium genutzt wurde, musste eine Auswertung der horizontalen sowie der vertikalen Migration relativ zeitnah vollzogen werden.

Hinsichtlich der horizontalen Migration konnten weder drei (s. Abbildung 26) noch fünf Tage nach der Transplantation Unterschiede zwischen der GFP-Kontrolle und den Kandidatengen-Überexpressionen festgestellt werden. Jedoch konnten signifikante Invasionssteigerungen nach den verschiedenen Kandidatengen-Überexpressionen bei beiden Zelllinien, den glialen Vorläufer N3EFL-Zellen (s. Abbildung 32), sowie bei den B35-Neuroblastomzellen (s. Abbildung 29 und Abbildung 30), verzeichnet werden.

Hwang *et al.* (2008) haben einen ähnlichen *slice assay* genutzt, um herauszufinden welche Rolle Fascin bei der Migration und Invasion von Gliomzellen spielt. Auch sie verwendeten Gehirnschnitte von Ratten in einem ähnlichen Versuchsaufbau. Zwar wurde in den verschiedenen Gliomzellen kein Fascin überexprimiert, aber der Einsatz von siRNA reduzierte die endogene Expression des Proteins. Die so behandelten stabil exprimierenden GFP Zellen konnten ebenfalls drei Tage lang nach der Transplantation invasiv wachsen, bevor sie zusammen mit dem Gewebeschnitt fixiert und mikroskopiert wurden. Dieses Forscherteam traf durch die Auswertung konfokaler Aufnahmen der Gewebeschnitte Aussagen über die Invasivität der verschieden behandelten Zellen: der *knockdown* durch Fascin-siRNA inhibierte die Invasivität der betreffenden Zellen. Dieses Ergebnis resultierte aus konfokalen Schichtaufnahmen durch das Gewebe im Abstand von 10  $\mu\text{m}$ , welche über eine spezielle Software hinsichtlich GFP-fluoreszierender Zellen untersucht wurden. Dabei wurde die Fläche der GFP-fluoreszierenden Zellen in  $\text{mm}^2$  pro *stack* ermittelt und gegen die Invasionstiefe aufgetragen.

Auch die Auswertung in dieser Arbeit wurde über die Analyse konfokaler LSM-Aufnahmen, wie in 3.2.11 beschrieben, realisiert. Dabei wurden an der Transplantationsstelle mehrere nebeneinander liegende Schichtaufnahmen in das Gewebe hinein im Abstand von 5  $\mu\text{m}$  oder 2,5  $\mu\text{m}$  gemacht. Dies war zwar sehr zeitintensiv, bot aber einen Überblick über die Gewebeintegrität der fluoreszierenden

Zellen an der Transplantationsstelle. Die in 3.2.11.2.2 beschriebene und angewandte Grauwertberechnung funktionierte in ähnlicher Weise, wie die Auswertung von Hwang *et al.* (2008), mit dem Unterschied, dass nicht die absolute Fläche der fluoreszierenden B35-Zellen pro *stack* gegenüber der Invasionstiefe aufgetragen wurde, sondern die normierte, um die verschiedenen Bedingungen vergleichen zu können (s. Abbildung 29). Dies bot einen objektiven Einblick über die Invasionsfähigkeit der Kandidatengen-überexprimierenden B35-Zellen im Vergleich zueinander. Eine Auswertung über die Grauwertberechnung könnte automatisiert werden und wäre zudem objektiv.

Im Falle der N3EFL-Zellen war jedoch die GFP-Expression nach einer Transplantation zu schwach für eine derartige Analyse. Teilweise war eine Differenzierung der schwachen Eigenfluoreszenz des Gewebes und der fluoreszierenden Zellen über die automatische Grauwertermittlung nicht möglich. Aus diesem Grunde wurde eine weitere Auswertung herangezogen: Die Analyse über die maximale Invasionstiefe der Zellen (s. Abbildung 32). Der Vergleich der beiden Auswertemethoden bei den B35-Zellen zeigte, dass die Resultate stimmig waren (s. Abbildung 29 und Abbildung 30). In beiden Fällen war ersichtlich, dass die Überexpression aller Kandidatengene (CD44, Src, EGFR) eine erhöhte Invasion zur Folge hatten. Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass die Methode über die invasivste Zelle im Falle der N3EFL-Zellen ebenfalls richtige Resultate lieferte und war somit eine adäquate Alternative zur objektiven Grauwertberechnung. Die detaillierten Ergebnisse in Bezug auf die einzelnen Kandidatengene werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

Schichor *et al.* (2005) werteten in ihren Experimenten die Invasivität transplantierte Zellen in einen Gewebeschnitt ebenfalls über konfokale Mikroskopie aus. Sie kombinierten darüber hinaus in ihren Experimenten den in 5.2.1 erwähnten *Boyden chamber assay* mit einem Sliceinvasionsassay. Dabei war der Gewebeschnitt, auf dem die Zellen transplantiert wurden, in der oberen Kammer lokalisiert, während dem unteren Kompartiment ein chemotaktischer Reiz hinzugefügt wurde. Auf diese Weise konnten sie die Invasivität von Astrozytomzellen in Schweinegehirnschnitten in Folge von diversen chemotaktischen Reizen testen. Für weiterführende chemotaktische Untersuchungen könnten die Versuchsaufbauten von Schichor *et al.* (2005) und Scheffler *et al.* (2003) in der Zukunft kombiniert werden. Jedoch war, wie bei den

Migrationsuntersuchungen (s. 5.2.1) auch, bei der Invasion in dieser Arbeit die Chemotaxie zunächst nicht von Interesse.

Optional könnten auch andere natürliche, synthetische oder halbsynthetische EZM-Äquivalente genutzt werden, deren Anwendungen teilweise weniger komplex wären. Eine Alternative wäre beispielsweise das Matrigel<sup>TM</sup> (Terranova *et al.* (1986), Albini *et al.* (1987)), welches der Hersteller als ein Grundlagenmodell für eine biologisch aktive Basalmembran für *in vitro assays* bezeichnet. Matrigel wird aus EZM-Komponenten-reichen Maussakromzellkulturen extrahiert und kann für einen höheren Durchsatz auch in 48- oder 96-well-Kulturschalen angewandt werden. Dahingegen existieren auch chemisch komplett definierte EZM-Modellsysteme, wie zum Beispiel der Extracel<sup>TM</sup> *Sponge* (Liu *et al.* (2004), Liu *et al.* (2006), Liu *et al.* (2006b), Serban *et al.* (2008)). Dieser kann ebenfalls in 96-well-Platten zur Feststellung der Zellinvasivität genutzt werden, um den Durchsatz an Experimenten zu erhöhen. Jedoch können diese EZM-Äquivalente nie mit dem Zielgewebe für Transplantationen gleichgesetzt werden.

Der in dieser Arbeit verwendete *ex vivo* Invasionsassay kommt den Bedingungen einer *in vivo* Transplantation ins Gehirn am nächsten. Zudem konnten mittels des verwendeten *slice assays* mehrere Bedingungen an einem Tier getestet werden. 4-6 Gewebeschnitte resultieren aus der Präparation eines Hippocampus einer 8-9 Tagen alten Ratte. Dies reduziert die Anzahl der zu tötenden Tiere um den Faktor 4-6. Bei der direkten Transplantation ins lebende Tier hätte nur ein Parameter pro Ratte getestet werden können. Aus diesem Grunde kam dieser *assay* in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz.

In Zukunft könnten die Aufnahmen der konfokalen Bilder durch einen in x,y,z-Richtung fahrbaren und programmierbaren Mikroskoptisch eines konfokalen Mikroskopes automatisiert und somit optimiert werden. Diese technischen Voraussetzungen waren in dieser Arbeit jedoch leider nicht gegeben. Durch weitere Transfektionsoptimierungen könnte zudem eine ausreichend starke Fluoreszenz der Zellen resultieren, welche es ermöglichen würde eine automatisierte Auswertung, wie die Grauwertberechnung, durchzuführen. Im Allgemeinen würde ein solches Vorgehen erheblich die Versuchszeiten kürzen.

### **5.3 Die Kandidatengene**

Wie bereits in 1.3 beschrieben, wurden die diversen Kandidatengene in den beiden Zelllinien überexprimiert, da aus der Literatur bekannt ist, dass sie die Zellmigration und/ oder -invasion positiv beeinflussen können. Zur Überexpression wurde bewusst die transiente Transfektion gewählt, um bei einer stabilen Transfektion die klonalen Effekte durch somatische Mutationen zu umgehen. Viele der Kandidatengene wirken auch mitogen, was bei einer stabilen Transfektion zu einer Tumorentwicklung führen könnte. Für die Transfektion wurden GFP-Fusionskonstrukte genutzt, um die fluoreszierenden und somit gleichzeitig Konstrukt-exprimierenden Zellen mikroskopisch visualisieren zu können. Dies war die Voraussetzung für die manuelle Pfadbestimmung Kandidatengen-überexprimierender Zellen (s. Abbildung 15). Zudem konnten die grünfluoreszierenden Zellen so für immunzytochemische Kolokalisationsstudien genutzt werden. Gleichzeitig bot die Nutzung des Fusionskonstrukts die Möglichkeit, bei diversen biochemischen Untersuchungen einen Antikörper gegen GFP nutzen zu können. Die Problematik bei einem mit einem Tag-versehenen Konstrukt könnte jedoch ebenfalls eine Funktionsbeeinflussung sowie ein Stabilitätsproblem der exprimierten Proteine mit sich bringen.

Die Auswirkungen der Kandidatengene auf die Zellmigration, -invasion und -morphologie auf beide Zelllinien werden anhand der Resultate dieser Arbeit im Folgenden diskutiert. Berücksichtigt werden auch die Effekte auf die Proliferation und Differenzierung der glialen Vorläuferzellen durch die Überexpressionen dieser Kandidatengene.

#### **5.3.1 Die Kandidatengene im *screening***

Nach Etablierung des Zellmigrationsassays und der dazu gehörigen Auswertemethode (s. 5.2.1) wurden verschiedene migrationsbeeinflussende Faktoren auf die N3EFL-Zellen untersucht (s. Abbildung 16). Anhand der manuellen Pfadbestimmung konnte so festgestellt werden, dass die mittlere Geschwindigkeit sowie die Richtungspersistenz der N3EFL-Zellen durch folgende GFP-Fusionskonstrukte gesteigert wurde: CD44 unter Zugabe von Hyal und gleichzeitiger Zugabe von Hyal und HA, CXCR4, EGFR (ebenfalls nach Hinzufügen von 10 ng/ml EGF oder 20 ng/ml EGF), Lyve (auch nach der Zugabe von HA) und Src. Der Vergleich der Parameter der GFP-überexprimierenden N3EFL-Zellen mit den Migrationseigenschaften der Kandidatengen-überexprimierenden glialen

Vorläuferzellen mittels t-Test ergab, dass die mittlere Migrationsgeschwindigkeit und der Persistenzindex nach einer EGFR-GFP-Überexpression alleine, sowie nach Zugabe von 10 ng/ml EGF oder 20 ng/ml EGF höchst signifikant anstieg. Das Hinzufügen von EGF (10 ng/ml oder 20 ng/ml) nach einer EGFR-GFP-Überexpression hatte jedoch keine statistisch signifikanten Auswirkungen auf die Migrationsparameter im Vergleich zu den Ergebnissen nach einer EGFR-GFP-Überexpression alleine. Aus diesen Gründen wurden die Folgen einer EGF-Zugabe nicht weiter statistisch untersucht. Nach dem t-Test wurde die mittlere Migrationsgeschwindigkeit nach einer CXCR4-GFP-Überexpression statistisch hoch signifikant und nach einer Src-GFP-Überexpression statistisch höchst signifikant gesteigert. Die Richtungspersistenz nach einer Überexpression von CD44-GFP unter der Zugabe von Hyal und HA stieg ebenfalls statistisch höchst signifikant an. Dies resultierte auch aus dem Vergleich dieser Bedingung mit der Richtungspersistenz nach einer Überexpression von CD44-GFP alleine. Wurden HA oder Hyal unabhängig von einander nach einer CD44-GFP-Überexpression hinzugefügt, ergab sich keine statistisch signifikante Veränderung der Migrationsparameter. Die Negativkontrollen zu den Bedingungen CD44 mit gleichzeitiger Zugabe von Hyal oder Hyal und HA misslungen aus diversen Gründen. Diesen Parametern wurde nicht weiter nachgegangen, da die Schwerpunkte weiterer Auswertungen genau festgelegt werden mussten. Die manuelle Pfadbestimmung lieferte zwar explizite Daten hinsichtlich einzelner Migrationseigenschaften, sie limitierte aber auch durch den Zeitaufwand den Durchsatz von Experimentanalysen. Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich im Falle der N3EFL-Zellen auf die beiden Kandidatengene mit den stärksten Effekten, EGFR und Src. Bei den B35-Zellen wurde ebenfalls die Überexpression von Src genauer untersucht. Die Effekte einer Transfektion mit CD44-GFP waren von Interesse, da seine migrationsfördernden Auswirkungen unter anderem bei Tumorzellen aus der Literatur bekannt waren (Turley *et al.* (2002)). Die Folgen der Überexpression dieser Kandidatengene auf die beiden Zelllinien werden in den nächsten Kapiteln genauer betrachtet.

### **5.3.2 Differenzierungs- und Proliferationseinfluss der Kandidatengene**

Nachdem positive Effekte der Kandidatengene CD44, Src und EGFR auf die Migration der Zellen bekannt waren, wurde ebenfalls ihr Differenzierungs- und



Proliferationseinfluss auf die N3EFL-Zellen untersucht. Die Kenntnis über diese Parameter ist für eine Zelltransplantation wichtig (Lindvall und Kokaia (2006)). Eine erhöhte Proliferation könnte auf eine maligne Transformation der Zellen, welche nicht wünschenswert wäre, hindeuten. Ein Ausdifferenzieren der Zellen durch eine Kandidatengen-Überexpression wäre ebenfalls nicht wünschenswert. GFAP-positive Astrozyten könnten nicht remyelinisieren und O4-positive Oligodendrozyten wären nur noch bedingt migrationsfähig. A2B5-positive Zellen hingegen befinden sich noch in einem vordifferenzierten Stadium (s. 1.1.1.1). Diese Art von Zellen wäre also nach einer Transplantation noch migrationsfähig und könnte zu remyelinisierenden Oligodendrozyten ausdifferenzieren.

Für diese Untersuchungen wurden die N3EFL-Zellen mittels ExGen 500 mit den betreffenden Fusionskonstrukten transfiziert. Die Differenzierung wurde über Kolokalisationsstudien der fluoreszierenden Zellen mit Markerfärbungen (O4, GFAP, A2B5) durchgeführt und die Proliferation über BrDu-Inkoperationen (s. 3.2.9.4) untersucht.

