

Aus dem Zentrum für Neurologie Tübingen
Abteilung Allgemeine Neurologie
komm. Leiter: Professor Dr. med. A. Melms

Bedeutung der Semaphorin 7A Expression für die
Tumorigenität und Immunogenität von malignen
Gliomzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Michaela Tonder

aus Hoyerswerda

2011

Aus dem Zentrum für Neurologie Tübingen
Abteilung Allgemeine Neurologie
komm. Leiter: Professor Dr. med. A. Melms

Bedeutung der Semaphorin 7A Expression für die
Tumorigenität und Immunogenität von malignen
Gliomzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Michaela Tonder

aus Hoyerswerda

2011

Dekan: Professor Dr. med. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. M. Weller

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. R. Meyermann

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Maligne Gliome	1
1.2	Aktuelle Therapie maligner Gliome	2
1.2.1	Operative Therapie	2
1.2.2	Strahlentherapie	2
1.2.3	Chemotherapie	3
1.3	Experimentelle Therapieansätze	4
1.4	Semaphorine	6
1.4.1	Semaphorin 7A	8
1.4.2	Rezeptoren von Semaphorin 7A	9
1.5	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Chemikalien	12
2.2	Geräte	14
2.3	Verbrauchsmaterialien	15
2.4	Komplettsysteme	16
2.5	Antikörper	17
2.5.1	Antikörper für Analysen im Durchflusszytometer	17
2.5.2	Antikörper für Analysen im Western Blot	18
2.6	Zelllinien und Zellkultur	18
2.7	RNA-Isolierung und photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	19
2.8	Umschreiben der RNA in cDNA - Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	19
2.9	Amplifikation der cDNA und Bestimmung der mRNA Konzentration	20
2.9.1	Konventionelle PCR	21
2.9.2	Quantitative PCR	22
2.9.3	Primer	24
2.10	Durchflusszytometrie	25

2.11	Herstellung von Proteinlysaten und Proteinbestimmung nach Bradford .	26
2.12	Aufkonzentrieren von Zellüberständen.....	27
2.13	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	27
2.14	Western Blot und Immunodetektion	28
2.15	Posttranskriptionelles Gene Silencing mittels RNA-Interferenz.....	30
2.15.1	siRNAs.....	30
2.16	Invasion und Migration	32
2.17	Chromfreisetzungsversuch.....	33
2.17.1	PBMC-Präparation.....	33
2.17.2	Kokultivierung mit RPMI 8866 und Herstellung von NK-Zellklonen ..	35
2.17.3	Chromfreisetzungsversuch mit definierten Effektor/Target Verhältnissen	35
2.18	Statistik.....	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Expressionsanalyse von Semaphorin 7A und seinem Rezeptor Plexin C1 in der PCR.....	38
3.2	Expressionsanalyse von Semaphorin 7A und seinem Rezeptor Plexin C1 in der quantitativen PCR.....	39
3.2.1	Semaphorin 7A mRNA-Expression.....	39
3.2.2	Plexin C1 mRNA-Expression	41
3.3	Proteinexpression im Durchflusszytometer	42
3.3.1	Semaphorin 7A Expression auf Proteinebene	42
3.3.2	Plexin C1 Expression auf Proteinebene.....	43
3.3.3	α 1-Integrin / β 1-Integrin Expression auf Proteinebene.....	44
3.4	Proteinexpression im Western Blot	46
3.5	Posttranskriptionelles Gene Silencing mittels RNA-Interferenz.....	47
3.6	Migration und Invasion	48
3.7	Chromfreisetzungsversuch.....	49
4	Diskussion.....	52

4.1	mRNA-Expression in der konventionellen und quantitativen PCR	52
4.2	Proteinexpression im Durchflusszytometer	54
4.3	Posttranskriptionelles Gene-Silencing mittels RNA-Interferenz.....	56
4.4	Migration und Invasion	57
4.5	Chromfreisetzungsversuch.....	58
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	60
6	Abbildungen und Tabellen.....	62
7	Literaturliste	63
8	Abkürzungsverzeichnis.....	71
9	Danksagung	73

1 Einleitung

1.1 Maligne Gliome

Gliome sind Tumoren des Zentralen Nervensystems (ZNS), die histologische Ähnlichkeiten mit Gliazellen aufweisen und mehr als die Hälfte der neuroepithelialen Tumoren ausmachen. Je nach histologischem Typ der Tumorzellen werden die Gliome den astrozytären, oligodendroglialen, ependymalen Tumoren oder gemischten Gliomen zugeteilt. Die World Health Organization (WHO) unterteilt die Tumoren des ZNS in Abhängigkeit ihrer Differenzierung oder Anaplasie in die WHO Grade I bis IV (Louis et al., 2007) wie folgt: WHO Grad I (pilozytisches Astrozytom), WHO Grad II (diffuses, fibrilläres, gemistozytisches, protoplasmatisches, pilomyxoides Astrozytom, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome), WHO Grad III (anaplastische Astrozytome, anaplastische Oligodendrogliome, anaplastische Oligoastrozytome) und das Glioblastom mit dem WHO Grad IV. Die Einordnung berücksichtigt hierbei die nukleäre Atypie, die Anzahl der Mitosen, die mikrovaskuläre Proliferation und das Auftreten von Nekrosen, die von dicht gepackten Tumorzellkernen („Pseudopalisaden“) umgeben sind.

Mehr als die Hälfte der Gliome zählen zu den höher-gradigen Gliomen, welche sich durch ihr stark migratorisches Verhalten, die sehr frühe und diffuse Infiltration von benachbarten Hirnarealen und die Resistenz gegenüber verschiedenen apoptotischen Stimuli auszeichnen (Ziegler et al., 2008). Der Altersgipfel der Gliompatienten liegt zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr mit einer Inzidenz von 5-10/100.000. Eine populationsbasierte Studie zeigte, dass Patienten mit Glioblastom nach Diagnosestellung im Median weniger als 6 Monate überleben (Ohgaki et al., 2005). Patienten mit niedrig-gradigen Gliomen zeichnen sich durch eine deutlich bessere Prognose aus. Hier wurden 10-Jahresüberlebensraten von über 50% berichtet (CBTRUS, 2011). Allerdings sind bis heute noch keine kurativen Behandlungsansätze möglich. Die aktuelle Therapie von Gliomen beinhaltet in Abhängigkeit vom WHO-Grad, verschiedene Kombinationen aus Tumorresektion, Bestrahlung und

Chemotherapie. Die Entwicklung neuer Behandlungsformen bei Glioblastomen ist Gegenstand intensiver präklinischer und klinischer Forschung.

1.2 Aktuelle Therapie maligner Gliome

1.2.1 Operative Therapie

Durch ihre Eigenschaft, sehr früh das umliegende gesunde Gehirngewebe zu infiltrieren, ist es nicht möglich, ein Gliom vollständig zu resektieren. Retrospektive Studien legen nahe, dass eine möglichst komplette makroskopische Resektion einen Überlebensvorteil darstellt (Lacroix et al., 2001; Pichlmeier et al., 2008). Neue Methoden beinhalten die Durchführung MRT-gesteuerter Operationen und Wach-Kraniotomie. Zudem konnte durch den Einsatz des Fluoreszenzmarkers 5-Aminolävulinsäure, durch