Aus den Markerfärbungen resultierte jedoch außer in zwei Fällen keine Kolokalisation zwischen einem Marker (O4, A2B5 oder GFAP) und einer Kandidatengen-überexprimierenden Zelle (s. Abbildung 42 und Abbildung 43). Die beiden Ausnahmen (Src- und EGFR-überexprimierende N3EFL-Zellen) wiesen simultan zur grünen Fluoreszenz den Marker A2B5 auf (s. Abbildung 43), was eine oligodendrogliale Prädifferenzierung implizierte. Diese Resultate werden in den folgenden Kapiteln genauer diskutiert (s. 5.3.4.2 und 5.3.5).

Die Proliferationsbeeinflussungen einer CD44-Überexpression in den N3EFL-Zellen wurde aufgrund der negativen Resultate aus den beiden *screenings* (s. Abbildung 16 und Abbildung 32) nicht genauer untersucht. Die Proliferation der Zellen wurde durch keine der untersuchten Kandidatengene, transfiziert mit ExGen 500, beeinflusst (s. Abbildung 45). Basierend auf diesen Versuchsergebnissen kann eine erhöhte Gewebeintegrität somit nicht aus einer gesteigerten Teilungsrate resultieren. Beim Teilungsprozess hätte jede neu entstandene Zelle von den anderen Zellen ins Gewebe vorgeschoben werden können. Da sich die Proliferationsraten aber nicht voneinander unterschieden, mussten die Zellen im Falle einer gesteigerten Gewebeintegrität aktiv invasiv gewachsen sein. Somit konnte von Invasion gesprochen werden.

In zukünftigen Studien müssten die Zellen für diese Versuche mit einer Nucleofektion anstatt mit ExGen 500 transfiziert werden, da diese Transfektionstechnik bei den Transplantationsexperimenten mit den N3EFL-Zellen eingesetzt wurde. Zum Zeitpunkt dieser Experimente war die ungenügende Effizienz nach einer Transfektion mit ExGen 500 für die Transplantationsexperimente (s. Abbildung 31) jedoch noch nicht bekannt.

### **5.3.3 Das Kandidatengen CD44**

#### **5.3.3.1 Expression von CD44(-GFP)**

Das hier verwendete CD44-Konstrukt (Böckenhoff (2008)) enthielt die CD44 cDNA der Maus. Der GFP-Tag wurde mit dem C-Terminus des CD44-Rezeptors fusioniert, so dass die HA-Bindungsstelle nicht blockiert wurde. Nach Nucleofektion der B35-Zellen konnte das Fusionskonstrukt sowohl mit einem CD44-Antikörper (IM7), als auch mit einem Antikörper gegen GFP (ab290) in den B35-Zellen nach einer Western Blot Analyse detektiert werden (s. Abbildung 34).

Die CD44s-Form ergibt bei der Western Blot Analyse eine scheinbare Bandengröße von *ca.* 85 kDa. Aufgrund posttranslationaler Modifizierungen, wie zum Beispiel Glykosylierung, unterscheidet sich das tatsächliche Molekulargewicht des CD44s-Proteins von dem basierend auf der Aminosäuresequenz erwarteten Wert (Naor *et al.* (1997)). GFP ist *ca.* 27 kDa groß. Die Detektionen des Fusionskonstruktes mit zwei Antikörpern, welche gegen unterschiedliche Bestandteile des Konstruktes gerichtet waren, ergaben in beiden Fällen jeweils eine scheinbare Bandengröße von *ca.* 110 kDa (s. Abbildung 34B, C). Dadurch konnte die Expression des Fusionsproteins in den Zellen durch die Western Blot Analyse verifiziert werden. Die Versuche mit dem GFP-Antikörper zeigten keine weiteren Banden (s. Abbildung 34C), was eine proteolytische Abspaltung von GFP ausschloss. Somit war ein Rückschluss ausgehend von der GFP-Fluoreszenz auf die CD44-Lokalisation in distinkten Zellstrukturen CD44-GFP-überexprimierender Zellen zulässig.

Des Weiteren konnten mit dem IM7-Antikörper Banden der scheinbaren Größe zwischen 35-40 kDa detektiert werden. Dies war sowohl bei den unbehandelten sowie bei den Fusionskonstrukt-überexprimierenden B35-Zellen der Fall. Da diese Banden mit dem GFP-Antikörper bei den B35-Zellen nicht detektiert wurden, lag es nahe, dass die Banden in Abhängigkeit einer CD44-Expression entstanden. Auch in

anderen Veröffentlichungen wurden Banden dieser Größe bei einer Western Blot Analyse mit einem CD44-Antikörper detektiert (Moon *et al.* (2006), Moon *et al.* (2004)), jedoch werden sie nicht diskutiert. Nagano und Saya (2004) beschreiben die Abspaltung der CD44-Ektodomäne. Die intrazelluläre Domäne wird währenddessen durch  $\gamma$ -Sekretasen abgespalten, gelangt zum Zellkern und fungiert dort als Transkriptionsfaktor. Die in der Veröffentlichung angegebenen Bandengrößen der beiden Domänen entsprechen jedoch beide nicht den Größen der hier diskutierten Banden. Diese lassen sich aber interessanterweise immer nur in der Kern- oder Membranfraktion finden. IM7 bindet an den N-terminalen extrazellulären Teil, was einer Detektion der intrazellulären Domäne ggf. in der Kernfraktion mit diesem Antikörper widerspricht. Nagano und Saya (2004) verwendeten in der Western Blot Analyse einen Antikörper, welcher gegen den C-terminalen Teil des Rezeptors gerichtet war. Möglicherweise resultieren die hier diskutierten Banden aus einem nicht klassischen CD44-*shedding*. Unspezifische Gründe sind auszuschließen, da aus der sekundär Antikörperkontrolle keine Banden resultierten<sup>13</sup>.

Im Kulturüberstand der CD44-GFP-überexprimierenden B35-Zellen ließen sich zudem Banden der scheinbaren Größe von *ca.* 85 kDa und *ca.* 110 kDa detektieren. Dies deutete daraufhin, dass der komplette Rezeptor (mit und ohne GFP) ins Medium abgegeben wurde.

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Böckenhoff (2008), Prinz (2008)) konnte keine endogene Expression von CD44 in B35-Zellen nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden erneut andere Antikörper (IM7 und 5G8) herangezogen, welche die erhaltenen Resultate von den vorangegangenen Autoren bestätigten: Es konnte kein endogenes CD44 mittels Western Blot Analyse in den B35-Zellen nachgewiesen werden.

Bei den N3EFL-Zellen konnte neben der Überexpression des Fusionskonstruktes auch die endogene Expression des HA-Rezeptors CD44, mit dem IM7-Antikörper nachgewiesen werden (s. Abbildung 36). Die endogene Expression von CD44 resultierte bei der Western Blot Analyse in Banden der scheinbaren Größe von *ca.* 85 kDa, was auf die Expression von CD44s hindeutete. Hyaluronan ist bei der Regulation und Migration von neuronalen Stammzellen im sich entwickelnden Gehirn

---

<sup>13</sup> Daten nicht gezeigt.

essentiell (Sherman und Back (2008)). Somit war zu vermuten, dass die neuronalen Vorläuferzellen N3EFL den HA-Rezeptor endogen exprimieren.

Durch die Expression des Fusionskonstruktes entstanden Banden der scheinbaren Größe von ca. 110 kDa. Auch bei den N3EFL-Zellen ergaben sich, wie bei den Neuroblastomzellen, bei der endogenen Expression sowie bei der Überexpression Banden der scheinbaren Größe zwischen 35-40 kDa. Diese resultierten vermutlich aus den gleichen Gründen, wie die entsprechenden Banden der B35-Zellen. Äquivalente Versuche mit den Kulturüberständen der N3EFL-Zellen wie bei den B35-Zellen wurden nicht gemacht, da diese Zellen in kleineren Mengen kultiviert wurden.

Zu dem CD44-GFP-Fusionskonstrukt kann festgehalten werden, dass seine Überexpression in beiden Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Eine proteolytische Abspaltung des GFP-Tags konnte ausgeschlossen werden, wodurch die Migrations- und Invasionsstudien, sowie Untersuchungen der morphologischen Modifizierungen in Folge der Überexpression möglich waren (s. 5.3.3.2). Ein CD44-*shedding* konnte nicht verifiziert werden, darüber kann lediglich spekuliert werden. Der entscheidende Unterschied zwischen den N3EFL- und den B35-Zellen ist, dass CD44 von den glialen Vorläuferzellen endogen exprimiert wird, während bei den Neuroblastomzellen kein endogenes CD44 detektiert werden konnte.

### **5.3.3.2 Auswirkungen der CD44-GFP-Überexpression auf die B35-Zellen**

Das Hippocampusgewebe als Umgebung der transplantierten Zellen wurde genauer untersucht. In dieser Arbeit konnte faserartiges Hyaluronan in den Hippocampusschnitten nachgewiesen werden (s. Abbildung 25). Bereits Baier *et al.* (2007) haben ähnliche Strukturen in dem sich entwickelnden Mauserebellum anfärben können. Sie beschreiben die Fasern als mögliche Migrationspfade für neurale Zellen während der Gehirnentwicklung. Aus früheren Studien mit CD44-Antikörpern ist bekannt, dass CD44 zum Beispiel für die Gliomazelladhäsion und für das invasive Wachstum *in vitro* (Merzak *et al.* (1994)) sowie *in vivo* (Breyer *et al.* (2000)) notwendig ist. Indizien für die Nutzung der HA-Fasern als Migrationspfade sind die Zellstrukturen, welche nach einer CD44-GFP-Überexpression in B35-Zellen resultierten und deren Funktion im folgenden Abschnitt diskutiert wird.

Die Überexpression des CD44-GFP-Fusionskonstruktes bewirkte bei den B35-Zellen nach dem Vierfeldertest eine statistisch signifikante Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit und der Richtungspersistenz (s. Abbildung 20). Auch eine statistisch hoch signifikante Erhöhung der Segmentgeschwindigkeiten konnte eruiert werden (s. 4.1.3). Die Invasivität der Neuroblastomzellen wurde ebenso durch die CD44-Überexpression statistisch höchst signifikant gesteigert (s. Abbildung 30). Die vermehrte Ausbildung von filopodienartigen Strukturen nach einer Überexpression von CD44 *in vitro* wies bereits Böckenhoff (2008) in ihrer Diplomarbeit nach. Auch *in vivo* Aufnahmen in Slicekulturen ließen derartige Rückschlüsse zu.

Die Zellfortsatzstrukturen der CD44-GFP-überexprimierenden Zellen nach der Transplantation in den *slice* sahen filopodienartig aus (s. Abbildung 27C). Diese Beobachtung korreliert mit früheren Erkenntnissen, dass CD44 in aktinreichen feinen Protrusionen angereichert ist (Lamontagne und Grandbois (2008), Tsukita *et al.* (1994)). Es wird angenommen, dass Filopodien die gerichtete Zellmigration verstärken, da einige ihrer Hauptkomponenten die Zellmotilität begünstigen (Mattila und Lappalainen (2008)). Zudem wird das Vorhandensein von Filopodien als Charakteristikum für invasive Krebszellen betrachtet (Vignjevic *et al.* (2007)). Möglicherweise kann es sich bei den Strukturen aber auch um Invadopodien handeln, denn Gimona *et al.* (2008) postulieren, dass Invadopodien in einem faserartigen EZM-Netzwerk Ähnlichkeiten mit filopodienartigen oder lamellipodienartigen Protrusionen haben können. Dies könnte auf die beobachteten Strukturen gut zutreffen, da sie sich mit den HA-Fasern des Hippocampus (s. Abbildung 25) in einem solchen Netzwerk befanden. Die spezifische Funktion der Invadopodien ist der lokale Abbau der EZM (Ayala *et al.* (2006)). Auch die im Hippocampus vorhandene faserartige EZM-Komponente Hyaluronan (s. Abbildung 25) kann von Zellen über CD44 aufgenommen und somit abgebaut werden (Culty *et al.* (1992), Hua *et al.* (1993)). Die Lokalisation des Fusionskonstruktes in den hier beschriebenen Strukturen *in vivo* (s. Pfeile in Abbildung 28B, C) könnte ein Indiz dafür sein, dass sich die Zellen mittels dieser Protrusionen in der EZM durch HA-Abbau vorschoben, also invasiv wachsen konnten. Invadopodien sind immer aktinreich (Artym *et al.* (2006)). Somit befände sich CD44 in den Invadopodien in unmittelbarer Nähe von Aktin, was auf eine Korrelation der beiden Komponenten hindeutet. ERM Proteine interagieren mit der cytoplasmatischen Domäne von CD44 und verbinden das Aktinzytoskelett mit dem Rezeptor und anderen Proteinen (Ponta

*et al.* (2003)). Ponta *et al.* (2003) schreiben, dass ERM Proteine für die CD44-Signalkaskaden notwendig sind und die Signaltransduktion diese CD44-Aktin-Verbindung voraussetzt.

Es ist somit möglich, dass es sich bei den Zellfortsätzen der CD44-GFP-überexprimierenden Zellen um filopodienartig-aussehende Invadopodien handelte, welche das invasive Wachstum durch HA-Abbau positiv beeinflussten und die faserartige EZM-Struktur als Migrationspfade nutzten. Dabei könnte sich das Aktinzytoskelett für die dreidimensionale Migration durch die Interaktionen HA-CD44-ERM-Aktin umorganisiert haben.

Die Feststellung, dass die Überexpression von CD44 bei den B35-Zellen die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen steigerte, schien zunächst in Konflikt mit diversen Veröffentlichungen zu stehen. Tuohy *et al.* (2004) gehen in ihrer Publikation genauer auf die Rolle von CD44 im ZNS ein. Sie stellen dabei fest, dass eine verringerte CD44-Expression bei Neuroblastomen nach den Studien von Terpe *et al.* (1995) eine schlechte Prognose impliziert. Es wird postuliert, dass bei Neuroblastomen im Gegensatz zu den meisten anderen malignen Tumoren eine umgekehrte Korrelation zwischen der Expression von CD44s und der Tumorentwicklung besteht. Bei den meisten Tumorarten geht eine erhöhte CD44-Expression mit der fortschreitenden Tumorentwicklung einher (Bourguignon (2008)), CD44-positive Neuroblastomen scheinen jedoch weniger invasiv zu sein, während die CD44-negativen im Umkehrschluss invasiver sind (Gross *et al.* (1995), Gross *et al.* (1994), Terpe *et al.* (1995)). Jedoch werden in diesen Studien humane Neuroblastomzellen des peripheren Nervensystems verwendet, welche von denen in dieser Arbeit verwendeten Rattenhirn-abgeleiteten B35-Neuroblastomzellen abzugrenzen sind. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Resultate aus der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der B35-Neuroblastomzellen und einer CD44-Überexpression nicht in Konflikt stehen mit den Aussagen über die humanen Neuroblastomzellen.

### **5.3.3.3 Auswirkungen der CD44-GFP-Überexpression auf die N3EFL-Zellen**

Im Gegensatz zu den B35-Zellen exprimierten die N3EFL-Zellen endogen den HA-Rezeptor CD44 (s. Abbildung 36). Jedoch bewirkte eine Überexpression von CD44-GFP weder eine Steigerung der Migration (s. Abbildung 16), noch der Invasion (s. Abbildung 32) der glialen Vorläuferzellen.

*In vitro* Experimente mit Astrozyten und Gliomzellen, in denen CD44-blockierende Antikörper verwendet wurden, zeigten, dass die Hemmung von endogenem CD44 die Zellmigration inhibieren kann (Bourguignon *et al.* (2007), Radotra und McCormick (1997)). So ist es möglich, dass eine Steigerung der N3EFL-Zellmigration und -invasion durch eine Überexpression von CD44 nicht realisierbar ist. Möglicherweise können über das endogene CD44 hinaus durch das zusätzlich exprimierte CD44 keine weiteren *downstream* Signalwege, welche die Migration und/ oder die Invasion beeinflussen, wie zum Beispiel über ERM, aktiviert werden. Dies korreliert mit den Resultaten, dass sowohl die mittlere Migrationsgeschwindigkeit, als auch die Richtungspersistenz der N3EFL-Kontrollzellen sich statistisch kaum von den CD44-GFP-überexprimierenden Zellen unterschieden. Eine statistisch höchst signifikante Steigerung der Richtungspersistenz der CD44-GFP-überexprimierenden Zellen resultierte aus der simultanen Zugabe von Hyal und HA. Das unabhängige Hinzufügen dieser Supplemente hatte keine positiven Auswirkungen zur Folge (s. Abbildung 16). Udabage *et al.* (2005) haben festgestellt, dass sich unterschiedlich große HA-Fragmente verschieden auf die Zellmigration auswirken können. Durch Hyal zerkleinerte HA-Fragmente könnten somit ein Grund für die gesteigerte Richtungspersistenz sein. Es müssten weitere Versuche folgen, um explizite Aussagen über diese Ergebnisse machen zu können. Zum Beispiel misslungen vergleichbare Versuche zu den CD44-GFP-überexprimierenden N3EFL-Zellen mit zusätzlichen Supplementzugaben aus diversen Gründen. Somit sind die Auswirkungen der Zugabe von Hyal und HA bei GFP-überexprimierenden N3EFL-Zellen unklar. Es ist folglich nicht bekannt, ob auch aufgrund der endogenen Expression von CD44 eine Steigerung der Richtungspersistenz durch die Zugabe von Hyal und HA induziert werden könnte.

Auf eine genauere Analyse der Invasionsparameter nach einer CD44-GFP-Überexpression in den glialen Vorläuferzellen wurde aufgrund der negativen Resultate des primären *screenings* verzichtet (s. Abbildung 32).

Weitere Experimente der CD44-GFP-Überexpression in den glialen Vorläuferzellen, sollten Auskunft über die Auswirkungen der Überexpression des Rezeptors auf die Differenzierung der Zellen liefern. Die Studie von Liu *et al.* (2004b) besagt, dass CD44 das Ausdifferenzieren zu Oligodendrozyten hemmt. Dies wäre in dieser Arbeit nicht wünschenswert gewesen, da die Zellen nach einer Transplantation fähig sein sollten, das geschädigte ZNS zu remyelinisieren, was eine Funktion der

Oligodendrozyten ist. Aus diesem Grunde wurden die N3EFL-Zellen nach einer transienten Transfektion mit dem Fusionskonstrukt nach Glaser *et al.* (2007) ausdifferenziert und anschließend durch eine Markerfärbung charakterisiert. Keiner der Marker O4, GFAP und A2B5 kolokalisierte mit den so behandelten grünfluoreszierenden Zellen (s. Abbildung 44). Eine Aussage über den auf diese Weise erhalten Zelltyp ist somit nicht möglich. Die CD44-GFP-Überexpression schien bei den N3EFL-Zellen einen allgemein differenzierungshemmenden Effekt zu haben.

#### **5.3.3.4 Schlussfolgerungen aus den CD44-Experimenten**

Abschließend zu den CD44-Experimenten kann festgehalten werden, dass eine Überexpression des HA-Rezeptors in den endogen CD44-exprimierenden N3EFL-Zellen nicht zu einer Steigerung der Migration führte. Daraus resultiert, dass eine weiterführende Transplantationsstudie zur Therapie von ZNS-Läsionen mit CD44-GFP-überexprimierenden N3EFL-Zellen nicht sinnvoll wäre.

Die Überexpression in den B35-Neuroblastomzellen bewirkte hingegen eine vermehrte Ausbildung von motilen Strukturen, welche möglicherweise filopodienartig-aussehende Invadopodien sein könnten, die an der gesteigerten Invasion der Zellen entlang von HA-Strukturen im Gewebe beteiligt sein könnten. Bei den Neuroblastomzellen ließ sich endogen kein CD44 nachweisen.

Die Überexpression des Rezeptors wirkte sich abhängig von der Zelllinie verschieden auf die Migrations- und Invasionsparameter sowie auf die Zellmorphologie aus. Die Differenz der Auswirkungen auf die beiden Zelllinien lässt vermuten, dass eine Überexpression des CD44-GFP-Konstruktes in nicht endogen CD44-exprimierenden Zellen hinreichend zur Steigerung des invasiven Wachstum sowie der Zellmigration ist. Somit stehen die Effekte der Überexpression von CD44-GFP ggf. in Relation zur endogenen Expression der untersuchten Zelllinien. Diese Aussage müsste allerdings anhand von weiteren Studien mit unterschiedlichen Zelllinien zunächst verifiziert werden.

Es konnte jedoch festgestellt werden, dass CD44 auf die Zellmigration und –invasion eine verstärkende Beeinflussung hat, sowie motile Zellstrukturen induzieren kann.



### 5.3.4 Das Kandidatengen Src

#### 5.3.4.1 Expression von Src(-GFP)

Das hier verwendete Src-GFP-Fusionskonstrukt wurde bereits von Sandilands *et al.* (2004) in ihren Studien verwendet. Sie klonierten und charakterisierten das Konstrukt und wiesen seine Funktionalität und Aktivität nach.

In einer immunzytochemischen Färbung Src-GFP-überexprimierender B35-Zellen mit einem monoklonalen Src-Antikörper (AHO1152) konnte festgestellt werden, dass in Kernnähe lokalisierte Src-GFP nicht mit dem Antikörper detektierbar war. In den Zellfortsätzen konnte hingegen eine Kolokalisation verifiziert werden (s. Abbildung 38). Vom Hersteller des Antikörpers wird die Aussage gemacht, dass der Antikörper an das exprimierte Produkt des Src-Gens bindet. Über den Aktivitätszustand der Tyrosinkinase während der Antikörperbindung konnten keine Hinweise eruiert werden. Aus früheren Studien ist bereits bekannt, dass sich die inaktive Form der Tyrosinkinase im perinuklären Raum lokalisiert (Fincham *et al.* (1996)). Möglicherweise bindet der Antikörper also nur an die aktive Konformation der Kinase. Unabhängig davon konnte die Überexpression des GFP-Fusionskonstruktes bei den B35-Zellen (s. Abbildung 33) sowie bei den N3EFL-Zellen (s. Abbildung 35) mittels des Antikörpers in Western Blot Analysen verifiziert werden. Auch endogen exprimierte beide Zelllinien die Src-Tyrosinkinase (s. Abbildung 33 und Abbildung 35).

#### 5.3.4.2 Auswirkungen der Src-GFP-Überexpression auf die B35-Zellen

Nach dem Mann-Whitney Test waren die Segmentgeschwindigkeiten der Src-GFP-überexprimierenden B35-Zellen zwar höchst signifikant langsamer, als die der GFP-überexprimierenden B35-Zellen (s. 4.1.3), die mittlere Geschwindigkeit und der Persistenzindex unterschieden sich jedoch kaum von den Kontrollzellen (s. Abbildung 19 und Abbildung 21). Die Überexpression des Src-GFP-Fusionskonstruktes bewirkte somit im Mittel bei den B35-Neuroblastomzellen keine Migrationssteigerung. Im Gegensatz dazu wiesen die B35-Zellen aber nach einer Src-GFP-Überexpression eine statistisch höchst signifikant erhöhte Invasivität (s. Abbildung 30) und die Induktion von filopodien- sowie lamellipodienartigen Fortsatzstrukturen *in vivo* (s. Abbildung 27D) auf.

Die Invasion ins Gewebe und der damit verbundene Abbau der EZM ist normalerweise ein Kennzeichen für einen malignen Phänotyp und ist Voraussetzung für die Tumormetastasierung (Vitale *et al.* (2008)). Der Abbau der EZM geht mit aktinreichen fingerartigen Protrusionen einher. Das sind die in Kapitel 5.3.3.2 bereits erwähnten Invadopodien. Sie fungieren als Adhäsionskontakte, an denen spezifische Integrine und Proteasen lokalisiert sind (Chen und Wang (1999), Mueller und Chen (1991), Mueller *et al.* (1999), Kelly *et al.* (1994)). Eine zentrale Rolle der Src-Tyrosinkinase in der Invadopodienregulation wurde basierend auf Studien mit konstitutiv aktiver Src entdeckt. Diese stimulierte die Invadopodienausbildung bei Fibroblasten, welche ansonsten diese Strukturen nicht aufweisen, und bei Brustkarzinomzellen (Artym *et al.* (2006), Chen (1989), Chen *et al.* (1984), Chen *et al.* (1985)). Aus diesem Grunde war es nahe liegend, dass es sich auch bei den gebildeten Fortsätzen der Src-überexprimierenden B35-Zellen um Invadopodien handelte.

Neben den Zwei-Photonenaufnahmen war ein weiterer Hinweis für diese Annahme, die Aktinanreicherung in den lamellopodienartigen sowie filopodienartigen Fortsätzen der Zellen *in vitro* (s. Abbildung 37). In Invadopodien sind Aktinfilamente einschließlich der Komponenten, welche für den Aktinaufbau benötigt werden, wie zum Beispiel der Arp2/3 Komplex, N-WASP und Cortactin angereichert (Buccione *et al.* (2004), Linder (2007), Artym *et al.* (2006), Lorenz *et al.* (2004), Clark *et al.* (2007), Mizutani *et al.* (2002)). Zudem war bekannt, dass die Expression von Wildtyp-Src oder aktivierter Src in MDA-MB-231 Brustkrebszellen die Anzahl der Invadopodien pro Zelle und die Matrixproteolyse um das 4- und 7-fache erhöhte (Artym *et al.* (2006)). Und auch in dieser Arbeit wurde eine Steigerung der Länge filopodienartiger Fortsätze bei den B35-Zellen nach einer Src-GFP-Überexpression *in vitro* festgestellt (s. Abbildung 39). Die Anzahl dieser Fortsätze jedoch war der Kontrolle gegenüber nicht statistisch signifikant gesteigert. Dahingegen stieg die Länge der filopodienartig-aussehenden Zellfortsätze nach einer Src-GFP-Überexpression statistisch hoch signifikant an, was auf eine Induktion längerer Invadopodien durch Src bei den B35-Zellen hindeutete. Nur eine EGF-Zugabe konnte nach der endogenen Src-Expression die Fortsatzanzahl pro Zelle statistisch signifikant steigern.

EGF kann nach einer Studie von Sato *et al.* (1995) die katalytische Aktivität von Src zwei- bis dreifach steigern. Bereits Rodier *et al.* (1995) stellten fest, dass die

EGF-induzierte Migration von Ratten-Karzinomzellen in Zusammenhang mit der Aktivierung von c-Src steht. Auch Sandilands *et al.* (2004) kommen zu der Schlussfolgerung, dass die katalytische Aktivierung des Enzyms von der Stimulation von Wachstumsfaktorrezeptoren oder Integrinen abhängig ist. Darüber hinaus ist aus den Studien von Lotz *et al.* (2003) bekannt, dass EGF nach einer Überexpression von c-Src die Invasivität von Brustkarzinomzellen steigern kann. Deshalb wurde überprüft, ob EGF auch bei den B35-Zellen ggf. eine aktivierende Wirkung auf die Src-abhängige Zellmigration ausüben kann. Jedoch resultierte aus der EGF-Zugabe in das serumfreie Kulturmedium der B35-Zellen keine Erhöhung der Migrationsparameter. Weder die unbehandelten Zellen, welche endogen Src exprimierten, noch die Src-GFP-überexprimierenden Zellen migrierten schneller oder persistenter (s. Abbildung 24). Die EGF-Zugabe bewirkte zwar eine vermehrte Ausbildung der länglichen Fortsätze (s. oben), konnte die Zellmigration aber in keinerlei Hinsicht beeinflussen. Somit bleibt fraglich, ob die EGF-Zugabe in dieser Konzentration und bei diesen Zellen Einfluss auf eine Src-Signalkaskade hatte oder eher durch andere Src-Signaltransduktionen die vermehrte Ausbildung von Filopodien initiiert wurde.

Eine EGF-Stimulation bewirkte keine Verbesserung der Migrationseigenschaften der Zellen. Die Src-abhängige B35-Zellmigration wurde darüber hinaus in Inhibitionsstudien untersucht. Mit PP2 wurden deshalb Inhibitionsversuche der Zellmigration von B35-Zellen in serumfreiem Medium durchgeführt. Angers-Loustau *et al.* (2004) konnten in ihren Studien mit malignen humanen Gliomzellen nachweisen, dass PP2 und SU6656 (beides SFK-Inhibitoren) die Zellinvasion in einem Kollagenmatrixassay signifikant inhibierte. Darüber hinaus beschrieben sie, dass PP2 das Verschwinden von peripheren Membranprotrusionen in Monolayerkulturen zur Folge hatte, sowie in dem dreidimensionalen assay den Verlust von Aktinvorschüben in den Spitzen der Invadopodien initiierte. Diese Effekte wurden als Resultat einer SFK-Inhibition aufgefasst. Interessanterweise wurde die mittlere Zellmigrationsgeschwindigkeit der B35-Neuroblastomzellen auch durch PP2 statistisch höchst signifikant eingeschränkt. Dies war sowohl bei den endogen exprimierenden als auch bei den Src-überexprimierenden Neuroblastomzellen der Fall (s. Abbildung 24). Das könnte bedeuten, dass endogene Src an der Migration der B35-Zellen mitwirkt. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass PP2 nie monospezifisch für Src ist. Diese Inhibitionsexperimente deuten also daraufhin, dass

Tyrosinkinase in jedem Fall einen Einfluss auf die B35-Zellmigration haben müssen. Jedoch werden die Tyrosinkinase durch diese Versuche nicht spezifiziert.

Zusammenfassend sprechen diese Daten dafür, dass Src für die Migration der B35-Zellen notwendig ist, eine Überexpression aber nicht zu einer weiteren Steigerung von migrationsfördernden Signaltransduktionswegen führt. Interessanterweise waren jedoch in Bezug auf die Fortsatzbildung und das invasive Wachstum signifikant fördernde Effekte einer Src-Überexpression nachweisbar.

Eine Invadopodiaausbildung der Src-überexprimierenden B35-Zellen könnte ein Grund für ihre erhöhte Invasivität, aber gleichzeitig unveränderten Migrationseigenschaften sein. Invadopodien unterscheiden sich von fokalen Kontakten und fokalen Adhäsionen, welche keine proteolytische Aktivität aufweisen (Chen (1989)). Wie bereits in 5.2.2 dargestellt, unterscheiden sich Zellmigration und -invasion dadurch, dass die Zellen bei einer Invasion durch die EZM hindurch migrieren und sie gleichzeitig abbauen, während sie bei der Zellmigration über die EZM migrieren. So ist es nicht weiter verwunderlich, dass sich die Signalkaskaden, welche in eine dreidimensionale Migration involviert sind, von der einer zweidimensionalen unterscheiden können (Cukierman *et al.* (2002), Webb und Horwitz (2003)).

Analysen von Coopman *et al.* (1998) mit mehreren Brustkrebszelllinien zeigten eine enge Korrelation zwischen dem invasiven Potential der Zellen *in vitro* und ihrer Fähigkeit Invadopodien zu bilden und eine Gelatinematrix zu verdauen. Viele membrangebundene, zytoplasmatische und sekretierte Proteine regulieren Invadopodien und haben unterschiedliche Rollen bei den zellulären Prozessen, wie bei der Zelladhäsion, bei Signaltransduktionen, bei der Aktinregulation, bei der Proteolyse der EZM und bei der Membrandynamik (Buccione *et al.* (2004), Linder (2007), Artym *et al.* (2006), Gimona *et al.* (2008)).

Darüber hinaus sind einige Proteine, welche mit Src interagieren, in Invadopodien angereichert. Das ist nicht nur in Src-transformierten Zellen der Fall, sondern auch bei vielen Tumorzell-abgeleiteten Zelllinien. Unter diesen Proteinen sind die aktinnukleationsfördernden Faktoren, Cortactin (Bowden *et al.* (1999), Artym *et al.* (2006), Bowden *et al.* (2006), Webb *et al.* (2006)), N-WASP (Yamaguchi *et al.* (2005a), Lorenz *et al.* (2004), Mizutani *et al.* (2002), Park *et al.* (2005)), das Arf GTPasen aktivierende Protein (Arf GAP) AMAP1/ASAP1 (Onodera *et al.* (2005),

Bharti *et al.* (2007)), Paxillin (Bowden *et al.* (1999), Badowski *et al.* (2008)) und das Tks5/Fish Adaptorprotein (Seals *et al.* (2005), Abram *et al.* (2003)). Die Manipulation der Expressionslevel oder der Aktivitäten dieser Proteine durch RNAi, dominant negative Mutanten oder inhibierende Antikörper haben bestätigt, dass Cortactin (Bowden *et al.* (1999), Artym *et al.* (2006), Clark *et al.* (2007)), N-WASP (Yamaguchi *et al.* (2005a), Mizutani *et al.* (2002)), AMAP1/ASAP1 (Onodera *et al.* (2005), Bharti *et al.* (2007)) und Tks5/Fish (Seals *et al.* (2005)) notwendig sind für den invadopodienabhängigen Matrixabbau bei einigen Tumorzelllinien. Darüber hinaus korrelieren inhibitorische Effekte auf die Invadopodienbildung durch Tks5/Fish oder AMAP1/ASAP1 mit einer reduzierten Invasivität der Zellen in einen Matrigel Invasionsassay (Seals *et al.* (2005), Onodera *et al.* (2005)).

Dementsprechend können einige Proteine in die Src-Signalkaskaden bei den B35-Zellen nach einer Src-Überexpression involviert sein, welche die Invadopodienausbildung initiieren und auch die damit verbundene Invasion durch Matrixabbau fördern, aber die Migrationseigenschaften nicht verbessern können.

#### **5.3.4.3 Auswirkungen der Src-GFP-Überexpression auf die N3EFL-Zellen**

Die Src-GFP-Überexpression in den N3EFL-Zellen bewirkte eine signifikante Steigerung der mittleren Migrationsgeschwindigkeit (s. Abbildung 18) sowie der Invasivität (s. Abbildung 32). Konfokale Aufnahmen der Zellen ließen Rückschlüsse zu, dass eine Überexpression dieses Fusionskonstruktes die Bildung von invadopodienartigen Zellfortsätzen *in vitro* initialisierte. Bipolare gliale Vorläuferzellen wiesen in Folge einer Src-Überexpression seitlich abstehende, dünne filopodienartige und Src-angereicherte Fortsätze auf (s. Abbildung 40).

Hinzu kommt, dass festgestellt werden konnte, dass Src an der Vordifferenzierung glialer Vorläuferzellen in Richtung der Oligodendrozyten beteiligt zu sein scheint. Nach einer Überexpression in den N3EFL-Zellen konnte eine Kolokalisation des resultierenden Fluoreszenzsignals mit dem A2B5-Marker eruiert werden (s. Abbildung 43). Die Expression des A2B5-Antigens durch Zellen ist nach den Befunden von Blakemore *et al.* (1994) eine gute Voraussetzung für eine Remyelinisierung. Warrington *et al.* (1993) haben durch die Transplantation von verschiedenen Oligodendrozytenstadien (A2B5+O4-, O4+GalC-, and GalC+) in das Telencephalon hypomyelinisierender Mäuse (*shiverer*) herausgefunden, dass die beste Remyelinisierung durch A2B5-positive Vorläuferzellen erreicht wird. Konfokale

Untersuchungen von 225 µm dicken Gewebeschnitten ergaben, dass diese Zellen 30 Tage nach der Transplantation die meisten MBP (*myelin basic protein*) positiven Stellen im gesamten Gehirn erzielten.

#### **5.3.4.4 Schlussfolgerungen aus den Src-Experimenten**

Zusammenfassend zu den positiven Effekten einer Src-GFP-Überexpression kann festgehalten werden, dass die Neuroblastomzellen und die glialen Vorläuferzellen vermutlich in Folge einer verstärkten Invadopodienausbildung invasiver wurden. Zur Verifizierung der Annahme, dass es sich um Invadopodien handelte, könnten noch weitere Versuche folgen. Es existiert zwar kein einzelner spezifischer Marker zur Invadopodienfärbung (Stylli *et al.* (2008)), aber die Kolo-kalisation von Phosphotyrosinen und Cortactin ist ein guter Marker für aktive Invadopodien, welche die Matrix abbauen (Bowden *et al.* (2006)). Generell finden in Invadopodien oft Tyrosinphosphorylierungen statt (Mueller *et al.* (1992)). Außerdem existiert ein *in vitro* assay, um aktive Invadopodien zu detektieren (Chen *et al.* (1984), Yamaguchi *et al.* (2006), Artym *et al.* (2006)). Aber auch ohne die weiterführenden Tests ist es nahe liegend, dass aufgrund der vorangegangenen Argumentationen bei beiden Zelllinien verstärkt Invadopodien in Folge einer Src-GFP-Überexpression induziert wurden.

Beide Zelllinien, sowohl die N3EFL-Zellen als auch die B35-Neuroblastomzellen exprimierten endogen die Src-Tyrosinkinase (s. Abbildung 33 und Abbildung 35). Trotzdem hatte die Überexpression des GFP-Fusionskonstruktes verschiedene Auswirkungen auf die Zellmigration beider Zelllinien. Die N3EFL-Zellmigration wurde positiv beeinflusst und die B35-Zellmigration blieb im Mittel unverändert. Die Src-Tyrosinkinase ist in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert. Die SFK im Allgemeinen werden in Folge der Signalketten vieler verschiedener Klassen von Rezeptoren aktiviert und sind damit an einem großen Spektrum von Rezeptor-induzierten biologischen Prozessen beteiligt (Thomas und Brugge (1997)). Dies könnte der Grund dafür sein, dass die Resultate bezüglich der Migration bei den B35-Zellen und den N3EFL-Zellen differierten. Dies kann dem Vorangegangenen entsprechend sehr viele Gründe haben. Unter anderem wurden beide Zelllinien nach unterschiedlichen Protokollen kultiviert. Verschiedene Kulturmedien im zweidimensionalen Migrationsassay könnten ggf. unterschiedliche Signalkaskaden der Src-Kinase angeregt haben, welche voneinander abweichende Effekte auf die

Zellmigration zur Folge hatten. Ein expliziter Grund für diese Differenzen konnte basierend auf den durchgeführten Versuchen nicht genannt, aber in unterschiedlichen Signaltransduktionswegen dieser Zellen vermutet werden.

Vor dem Hintergrund dieser Arbeit ist das wichtigste Resultat jedoch, dass Src aufgrund der positiven Resultate hinsichtlich Migration und Invasion bei den N3EFL-Zellen ein interessantes Kandidatengenen für die exogene Therapie geschädigten ZNS sein könnte.

Somit könnte die Transplantation Src-überexprimierender glialer Vorläuferzellen in das ZNS zielführend sein. Die Zellen sind invasiver und scheinen aufgrund der Kollokalisierung mit A2B5 zur Remyelinisierung prädestiniert zu sein.

### **5.3.5 EGFR als Positivkontrolle**

Die Überexpression des EGFR-GFP-Fusionskonstruktes wurde in dieser Arbeit basierend auf den Studien von Aguirre *et al.* (2005) als Positivkontrolle für die Migrations- und Invasionsexperimente genutzt (s. 1.3.3.2). Dabei standen besonders die Resultate der Versuche mit den N3EFL-Zellen im Fokus des Interesses, da diese in Zukunft ggf. für Transplantationsstudien zum Einsatz kommen könnten. Ihre mittlere Migrationsgeschwindigkeit, sowie die Richtungspersistenz konnten nach einer EGFR-Überexpression statistisch höchst signifikant gesteigert werden (s. Abbildung 16 und Abbildung 17). Darüber hinaus wurde sowohl die Invasivität der B35-Zellen höchst (s. Abbildung 30), als auch die der N3EFL-Zellen hoch (s. Abbildung 32) statistisch signifikant in Folge einer EGFR-GFP-Überexpression verbessert.

Obwohl der EGFR-Signalweg als wichtig für die Ausbildung von adulten Astrozyten identifiziert wurde (Liu und Neufeld (2003), Liu und Neufeld (2004a), Liu *et al.* (2006a)), konnten Aguirre *et al.* (2007) nachweisen, dass das EGFR Targeting in die Oligodendrozytenregeneration und in die Myelinreparatur involviert ist. Genau wie bei der Src-GFP-Überexpression konnte eine Kollokalisierung des EGFR-GFP-Fusionskonstruktes in den N3EFL-Zellen mit A2B5 detektiert werden (s. Abbildung 43). Auch in diesem Falle versprachen A2B5-positive Zellen nach den Studien von Blakemore *et al.* (1994) gute Voraussetzungen für die Remyelinisierung, was neben der gesteigerten Migration und Invasion der EGFR-GFP-überexprimierenden N3EFL-Zellen positive Bedingungen für eine exogene Therapie implizierten. Dementsprechend konnte EGFR als Positivkontrolle verifiziert werden. Darüber

hinaus kann festgehalten werden, dass sich die Überexpression dieses Fusionskonstruktes in den N3EFL-Zellen aufgrund der positiven Resultate dieser Arbeit für Transplantationsstudien gut eignen würde.



## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Dissertation wurde nach molekularen Mechanismen gesucht, durch welche die Migration von aus embryonalen Stammzellen abgeleiteten glialen Vorläuferzellen *in vitro* und *in situ* gesteigert werden kann. Solche Mechanismen sollen zur Verbesserung der Effizienz einer Therapie z.B. der Metachromatischen Leukodystrophie, einer demyelinisierenden lysosomalen Speicherkrankheit des ZNS, genutzt werden.

Migrationstest: Die Wirkung von Kandidatengen auf die Zellmigration wurde mittels Zeitraffervideomikroskopie von transient transfizierten neuronalen Vorläuferzellen untersucht. Diese Studien wurden zunächst an B35-Neuroblastomzellen der Ratte durchgeführt, um die Methodik zu etablieren. Anschließend erfolgten entsprechende Untersuchungen an aus embryonalen Stammzellen der Maus abgeleiteten glialen Vorläuferzellen. Hierbei erwies es sich als notwendig, die zu testenden cDNAs als GFP-Fusionskonstrukte zu transfizieren. Die Zeitrafferaufnahmen wurden in 96-well-Kulturschalen durchgeführt. Es ist nicht gelungen, eine automatisierte Bildauswertung anzuwenden. Stattdessen mussten die Zelltrajektorien manuell ermittelt werden, was sich als limitierend für den Analysendurchsatz erwies. Deshalb wurden die Studien auf die ersten mit dieser Methode erhaltenen Treffer für migrationssteigernde Gene beschränkt.

Invasivitätstest: Zur Verifizierung der Treffer des Migrationstests wurden Invasivitätstests an organotypischen Slicekulturen des Hippocampus der Ratte durchgeführt. Diese Experimente wurden zunächst mit Hilfe von transient transfizierten B35-Neuroblastomzellen durchgeführt, die auf die Slicekulturen transplantiert wurden. Die *slices* wurden nach drei Tagen fixiert. Durch konfokale Mikroskopie wurde die Eindringtiefe der Zellen in das Gewebe gemessen. Die mikroskopische Bildaufnahme und Auswertung waren äußerst zeitintensiv. Erfolgreiche Invasionstests mit ES-Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen gelangen nach transients Nucleofektion.

B35-Neuroblastomzellen: Durch die manuelle Pfadbestimmung von Zellen konnte der Hyaluronanrezeptor CD44 als migrationssteigernd für B35-Neuroblastomzellen identifiziert werden. CD44 steigerte auch das invasive Wachstum in organotypischen Slicekulturen des Gehirns. Auch aus der Überexpression von Src oder EGFR resultierte eine verbesserte Invasivität der B35-Zellen. In weiterführenden Studien mit

CD44 (Böckenhoff (2008)) oder Src konnte gezeigt werden, dass die Bildung von filopodienähnlichen Strukturen gefördert wird, was *in situ* durch Zwei-Photonen-Mikroskopie nachweisbar war.

ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen: Im Migrationstest mit transient transfizierten glialen Vorläuferzellen wurde die ausgeprägteste migrationssteigernde Wirkung für EGFR und Src gefunden. CD44 steigerte die Migration der ES-Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen im Gegensatz zu seiner Wirkung auf B35-Neuroblastomzellen nicht. Dies könnte damit in Zusammenhang stehen, dass die glialen Vorläuferzellen bereits ausreichende Mengen an endogenem CD44 besitzen. Möglicherweise induziert eine Überexpression von Hyaluronan-Synthasen und/oder Hyaluronidasen eine migrationssteigernde Wirkung. Dies müsste in Zukunft getestet werden. Nach der Transplantation von transient transfizierten glialen Vorläuferzellen in die Gewebeschnitte des Hippocampus zeigte sich eine invasivitätssteigernde Wirkung von Src und EGFR. Somit wurden in der Dissertation zwei migrations- und invasivitätssteigernde Gene für aus ES-Zellen-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen identifiziert und charakterisiert. Allerdings waren die beobachteten invasionsfördernden Wirkungen geringer ausgeprägt als im Falle der B35-Neuroblastomzellen. Dies wirft die Frage auf, ob der durch eine Überexpression von EGFR und/oder Src erreichbare Motilitätszuwachs zu einer wesentlich gesteigerten Integration von glialen Vorläuferzellen in das Gehirn von Versuchstieren führen wird. Dies bleibt in Zukunft zu testen. Für eine Transplantation ins Tier wären dann zunächst gliale Vorläuferzellen, welche ein entsprechendes Kandidatengen überexprimieren von Interesse. Die Zellen könnten in ein Tiermodell einer humanen Myelinerkrankung transplantiert werden, wie sie zum Beispiel in den Studien von Brüstle *et al.* (1999) oder von Klein *et al.* (2006) verwendet wurden. Im Falle der MLD könnte ein weiter entwickeltes Mausmodell (Ramakrishnan *et al.* (2007)) zum Einsatz kommen. Bei einem nicht genügenden Erfolg einer Überexpression migrations- und invasionssteigernder Gene bleibt die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass die Proliferation und das Überleben von glialen Vorläuferzellen im Gehirngewebe nach einer Transplantation wichtige weitere Ansatzpunkte für eine Optimierung der Zellersatztherapie sein könnten.

Übertragung der Ergebnisse auf andere Zelltypen: In letzter Zeit wurden eine Reihe anderer Zelltypen als Basis einer Zellersatztherapie von ZNS-Erkrankungen verfügbar, die nicht von embryonalen Stammzellen abgeleitet werden müssen. Dies

würde die kritisch bewertete Verwendung humaner embryonaler Stammzellen zu Therapiezwecken überflüssig machen (Scott (2008a)). Jüngst ist es zum Beispiel Glaser *et al.* (2008) gelungen multipotente adulte Stammzellen mit ähnlichen Eigenschaften, wie die der embryonalen Stammzellen, von murinen spermatogonialen Stammzellen abzuleiten. Diese Zellen exprimierten pluripotente Marker und differenzierten in alle drei Keimblätter. Die Zellen bieten eine vielseitige und potentiell autologe Quelle für Neurone und Gliazellen, welche ebenfalls in Transplantationsstudien eingesetzt werden könnten. Eine weitere Alternative würden induzierbare pluripotente Stammzellen (iPS) bieten. In den letzten Jahren wurden immer mehr die Möglichkeiten der iPS diskutiert. iPS werden aus autologen Körperzellen, wie Fibroblasten, generiert (Sher *et al.* (2008)). Amabile und Meissner (2009) zum Beispiel beschreiben, dass diese Zellen durch die Überexpression bestimmter Transkriptionsfaktoren wieder umprogrammiert werden können. Die Autoren erklären, dass iPS einen normalen Karyotypen aufweisen und ES-Zell-charakterisierende Gene exprimieren. Zudem behalten diese Zellen das Potential in alle drei Keimblätter ausdifferenzieren zu können. Amabile und Meissner (2009) kommen zu der Schlussfolgerung, dass iPS ein vergleichbares Entwicklungspotential, wie ES-Zellen aufweisen. Auch iPS könnten durch die Transfektion einer Kombination aus bestimmten Transkriptionsfaktoren zu migrationsfähigen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen vordifferenziert werden (Sher *et al.* (2008)). Aus diesem Grunde wäre die Verwendung dieser Zellen für Transplantationsstudien ebenfalls denkbar. Aber auch solche Zellen müssten sich natürlich möglichst homogen im betroffenen Gewebe verteilen.

Die Kenntnisse über die Migrations- sowie Invasionseigenschaften und ihre Optimierbarkeit sind also in jedem Fall für eine derartige Therapieform essentiell. An dieser Stelle könnte die vorliegende Arbeit, mit den etablierten Testmethoden und den identifizierten migrations- und invasionssteigernden Genen, auch für den Einsatz anderer Zelllinien nützlich sein.

## 7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung des Migrations- sowie Invasionspotentials von aus embryonalen Stammzellen abgeleiteten glialen Vorläuferzellen, um die Effizienz einer Zellersatztherapie von Läsionen des Zentralen Nervensystems zu verbessern. Die positive Beeinflussung von Zellmigration und -invasion sollte dazu führen, dass sich die Zellen nach einer Transplantation ins ZNS möglichst weit und homogen im Gewebe verteilen, um so auch globale Läsionen therapieren zu können. Durch ein *screening* von Kandidatengenomen sollten Gene identifiziert werden, welche die Zellmigration und -invasion fördern. Dazu wurde eine Sammlung von cDNA-Konstrukten erstellt, welche die Expression der Kandidatengene als GFP-Fusionsproteine erlaubte.

Es wurden Testsysteme aufgebaut, mit deren Hilfe die Zellmigration durch mikroskopische Zeitrafferaufnahmen und das invasive Wachstum durch konfokale Mikroskopie von Gewebeschnitten des Gehirns untersucht werden konnte.

Zur Etablierung dieser Methoden wurden B35-Neuroblastomzellen der Ratte herangezogen. Die B35-Zellen dienen als Modell für neurale Vorläuferzellen. Von diesen Zellen ist bekannt, dass sie eine hohe Migrationsfähigkeit aufweisen. Da es sich bei den B35-Zellen aber um eine Tumorzelllinie handelt, eignen sich diese nicht für die Zellersatztherapie. Aus diesem Grunde wurden die weiteren Versuche mit aus ES-Zellen der Maus abgeleiteten glialen Vorläuferzellen, den N3EFL-Zellen, durchgeführt. N3EFL-Zellen können zu einer Zellersatztherapie eingesetzt werden.

Es wurden zwei Kandidatengene identifiziert, welche nach transienter Überexpression in beiden Zelltypen positive Auswirkungen auf die Migrations- und/oder Invasionsfähigkeit hatten. Dabei handelte es sich um den Tyrosinkinase-Rezeptor EGFR und die cytosolische Tyrosinkinase Src. Zusätzlich resultierte aus der transienten Überexpression des CD44-Gens bei den B35-Zellen eine Verbesserung der Migrations- und Invasionseigenschaften. CD44 ist ein Rezeptor für Hyaluronan, welches in der extrazellulären Matrix des Gehirns weit verbreitet ist.

Darüber hinaus wurden die Morphologie, die Differenzierung und die Proliferation nach einer transienten Überexpression dieser drei Kandidatengene untersucht.

Auf der Grundlage dieser Studien kann in Zukunft untersucht werden, ob die Überexpression der hier identifizierten migrations- und invasionssteigernden Gene eine verbesserte Zellersatztherapie globaler Läsionen des ZNS erlaubt.

## 8 Literaturverzeichnis

1. **Abram and Courtneidge.** (2000). Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res* 254, 1-13.
2. **Abram, Seals, Pass, Salinsky et al.** (2003). The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J Biol Chem* 278, 16844-51.
3. **Adamson, Paterson and Hall.** (1992). Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol* 119, 617-27.
4. **Aguirre, Dupree, Mangin and Gallo.** (2007). A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. *Nat Neurosci* 10, 990-1002.
5. **Aguirre, Rizvi, Ratner and Gallo.** (2005). Overexpression of the epidermal growth factor receptor confers migratory properties to nonmigratory postnatal neural progenitors. *J Neurosci* 25, 11092-106.
6. **Akiyama, Tooyama, Kawamata, Ikeda et al.** (1993). Morphological diversities of CD44 positive astrocytes in the cerebral cortex of normal subjects and patients with Alzheimer's disease. *Brain Res* 632, 249-59.
7. **Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison et al.** (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-8.
8. **Alberts.** (2004). Molekularbiologie der Zelle. 4. Auflage
9. **Albini, Iwamoto, Kleinman, Martin et al.** (1987). A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 47, 3239-45.
10. **Amabile and Meissner.** (2009). Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med* 15, 59-68.
11. **Angers-Loustau, Hering, Werbowetski, Kaplan et al.** (2004). SRC regulates actin dynamics and invasion of malignant glial cells in three dimensions. *Mol Cancer Res* 2, 595-605.
12. **Aratyn, Schaus, Taylor and Borisy.** (2007). Intrinsic dynamic behavior of fascin in filopodia. *Mol Biol Cell* 18, 3928-40.
13. **Artym, Zhang, Seillier-Moiseiwitsch, Yamada et al.** (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res* 66, 3034-43.
14. **Aruffo, Stamenkovic, Melnick, Underhill et al.** (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303-13.
15. **Austin, Balasubramanian, Pattabiraman, Saraswathi et al.** (1963). A Controlled Study Of Enzymic Activities In Three Human Disorders Of Glycolipid Metabolism. *J Neurochem* 10, 805-16.
16. **Ayala, Baldassarre, Caldieri and Buccione.** (2006). Invadopodia: a guided tour. *Eur J Cell Biol* 85, 159-64.
17. **Badowski, Pawlak, Grichine, Chabadel et al.** (2008). Paxillin phosphorylation controls invadopodia/podosomes spatiotemporal organization. *Mol Biol Cell* 19, 633-45.
18. **Baier, Baader, Jankowski, Gieselmann et al.** (2007). Hyaluronan is organized into fiber-like structures along migratory pathways in the developing mouse cerebellum. *Matrix Biol* 26, 348-58.
19. **Bain, Kitchens, Yao, Huettner et al.** (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168, 342-57.

20. **Baumann and Pham-Dinh.** (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81, 871-927.
21. **Bellail, Hunter, Brat, Tan et al.** (2004). Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1046-69.
22. **Belsches, Haskell and Parsons.** (1997). Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis. *Front Biosci* 2, d501-18.
23. **Benda, Lightbody, Sato, Levine et al.** (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161, 370-1.
24. **Berg.** (2007). Stryer Biochemie. 6. Auflage.
25. **Bharti, Inoue, Bharti, Hirsch et al.** (2007). Src-dependent phosphorylation of ASAP1 regulates podosomes. *Mol Cell Biol* 27, 8271-83.
26. **Bignami, Eng, Dahl and Uyeda.** (1972). Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43, 429-35.
27. **Birnboim and Doly.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.
28. **Bittner, Meltzer, Chen, Jiang et al.** (2000). Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406, 536-40.
29. **Bjorklund.** (1991). Neural transplantation--an experimental tool with clinical possibilities. *Trends Neurosci* 14, 319-22.
30. **Blakemore, Franklin and Crang.** (1994). Repair of demyelinated lesions by glial cell transplantation. *J Neurol* 242, S61-3.
31. **Böckenhoff.** (2008). Regulation der Migration neuraler Vorläuferzellen durch Hyaluronan. In *der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät*, vol. Diplomarbeit, pp. 109. Bonn: Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
32. **Boggon and Eck.** (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23, 7918-27.
33. **Bourguignon.** (2001a). CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6, 287-97.
34. **Bourguignon.** (2008). Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Semin Cancer Biol* 18, 251-9.
35. **Bourguignon, Gilad, Peyrollier, Brightman et al.** (2007). Hyaluronan-CD44 interaction stimulates Rac1 signaling and PKN gamma kinase activation leading to cytoskeleton function and cell migration in astrocytes. *J Neurochem* 101, 1002-17.
36. **Bourguignon, Iida, Welsh, Zhu et al.** (1995). Involvement of CD44 and its variant isoforms in membrane-cytoskeleton interaction, cell adhesion and tumor metastasis. *J Neurooncol* 26, 201-8.
37. **Bourguignon, Lokeshwar, He, Chen et al.** (1992). A CD44-like endothelial cell transmembrane glycoprotein (GP116) interacts with extracellular matrix and ankyrin. *Mol Cell Biol* 12, 4464-71.
38. **Bourguignon, Singleton and Diedrich.** (2004). Hyaluronan-CD44 interaction with Rac1-dependent protein kinase N-gamma promotes phospholipase Cgamma1 activation, Ca(2+) signaling, and cortactin-cytoskeleton function leading to keratinocyte adhesion and differentiation. *J Biol Chem* 279, 29654-69.
39. **Bourguignon, Zhu, Shao and Chen.** (2001). CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. *J Biol Chem* 276, 7327-36.
40. **Bourguignon, Zhu and Zhu.** (1998). CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression. *Front Biosci* 3, d637-49.

- 41. Bouvier-Labit, Liprandi, Monti, Pellissier et al.** (2002). CD44H is expressed by cells of the oligodendrocyte lineage and by oligodendrogliomas in humans. *J Neurooncol* 60, 127-34.
- 42. Bowden, Barth, Thomas, Glazer et al.** (1999). An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene* 18, 4440-9.
- 43. Bowden, Onikoyi, Slack, Myoui et al.** (2006). Co-localization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 312, 1240-53.
- 44. Breyer, Hussein, Radu, Putz et al.** (2000). Disruption of intracerebral progression of C6 rat glioblastoma by in vivo treatment with anti-CD44 monoclonal antibody. *J Neurosurg* 92, 140-9.
- 45. Brock, Vamosi, Vereb and Jovin.** (1999). Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10123-8.
- 46. Brown.** (1991). Essentials of neural development
- 47. Brüstle, Jones, Learish, Karram et al.** (1999). Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285, 754-6.
- 48. Buccione, Orth and McNiven.** (2004). Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 647-57.
- 49. Bunge.** (1968). Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol Rev* 48, 197-251.
- 50. Chen.** (1989). Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J Exp Zool* 251, 167-85.
- 51. Chen, Chen, Parsons and Parsons.** (1985). Local degradation of fibronectin at sites of expression of the transforming gene product pp60src. *Nature* 316, 156-8.
- 52. Chen, Olden, Bernard and Chu.** (1984). Expression of transformation-associated protease(s) that degrade fibronectin at cell contact sites. *J Cell Biol* 98, 1546-55.
- 53. Chen and Wang.** (1999). Specialized surface protrusions of invasive cells, invadopodia and lamellipodia, have differential MT1-MMP, MMP-2, and TIMP-2 localization. *Ann N Y Acad Sci* 878, 361-71.
- 54. Cheung, Cruz and Turley.** (1999). Receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM), a hyaladherin that regulates cell responses to growth factors. *Biochem Soc Trans* 27, 135-42.
- 55. Chiaramello, Dalmasso, Bezin, Marcel et al.** (2007). BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci* 26, 1780-90.
- 56. Chicoine and Silbergeld.** (1995). The in vitro motility of human gliomas increases with increasing grade of malignancy. *Cancer* 75, 2904-9.
- 57. Clark, Whigham, Yarbrough and Weaver.** (2007). Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res* 67, 4227-35.
- 58. Collett and Erikson.** (1978). Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2021-4.
- 59. Collis, Hall, Lange, Ziebell et al.** (1998). Rapid hyaluronan uptake is associated with enhanced motility: implications for an intracellular mode of action. *FEBS Lett* 440, 444-9.
- 60. Cooper, Gould, Cartwright and Hunter.** (1986). Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science* 231, 1431-4.
- 61. Coopman, Do, Thompson and Mueller.** (1998). Phagocytosis of cross-linked gelatin matrix by human breast carcinoma cells correlates with their invasive capacity. *Clin Cancer Res* 4, 507-15.

- 62. Cukierman, Pankov and Yamada.** (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol* 14, 633-9.
- 63. Culty, Nguyen and Underhill.** (1992). The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol* 116, 1055-62.
- 64. Cummings, Uchida, Tamaki, Salazar et al.** (2005). Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14069-74.
- 65. Dai.** (2005). Steuerung der Zellmigration durch Kollaps-Faktoren und Collapsin Response Mediator Protein 4 (Dissertation). In *der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät*, vol. Dissertation, pp. 101. Bonn: Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- 66. Dai, Alt, Schilling, Retzlik et al.** (2005). A fast and robust quantitative time-lapse assay for cell migration. *Exp Cell Res* 311, 272-80.
- 67. Davidson, Chow and Veillette.** (1997). Chk, a Csk family tyrosine protein kinase, exhibits Csk-like activity in fibroblasts, but not in an antigen-specific T-cell line. *J Biol Chem* 272, 1355-62.
- 68. Davis, Clemens, Macdonald and Lynch.** (2005). Sphingosine 1-phosphate analogs as receptor antagonists. *J Biol Chem* 280, 9833-41.
- 69. Day and Sheehan.** (2001). Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. *Curr Opin Struct Biol* 11, 617-22.
- 70. de Castro and Bribian.** (2005). The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development. *Brain Res Brain Res Rev* 49, 227-41.
- 71. De Wever and Mareel.** (2003). Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 200, 429-47.
- 72. Denk, Strickler and Webb.** (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-6.
- 73. Dey, She, Kim, Boruch et al.** (2000). Colony-stimulating factor-1 receptor utilizes multiple signaling pathways to induce cyclin D2 expression. *Mol Biol Cell* 11, 3835-48.
- 74. Drube, Stirnweiss, Valkova and Liebmann.** (2006). Ligand-independent and EGF receptor-supported transactivation: lessons from beta2-adrenergic receptor signalling. *Cell Signal* 18, 1633-46.
- 75. El-Shewy, Kelly, Barki-Harrington and Luttrell.** (2004). Ectodomain shedding-dependent transactivation of epidermal growth factor receptors in response to insulin-like growth factor type I. *Mol Endocrinol* 18, 2727-39.
- 76. Emsley, Knight, Farndale, Barnes et al.** (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell* 101, 47-56.
- 77. Engel.** (1992). Laminins and other strange proteins. *Biochemistry* 31, 10643-51.
- 78. Engstrom-Laurent.** (1997). Hyaluronan in joint disease. *J Intern Med* 242, 57-60.
- 79. Entwistle, Hall and Turley.** (1996). HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton. *J Cell Biochem* 61, 569-77.
- 80. Erlandsson, Larsson and Forsberg-Nilsson.** (2004). Stem cell factor is a chemoattractant and a survival factor for CNS stem cells. *Exp Cell Res* 301, 201-10.
- 81. Etienne-Manneville and Hall.** (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-35.
- 82. Euteneuer and Schliwa.** (1984). Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. *Nature* 310, 58-61.
- 83. Evans and Kaufman.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-6.
- 84. Faix and Rottner.** (2006). The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol* 18, 18-25.



- 85. Ferguson.** (2008). Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys* 37, 353-73.
- 86. Fermentas.** Handbuch, ExGen 500 in vitro Transfection Reagent #R0511.
- 87. Figura, Gieselmann and Jaeken.** (2001). Metachromatic leukodystrophy. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw-Hill*, 3695-3724.
- 88. Fincham, Unlu, Brunton, Pitts et al.** (1996). Translocation of Src kinase to the cell periphery is mediated by the actin cytoskeleton under the control of the Rho family of small G proteins. *J Cell Biol* 135, 1551-64.
- 89. Finley, Kulkarni and Huettner.** (1996). Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. *J Neurosci* 16, 1056-65.
- 90. Fischer, Hart and Ullrich.** (2006). Dissecting the epidermal growth factor receptor signal transactivation pathway. *Methods Mol Biol* 327, 85-97.
- 91. Flannery and Spurney.** (2006). Transactivation of the epidermal growth factor receptor by angiotensin II in glomerular podocytes. *Nephron Exp Nephrol* 103, e109-18.
- 92. Fraichard, Chassande, Bilbaut, Dehay et al.** (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci* 108 (Pt 10), 3181-8.
- 93. Frame, Fincham, Carragher and Wyke.** (2002). v-Src's hold over actin and cell adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 233-45.
- 94. Franco and Huttenlocher.** (2005). Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci* 118, 3829-38.
- 95. Franklin and Ffrench-Constant.** (2008). Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci* 9, 839-55.
- 96. Fraser, Laurent and Laurent.** (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 242, 27-33.
- 97. Friedl, Brocker and Zanker.** (1998). Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocytes and tumor cells. *Cell Adhes Commun* 6, 225-36.
- 98. Geiger, Bershadsky, Pankov and Yamada.** (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 793-805.
- 99. Gentile and Comoglio.** (2004). Invasive growth: a genetic program. *Int J Dev Biol* 48, 451-6.
- 100. Giese, Loo, Rief, Tran et al.** (1995). Substrates for astrocytoma invasion. *Neurosurgery* 37, 294-301; discussion 301-2.
- 101. Giese and Westphal.** (1996). Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* 39, 235-50; discussion 250-2.
- 102. Gieselmann.** (2008). Metachromatic leukodystrophy: genetics, pathogenesis and therapeutic options. *Acta Paediatr Suppl* 97, 15-21.
- 103. Gimona, Buccione, Courtneidge and Linder.** (2008). Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr Opin Cell Biol* 20, 235-41.
- 104. Girgrah, Ackerley and Moscarello.** (1991). Localization of CD44 (P80) on the external surface of a human astrocytoma cell. *Neuroreport* 2, 441-4.
- 105. Girgrah, Letarte, Becker, Cruz et al.** (1991a). Localization of the CD44 glycoprotein to fibrous astrocytes in normal white matter and to reactive astrocytes in active lesions in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 50, 779-92.
- 106. Glaser, Opitz, Kischlat, Konang et al.** (2008). Adult germ line stem cells as a source of functional neurons and glia. *Stem Cells* 26, 2434-43.

- 107. Glaser, Perez-Bouza, Klein and Brüstle.** (2005). Generation of purified oligodendrocyte progenitors from embryonic stem cells. *Faseb J* 19, 112-4.
- 108. Glaser, Pollard, Smith and Brüstle.** (2007). Tripotential differentiation of adherently expandable neural stem (NS) cells. *PLoS ONE* 2, e298.
- 109. Gross, Beck, Beretta, Jackson et al.** (1995). CD44 expression and modulation on human neuroblastoma tumours and cell lines. *Eur J Cancer* 31A, 471-5.
- 110. Gross, Beretta, Peruisseau, Jackson et al.** (1994). CD44H expression by human neuroblastoma cells: relation to MYCN amplification and lineage differentiation. *Cancer Res* 54, 4238-42.
- 111. Guan, Xu, Jin, Yuan et al.** (2007). Long-range Ca<sup>2+</sup> signaling from growth cone to soma mediates reversal of neuronal migration induced by slit-2. *Cell* 129, 385-95.
- 112. Gunia, Hussein, Radu, Putz et al.** (1999). CD44s-targeted treatment with monoclonal antibody blocks intracerebral invasion and growth of 9L gliosarcoma. *Clin Exp Metastasis* 17, 221-30.
- 113. Hagel and Stavrou.** (1999). CD44 expression in primary and recurrent oligodendrogliomas and in adjacent gliotic brain tissue. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25, 313-8.
- 114. Hall, Lange, Prober, Zhang et al.** (1996). pp60(c-src) is required for cell locomotion regulated by the hyaluronanreceptor RHAMM. *Oncogene* 13, 2213-24.
- 115. Hamaguchi, Yamaguchi, Suda, Iwama et al.** (1996). Analysis of CSK homologous kinase (CHK/HYL) in hematopoiesis by utilizing gene knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 172-9.
- 116. Hardy and Reynolds.** (1993). Neuron-oligodendroglial interactions during central nervous system development. *J Neurosci Res* 36, 121-6.
- 117. Harris, Chung and Coffey.** (2003). EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 284, 2-13.
- 118. Hecker, Kappler, Glassmann, Schilling et al.** (2008). Image analysis of time-lapse movies--a precision control guided approach to correct motion artefacts. *J Neurosci Methods* 172, 67-73.
- 119. Higgs and Pollard.** (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 150, 1311-20.
- 120. Hong, Munugalavadla and Kapur.** (2004). c-Kit-mediated overlapping and unique functional and biochemical outcomes via diverse signaling pathways. *Mol Cell Biol* 24, 1401-10.
- 121. Horwitz and Webb.** (2003). Cell migration. *Curr Biol* 13, R756-9.
- 122. Hsia, Lim, Bernard-Trifilo, Mitra et al.** (2005). Integrin alpha4beta1 promotes focal adhesion kinase-independent cell motility via alpha4 cytoplasmic domain-specific activation of c-Src. *Mol Cell Biol* 25, 9700-12.
- 123. Hua, Knudson and Knudson.** (1993). Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis. *J Cell Sci* 106 (Pt 1), 365-75.
- 124. Huebener, Abou-Khamis, Zymek, Bujak et al.** (2008). CD44 is critically involved in infarct healing by regulating the inflammatory and fibrotic response. *J Immunol* 180, 2625-33.
- 125. Hunter and Sefton.** (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1311-5.
- 126. Hwang, Smith, Salhia and Rutka.** (2008). The role of fascin in the migration and invasiveness of malignant glioma cells. *Neoplasia* 10, 149-59.
- 127. Iannaccone, Taborn, Garton, Caplice et al.** (1994). Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev Biol* 163, 288-92.

- 128. Ikeda, Nakao, Asou, Toya et al.** (1996). Expression of CD44H in the cells of neural crest origin in peripheral nervous system. *Neuroreport* 7, 1713-6.
- 129. Itano and Kimata.** (2002). Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life* 54, 195-9.
- 130. Jarjour and Kennedy.** (2004). Oligodendrocyte precursors on the move: mechanisms directing migration. *Neuroscientist* 10, 99-105.
- 131. Jarjour, Manitt, Moore, Thompson et al.** (2003). Netrin-1 is a chemorepellent for oligodendrocyte precursor cells in the embryonic spinal cord. *J Neurosci* 23, 3735-44.
- 132. Jiang, Liang and Noble.** (2007). Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 435-61.
- 133. Jones, Liu, Shen, Werner et al.** (2000). Regulation of the cell adhesion molecule CD44 after nerve transection and direct trauma to the mouse brain. *J Comp Neurol* 426, 468-92.
- 134. Keller, Schmidt, Wittbrodt and Stelzer.** (2008). Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science* 322, 1065-9.
- 135. Kelly, Mueller, Yeh and Chen.** (1994). Invadopodia promote proteolysis of a wide variety of extracellular matrix proteins. *J Cell Physiol* 158, 299-308.
- 136. Kim, Lee, Choe, Lee et al.** (2008). CD44-epidermal growth factor receptor interaction mediates hyaluronic acid-promoted cell motility by activating protein kinase C signaling involving Akt, Rac1, Phox, reactive oxygen species, focal adhesion kinase, and MMP-2. *J Biol Chem* 283, 22513-28.
- 137. Klein, Schmandt, Muth-Kohne, Perez-Bouza et al.** (2006). Embryonic stem cell-based reduction of central nervous system sulfatide storage in an animal model of metachromatic leukodystrophy. *Gene Ther* 13, 1686-95.
- 138. Koegl, Zlatkine, Ley, Courtneidge et al.** (1994). Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem J* 303 (Pt 3), 749-53.
- 139. Konig, Ponta and Herrlich.** (1998). Coupling of signal transduction to alternative pre-mRNA splicing by a composite splice regulator. *Embo J* 17, 2904-13.
- 140. Krivit, Peters and Shapiro.** (1999). Bone marrow transplantation as effective treatment of central nervous system disease in globoid cell leukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, mannosidosis, fucosidosis, aspartylglucosaminuria, Hurler, Maroteaux-Lamy, and Sly syndromes, and Gaucher disease type III. *Curr Opin Neurol* 12, 167-76.
- 141. Krystal, DeBerry, Linnekin and Litz.** (1998). Lck associates with and is activated by Kit in a small cell lung cancer cell line: inhibition of SCF-mediated growth by the Src family kinase inhibitor PP1. *Cancer Res* 58, 4660-6.
- 142. Kuppner, Van Meir, Gauthier, Hamou et al.** (1992). Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumours. *Int J Cancer* 50, 572-7.
- 143. Kypta, Goldberg, Ulug and Courtneidge.** (1990). Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases. *Cell* 62, 481-92.
- 144. Lamontagne and Grandbois.** (2008). PKC-induced stiffening of hyaluronan/CD44 linkage; local force measurements on glioma cells. *Exp Cell Res* 314, 227-36.
- 145. Lauffenburger and Horwitz.** (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-69.
- 146. Laurent.** (1998). The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives. *Portland Press*.
- 147. Lee and Spicer.** (2000). Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol* 12, 581-6.

- 148. Legg and Isacke.** (1998). Identification and functional analysis of the ezrin-binding site in the hyaluronan receptor, CD44. *Curr Biol* 8, 705-8.
- 149. Legg, Lewis, Parsons, Ng et al.** (2002). A novel PKC-regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility. *Nat Cell Biol* 4, 399-407.
- 150. Lesley, Hyman and Kincade.** (1993). CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 54, 271-335.
- 151. Leu and Maa.** (2003). Functional implication of the interaction between EGF receptor and c-Src. *Front Biosci* 8, s28-38.
- 152. Levinson, Oppermann, Levintow, Varmus et al.** (1978). Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell* 15, 561-72.
- 153. Lin and Chan.** (2003). Perturbation of CD44 function affects chiasmatic routing of retinal axons in brain slice preparations of the mouse retinofugal pathway. *Eur J Neurosci* 17, 2299-312.
- 154. Linder.** (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol* 17, 107-17.
- 155. Lindvall and Kokaia.** (2006). Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 441, 1094-6.
- 156. Lindvall, Kokaia and Martinez-Serrano.** (2004). Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 10 Suppl, S42-50.
- 157. Liu, Ahmad, Shu, Sanders et al.** (2006b). Accelerated repair of cortical bone defects using a synthetic extracellular matrix to deliver human demineralized bone matrix. *J Orthop Res* 24, 1454-62.
- 158. Liu, Chen, Johns and Neufeld.** (2006a). Epidermal growth factor receptor activation: an upstream signal for transition of quiescent astrocytes into reactive astrocytes after neural injury. *J Neurosci* 26, 7532-40.
- 159. Liu, Han, Wu, Tuohy et al.** (2004b). CD44 expression identifies astrocyte-restricted precursor cells. *Dev Biol* 276, 31-46.
- 160. Liu and Neufeld.** (2003). Activation of epidermal growth factor receptor signals induction of nitric oxide synthase-2 in human optic nerve head astrocytes in glaucomatous optic neuropathy. *Neurobiol Dis* 13, 109-23.
- 161. Liu and Neufeld.** (2004a). Activation of epidermal growth factor receptor causes astrocytes to form cribriform structures. *Glia* 46, 153-68.
- 162. Liu and Neufeld.** (2007). Activation of epidermal growth factor receptors in astrocytes: from development to neural injury. *J Neurosci Res* 85, 3523-9.
- 163. Liu, Shu, Gray and Prestwich.** (2004). Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin sponge: growth of fibrous tissue in vivo. *J Biomed Mater Res A* 68, 142-9.
- 164. Liu, Shu and Prestwich.** (2006). Osteochondral defect repair with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an injectable, in situ, cross-linked synthetic extracellular matrix. *Tissue Eng* 12, 3405-16.
- 165. Liu and Sy.** (1997). Phorbol myristate acetate stimulates the dimerization of CD44 involving a cysteine in the transmembrane domain. *J Immunol* 159, 2702-11.
- 166. Liu, Wu, Lee, Xue et al.** (2002). Oligodendrocyte and astrocyte development in rodents: an in situ and immunohistological analysis during embryonic development. *Glia* 40, 25-43.
- 167. Löffler and Petrides.** (2003). Biochemie und Pathobiochemie. 7. Auflage
- 168. Lokeshwar and Bourguignon.** (1992). The lymphoma transmembrane glycoprotein GP85 (CD44) is a novel guanine nucleotide-binding protein which regulates GP85 (CD44)-ankyrin interaction. *J Biol Chem* 267, 22073-8.
- 169. Lorenz, Yamaguchi, Wang, Singer et al.** (2004). Imaging sites of N-wasp activity in lamellipodia and invadopodia of carcinoma cells. *Curr Biol* 14, 697-703.

- 170. Lotz, Wang, Cance, Matthews et al.** (2003). Epidermal growth factor stimulation can substitute for c-Src overexpression in promoting breast carcinoma invasion. *J Surg Res* 109, 123-9.
- 171. Lowry, Rosebrough, Farr and Randall.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-75.
- 172. Luttrell, Luttrell and Parsons.** (1988). Augmented mitogenic responsiveness to epidermal growth factor in murine fibroblasts that overexpress pp60c-src. *Mol Cell Biol* 8, 497-501.
- 173. Machesky and Gould.** (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol* 11, 117-21.
- 174. Maejima, Ueba, Kuroki, Yasu et al.** (2003). Src family kinases and nitric oxide production are required for hepatocyte growth factor-stimulated endothelial cell growth. *Atherosclerosis* 167, 89-95.
- 175. Malatack, Consolini and Bayever.** (2003). The status of hematopoietic stem cell transplantation in lysosomal storage disease. *Pediatr Neurol* 29, 391-403.
- 176. Mallon, Shick, Kidd and Macklin.** (2002). Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development. *J Neurosci* 22, 876-85.
- 177. Martin.** (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-8.
- 178. Martin.** (2001). The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 467-75.
- 179. Mattila and Lappalainen.** (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 446-54.
- 180. Matzner, Lullmann-Rauch, Stroobants, Andersson et al.** (2009). Enzyme Replacement Improves Ataxic Gait and Central Nervous System Histopathology in a Mouse Model of Metachromatic Leukodystrophy. *Mol Ther.*
- 181. Matzner, Matthes, Weigelt, Andersson et al.** (2008). Non-inhibitory antibodies impede lysosomal storage reduction during enzyme replacement therapy of a lysosomal storage disease. *J Mol Med* 86, 433-42.
- 182. McDonald, Liu, Qu, Liu et al.** (1999). Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5, 1410-2.
- 183. Meijering, Jacob, Sarria, Steiner et al.** (2004). Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A* 58, 167-76.
- 184. Merzak, Koocheckpour and Pilkington.** (1994). CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro. *Cancer Res* 54, 3988-92.
- 185. Meyer and Palmer.** (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* 107, 629-634.
- 186. Miki and Takenawa.** (1998). Direct binding of the verprolin-homology domain in N-WASP to actin is essential for cytoskeletal reorganization. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 73-8.
- 187. Miller.** (1996). Oligodendrocyte origins. *Trends Neurosci* 19, 92-6.
- 188. Miller.** (2002). Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol* 67, 451-67.
- 189. Mizutani, Miki, He, Maruta et al.** (2002). Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res* 62, 669-74.

- 190. Mohamed, Rivas-Plata, Kraas, Saleh et al.** (2001). Src-class kinases act within the agrin/MuSK pathway to regulate acetylcholine receptor phosphorylation, cytoskeletal anchoring, and clustering. *J Neurosci* 21, 3806-18.
- 191. Monaghan, Mulligan, Gillespie, Trimble et al.** (2000). Epidermal growth factor up-regulates CD44-dependent astrocytoma invasion in vitro. *J Pathol* 192, 519-25.
- 192. Moon, Heo, Sim and Shin.** (2004). Upregulation of CD44 expression in the spinal cords of rats with clip compression injury. *Neurosci Lett* 367, 133-6.
- 193. Moon, Jeong, Kim, Ahn et al.** (2006). Expression of CD44 adhesion molecule in rat testis with ischemia/reperfusion injury. *J Vet Med Sci* 68, 761-4.
- 194. Moretto, Xu and Kim.** (1993). CD44 expression in human astrocytes and oligodendrocytes in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 52, 419-23.
- 195. Mueller and Chen.** (1991). Cellular invasion into matrix beads: localization of beta 1 integrins and fibronectin to the invadopodia. *J Cell Sci* 99 (Pt 2), 213-25.
- 196. Mueller, Gherzi, Akiyama, Sang et al.** (1999). A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *J Biol Chem* 274, 24947-52.
- 197. Mueller, Yeh and Chen.** (1992). Tyrosine phosphorylation of membrane proteins mediates cellular invasion by transformed cells. *J Cell Biol* 119, 1309-25.
- 198. Mullins.** (2000). How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr Opin Cell Biol* 12, 91-6.
- 199. Murai, Miyauchi, Yanagida and Sako.** (2006). Epidermal growth factor-regulated activation of Rac GTPase enhances CD44 cleavage by metalloproteinase disintegrin ADAM10. *Biochem J* 395, 65-71.
- 200. Murai, Miyazaki, Nishinakamura, Sugahara et al.** (2004). Engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration. *J Biol Chem* 279, 4541-50.
- 201. Nada, Okada, MacAuley, Cooper et al.** (1991). Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* 351, 69-72.
- 202. Nagano and Saya.** (2004). Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci* 95, 930-5.
- 203. Naor, Nedvetzki, Golan, Melnik et al.** (2002). CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 39, 527-79.
- 204. Naor, Sionov and Ish-Shalom.** (1997). CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 71, 241-319.
- 205. Naor, Sionov and Ish-Shalom.** (1997a). *Advances in Cancer Research*. Vol. 70
- 206. Neame, Uff, Sheikh, Wheatley et al.** (1995). CD44 exhibits a cell type dependent interaction with triton X-100 insoluble, lipid rich, plasma membrane domains. *J Cell Sci* 108 (Pt 9), 3127-35.
- 207. Neumann and Rosenheck.** (1972). Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J Membr Biol* 10, 279-90.
- 208. Ni, Hu, Sheng, Olson et al.** (2004). High-level expression of functional chemokine receptor CXCR4 on human neural precursor cells. *Brain Res Dev Brain Res* 152, 159-69.
- 209. Nicholson and Sykova.** (1998). Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci* 21, 207-15.
- 210. Nistor, Totoiu, Haque, Carpenter et al.** (2005). Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia* 49, 385-96.
- 211. Ogawa, Sawamoto, Miyata, Miyao et al.** (2002). Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res* 69, 925-33.

- 212. Okabe, Forsberg-Nilsson, Spiro, Segal et al.** (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* 59, 89-102.
- 213. Okada, Yoshida, Sokabe, Wakabayashi et al.** (1996). Suppression of CD44 expression decreases migration and invasion of human glioma cells. *Int J Cancer* 66, 255-60.
- 214. Onodera, Hashimoto, Hashimoto, Morishige et al.** (2005). Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *Embo J* 24, 963-73.
- 215. Osborn and Weber.** (1982). Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies: tubulin-containing structures. *Methods Cell Biol* 24, 97-132.
- 216. Pain, Clark, Shen, Nakazawa et al.** (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122, 2339-48.
- 217. Park, Suetsugu and Takenawa.** (2005). Interaction of HSP90 to N-WASP leads to activation and protection from proteasome-dependent degradation. *Embo J* 24, 1557-70.
- 218. Parsons and Parsons.** (1997). Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9, 187-92.
- 219. Parsons and Parsons.** (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23, 7906-9.
- 220. Passi, Sadeghi, Kawamura, Anand et al.** (2004). Hyaluronan suppresses epidermal differentiation in organotypic cultures of rat keratinocytes. *Exp Cell Res* 296, 123-34.
- 221. Pawley.** (2006). Handbook of Biological Confocal Microscopy. Third Edition
- 222. Pawson.** (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* 373, 573-80.
- 223. Perschl, Lesley, English, Hyman et al.** (1995). Transmembrane domain of CD44 is required for its detergent insolubility in fibroblasts. *J Cell Sci* 108 (Pt 3), 1033-41.
- 224. Peters, Palay and Webster.** (1991). The fine structure of the nervous system: Neurons and their supporting cells
- 225. Pfeiffer, Warrington and Bansal.** (1993). The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* 3, 191-7.
- 226. Playford and Schaller.** (2004). The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 23, 7928-46.
- 227. Pollard and Borisy.** (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-65.
- 228. Ponta, Sherman and Herrlich.** (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 33-45.
- 229. Prehm.** (1984). Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem J* 220, 597-600.
- 230. Prinz.** (2008). Die intrazelluläre Aufnahme und Sortierung von Hyaluronan. In *der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät*, vol. Diplomarbeit, pp. 126. Bonn: Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- 231. Purnell, Mack, Tepper, Evans et al.** (2009). The Src Inhibitor AZD0530 Blocks Invasion and May Act as a Radiosensitizer in Lung Cancer Cells. *J Thorac Oncol.*
- 232. Radotra and McCormick.** (1997). Glioma invasion in vitro is mediated by CD44-hyaluronan interactions. *J Pathol* 181, 434-8.
- 233. Radotra and McCormick.** (1997a). CD44 is involved in migration but not spreading of astrocytoma cells in vitro. *Anticancer Res* 17, 945-9.

- 234. Ramakrishnan, Hedayati, Lullmann-Rauch, Wessig et al.** (2007). Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy. *J Neurosci* 27, 9482-90.
- 235. Rauch.** (2007). Brain matrix: structure, turnover and necessity. *Biochem Soc Trans* 35, 656-60.
- 236. Rees, Coote, Stables, Goodson et al.** (1996). Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques* 20, 102-4, 106, 108-10.
- 237. Ren, Meng, Mei, Zhao et al.** (2004). Roles of Gab1 and SHP2 in paxillin tyrosine dephosphorylation and Src activation in response to epidermal growth factor. *J Biol Chem* 279, 8497-505.
- 238. Resh.** (1993). Interaction of tyrosine kinase oncoproteins with cellular membranes. *Biochim Biophys Acta* 1155, 307-22.
- 239. Resh.** (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1451, 1-16.
- 240. Reynolds, Vila, Lansing, Potts et al.** (1987). Activation of the oncogenic potential of the avian cellular src protein by specific structural alteration of the carboxy terminus. *Embo J* 6, 2359-64.
- 241. Ridley, Schwartz, Burridge, Firtel et al.** (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-9.
- 242. Rodier, Valles, Denoyelle, Thiery et al.** (1995). pp60c-src is a positive regulator of growth factor-induced cell scattering in a rat bladder carcinoma cell line. *J Cell Biol* 131, 761-73.
- 243. Rothberg, Jacobs, Goodman and Artavanis-Tsakonas.** (1990). slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* 4, 2169-87.
- 244. Rowitch.** (2004). Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci* 5, 409-19.
- 245. Sadowski, Stone and Pawson.** (1986). A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol Cell Biol* 6, 4396-408.
- 246. Saiki, Gelfand, Stoffel, Scharf et al.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- 247. Sandilands, Cans, Fincham, Brunton et al.** (2004). RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane. *Dev Cell* 7, 855-69.
- 248. Sanger, Nicklen and Coulson.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.
- 249. Sato, Sato, Aoto and Fukami.** (1995). Site-specific association of c-Src with epidermal growth factor receptor in A431 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 210, 844-51.
- 250. Scheffler, Schmandt, Schroder, Steinfarz et al.** (2003). Functional network integration of embryonic stem cell-derived astrocytes in hippocampal slice cultures. *Development* 130, 5533-41.
- 251. Schichor, Kerkau, Visted, Martini et al.** (2005). The brain slice chamber, a novel variation of the Boyden Chamber Assay, allows time-dependent quantification of glioma invasion into mammalian brain in vitro. *J Neurooncol* 73, 9-18.
- 252. Schlessinger.** (2004). Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science* 306, 1506-7.



- 253. Schneider and Wolf.** (2009). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol* 218, 460-6.
- 254. Schubert, Heinemann, Carlisle, Tarikas et al.** (1974). Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature* 249, 224-7.
- 255. Scott.** (2008a). Stem cells: new frontiers of ethics, law, and policy. *Neurosurg Focus* 24, E24.
- 256. Sreaton, Bell, Jackson, Cornelis et al.** (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 12160-4.
- 257. Seals, Azucena, Pass, Tesfay et al.** (2005). The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell* 7, 155-65.
- 258. Serban, Liu and Prestwich.** (2008). Effects of extracellular matrix analogues on primary human fibroblast behavior. *Acta Biomater* 4, 67-75.
- 259. Sher, Balasubramanian, Boddeke and Copray.** (2008). Oligodendrocyte differentiation and implantation: new insights for remyelinating cell therapy. *Curr Opin Neurol* 21, 607-14.
- 260. Sherman and Back.** (2008). A 'GAG' reflex prevents repair of the damaged CNS. *Trends Neurosci* 31, 44-52.
- 261. Sherman, Jacoby, Lampe, Pelton et al.** (1997). CD44 expression is aberrant in benign Schwann cell tumors possessing mutations in the neurofibromatosis type 2, but not type 1, gene. *Cancer Res* 57, 4889-97.
- 262. Sherman, Skroch-Angel, Moll, Schwechheimer et al.** (1995). Schwann cell tumors express characteristic patterns of CD44 splice variants. *J Neurooncol* 26, 171-84.
- 263. Sherman, Sleeman, Herrlich and Ponta.** (1994). Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 6, 726-33.
- 264. Sicheri and Kuriyan.** (1997a). Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr Opin Struct Biol* 7, 777-85.
- 265. Sicheri, Moarefi and Kuriyan.** (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385, 602-9.
- 266. Skelton, Zeng, Nocks and Stamenkovic.** (1998). Glycosylation provides both stimulatory and inhibitory effects on cell surface and soluble CD44 binding to hyaluronan. *J Cell Biol* 140, 431-46.
- 267. Slack, Adams, Rovin, Bissonette et al.** (2001). Alterations in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells. *Oncogene* 20, 1152-63.
- 268. Sleeman, Kondo, Moll, Ponta et al.** (1997). Variant exons v6 and v7 together expand the repertoire of glycosaminoglycans bound by CD44. *J Biol Chem* 272, 31837-44.
- 269. Slevin, Krupinski, Gaffney, Matou et al.** (2007). Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol* 26, 58-68.
- 270. Small, Riddle and Noble.** (1987). Evidence for migration of oligodendrocyte--type-2 astrocyte progenitor cells into the developing rat optic nerve. *Nature* 328, 155-7.
- 271. Smart, Oppermann, Czernilofsky, Purchio et al.** (1981). Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src). *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6013-7.

- 272. Smith, Heath, Donaldson, Wong *et al.*** (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-90.
- 273. Snider and Meier.** (2007). Receptor transactivation cascades. Focus on "Effects of alpha1D-adrenergic receptors on shedding of biologically active EGF in freshly isolated lacrimal gland epithelial cells". *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1-3.
- 274. Sommer and Schachner.** (1981). Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* 83, 311-27.
- 275. Stamenkovic, Aruffo, Amiot and Seed.** (1991). The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *Embo J* 10, 343-8.
- 276. Stern.** (2003). Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 13, 105R-115R.
- 277. Strubing, Ahnert-Hilger, Shan, Wiedenmann *et al.*** (1995). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev* 53, 275-87.
- 278. Stylli, Kaye and Lock.** (2008). Invadopodia: at the cutting edge of tumour invasion. *J Clin Neurosci* 15, 725-37.
- 279. Su, Gutmann, Perry, Abounader *et al.*** (2004). CD44-independent hepatocyte growth factor/c-Met autocrine loop promotes malignant peripheral nerve sheath tumor cell invasion in vitro. *Glia* 45, 297-306.
- 280. Su, Sin, Darrow and Sherman.** (2003). Malignant peripheral nerve sheath tumor cell invasion is facilitated by Src and aberrant CD44 expression. *Glia* 42, 350-8.
- 281. Sugahara, Hirata, Hayasaka, Stern *et al.*** (2006). Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments. *J Biol Chem* 281, 5861-8.
- 282. Sugahara, Murai, Nishinakamura, Kawashima *et al.*** (2003). Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *J Biol Chem* 278, 32259-65.
- 283. Svitkina, Verkhovsky, McQuade and Borisy.** (1997). Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J Cell Biol* 139, 397-415.
- 284. Swiatek and Gridley.** (1993). Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene *Krox20*. *Genes Dev* 7, 2071-84.
- 285. Swindle, Tran, Johnson, Banerjee *et al.*** (2001). Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. *J Cell Biol* 154, 459-68.
- 286. Terpe, Christiansen, Gonzalez, Berthold *et al.*** (1995). Differentiation and prognosis of neuroblastoma in correlation to the expression of CD44s. *Eur J Cancer* 31A, 549-52.
- 287. Terranova, Hujanen, Loeb, Martin *et al.*** (1986). Use of a reconstituted basement membrane to measure cell invasiveness and select for highly invasive tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 465-9.
- 288. Thankamony and Knudson.** (2006). Acylation of CD44 and its association with lipid rafts are required for receptor and hyaluronan endocytosis. *J Biol Chem* 281, 34601-9.
- 289. Thelen, Kedar, Panicker, Schmid *et al.*** (2002). The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. *J Neurosci* 22, 4918-31.

- 290. Thomas and Brugge.** (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 513-609.
- 291. Thomson, Itskovitz-Eldor, Shapiro, Waknitz et al.** (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-7.
- 292. Thomson, Kalishman, Golos, Durning et al.** (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7844-8.
- 293. Toole and Hascall.** (2002). Hyaluronan and tumor growth. *Am J Pathol* 161, 745-7.
- 294. Tsukita, Oishi, Sato, Sagara et al.** (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 126, 391-401.
- 295. Tsukita and Yonemura.** (1999). Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem* 274, 34507-10.
- 296. Tuohy, Wallingford, Liu, Chan et al.** (2004). CD44 overexpression by oligodendrocytes: a novel mouse model of inflammation-independent demyelination and dysmyelination. *Glia* 47, 335-45.
- 297. Turley, Noble and Bourguignon.** (2002). Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 277, 4589-92.
- 298. Udabage, Brownlee, Nilsson and Brown.** (2005). The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Exp Cell Res* 310, 205-17.
- 299. Vignjevic, Schoumacher, Gavert, Janssen et al.** (2007). Fascin, a novel target of beta-catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer. *Cancer Res* 67, 6844-53.
- 300. Vitale, Avizienyte, Brunton and Frame.** (2008). Focal adhesion kinase is not required for Src-induced formation of invadopodia in KM12C colon cancer cells and can interfere with their assembly. *Eur J Cell Biol* 87, 569-79.
- 301. Vogel, Butcher and Picker.** (1992). H-CAM expression in the human nervous system: evidence for a role in diverse glial interactions. *J Neurocytol* 21, 363-73.
- 302. Wang and Bourguignon.** (2006). Hyaluronan and the interaction between CD44 and epidermal growth factor receptor in oncogenic signaling and chemotherapy resistance in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132, 771-8.
- 303. Warrington, Barbarese and Pfeiffer.** (1993). Differential myelinogenic capacity of specific developmental stages of the oligodendrocyte lineage upon transplantation into hypomyelinating hosts. *J Neurosci Res* 34, 1-13.
- 304. Waxman.** (1992). Demyelination in spinal cord injury and multiple sclerosis: what can we do to enhance functional recovery? *J Neurotrauma* 9 Suppl 1, S105-17.
- 305. Webb, Eves and Mak.** (2006). Cortactin regulates podosome formation: roles of the protein interaction domains. *Exp Cell Res* 312, 760-9.
- 306. Webb and Horwitz.** (2003). New dimensions in cell migration. *Nat Cell Biol* 5, 690-2.
- 307. Weigel, Hascall and Tammi.** (1997). Hyaluronan synthases. *J Biol Chem* 272, 13997-4000.
- 308. Welch and Mullins.** (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 247-88.
- 309. Wheatley, Isacke and Crossley.** (1993). Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44, during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning. *Development* 119, 295-306.
- 310. Wheeler.** (1994). Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod Fertil Dev* 6, 563-8.

- 311. Williams, Weijland, Gonfloni, Thompson *et al.*** (1997). The 2.35 Å crystal structure of the inactivated form of chicken Src: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions. *J Mol Biol* 274, 757-75.
- 312. Windrem, Nunes, Rashbaum, Schwartz *et al.*** (2004). Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat Med* 10, 93-7.
- 313. Wiranowska, Tresser and Saporta.** (1998). The effect of interferon and anti-CD44 antibody on mouse glioma invasiveness in vitro. *Anticancer Res* 18, 3331-8.
- 314. Xiang, Dong, Wan, Li *et al.*** (2006). Versican G3 domain regulates neurite growth and synaptic transmission of hippocampal neurons by activation of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 281, 19358-68.
- 315. Yamaguchi, Lorenz, Kempiak, Sarmiento *et al.*** (2005a). Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol* 168, 441-52.
- 316. Yamaguchi, Pixley and Condeelis.** (2006). Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur J Cell Biol* 85, 213-8.
- 317. Yarden and Sliwkowski.** (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127-37.
- 318. Yeatman.** (2004). A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 4, 470-80.
- 319. Yin, Sanes and Miner.** (2000). Identification and expression of mouse netrin-4. *Mech Dev* 96, 115-9.
- 320. Zhan, Plourde, Hu, Friesel *et al.*** (1994). Association of fibroblast growth factor receptor-1 with c-Src correlates with association between c-Src and cortactin. *J Biol Chem* 269, 20221-4.
- 321. Zhang, Baader, Sixt, Kappler *et al.*** (2004). Neurocan-GFP fusion protein: a new approach to detect hyaluronan on tissue sections and living cells. *J Histochem Cytochem* 52, 915-22.
- 322. Zimmermann, Pilwat and Riemann.** (1974). [Reversible dielectric breakdown of cell membranes by electrostatic fields (author's transl)]. *Z Naturforsch [C]* 29, 304-5.

## Eigene Veröffentlichungen:

- Hans M, Pusch A, Dai L, Racké K, Swandulla D, Gieselmann V, Kappler J.  
Lysosulfatide regulates the motility of a neural precursor cell line via calcium-mediated process collapse.  
Neurochem Res. 2009 Mar;34(3):508-17.
- Pusch A\*, Boeckenhoff A\*, Glaser T, Kaminski T, Kirfel G, Hans M, Steinfarz B, Swandulla D, Kubitscheck U, Gieselmann V, Brüstle O, Kappler J.  
CD44 promotes the invasive growth of a neural precursor cell line in brain tissue.  
Eingereicht.

(\* ) gleicher Beitrag beider Autoren



## Danksagung

Zunächst möchte ich **Prof. Dr. Frank Runkel** von der FH Giessen Friedberg für die Übermittlung dieser Stelle danken.

Ich danke **Prof. Dr. Volkmar Gieselmann** für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dr.-Arbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Bonn.

Ein besonderer Dank gilt **PD Dr. Joachim Kappler** für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, für die gute Betreuung meiner Promotionsarbeit, die stetige Unterstützung des Projektes und die ständige Diskussionsbereitschaft. Außerdem möchte ich ihm dafür danken, dass er mir als FH-Absolventin, die Chance gegeben hat zu promovieren. Vielen Dank.

Einen weiteren Dank möchte ich an **Prof. Dr. Wolfgang Alt**, Institut für Theoretische Biologie der Universität Bonn, für die unkomplizierte und freundliche Übernahme des Korreferates aussprechen. Vielen Dank für die gute Unterstützung vor allem bei mathematischen Problemstellungen.

Auch bei der Arbeitsgruppe von **Prof. Dr. Oliver Brüstle**, Institut für Rekonstruktive Neurobiologie an der Universität Bonn, möchte ich mich sehr für die gute Zusammenarbeit bedanken. In dem Zusammenhang gilt ein besonderer Dank **Dr. Tamara Glaser, Claudia Schwarz** und **Barbara Steinfarz** für die immer freundliche und geduldige Hilfe, für die herzliche Zusammenarbeit sogar am Wochenende und an manchen Feiertagen.

Weiterhin bin ich der Arbeitsgruppe Kubitschek für die Nutzung des Laser Scanning Mikroskops, der Arbeitsgruppe Magin für die Nutzung des Mikroskops und **Dr. Michael Hans**, Institut für Physiologie II an der Universität Bonn, für die freundliche Hilfe bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie sehr zu Dank verpflichtet.

Ein weiterer besonderer Dank gilt all meinen Kollegen. Die Zusammenarbeit mit Euch hat mir wirklich sehr viel Spaß gemacht. Danke Anne für die abwechslungsreichen Mittagspausen und die vielen guten Gespräche. Danke Tim für die guten Diskussionen und deine Hilfe vor allem bei Computerfragen. Danke Anne, Tim und Annika für das Korrekturlesen. Danke Inge, Nina, Kathi, Boris, Frank, Rebekka, Marion, Lena, Angela, Stephie, Kathy, Werner, Karola und all den anderen. Ganz besonders bedanke ich mich bei der guten Seele des Labors, **Norbert Rösel**, der mit seinem freundlichen und aufmunternden Wesen sowie seiner unerschöpflichen Hilfsbereitschaft jeden Tag für ein sehr gutes Arbeitsklima gesorgt hat.

Besonders möchte ich auch den Menschen danken, die mich über diese Arbeit hinaus unterstützt haben, zu mir gehalten haben, auch wenn ich „mal“ keine Zeit hatte. Ihr habt mir oft viel Kraft und Durchhaltevermögen gegeben. Ohne Euch wäre ich nie soweit gekommen.

Damit sind alle meine Freunde gemeint, besonders Nina, Kiri, Flo, Angi und Jeanne. Ich möchte mich auch bei all meinen lieben Rhönradleuten bedanken. Ganz besonders möchte ich Nina, Bine und Astrid dafür danken, dass sie hinter mir stehen und mich immer wieder aufbauen, auch wenn es einmal nicht so gut läuft.

Darüber hinaus danke ich meinen lieben Omas. Meinen Eltern gilt ein ganz besonderer Dank, dafür dass sie mich schon immer in so vielfältiger Weise bedingungslos unterstützt haben, mir immer vertraut haben und immer für mich da sind. All das hat mich überhaupt erst an diesen Punkt geführt. Ich möchte mich auch besonders bei meinen unglaublichen Geschwistern, Rena und Gregi, bedanken, die immer sämtliche Höhen und Tiefen mit mir durchleben. Danke auch an Tina, Christian und Pünktchen, die das Ganze ebenfalls mitmachen. Von Herzen danke ich Andreas, dass er mich so verständnisvoll in allem unterstützt, was ich mache und für mich da ist.

Vielen Dank auch an alle, die ich an dieser Stelle nicht erwähnen konnte, damit diese Danksagung nicht länger wird, als die gesamte Arbeit.

**Einfach nur Danke**



**Erklärung:**

Hiermit versichere ich, Annette Pusch, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ferner erkläre ich, die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben. Ich habe vormals noch keinen Promotionsversuch unternommen. Die Ergebnisse dieser Dissertation sind an den aufgeführten Stellen auszugsweise veröffentlicht.

Bonn, Mai 2009

Annette Pusch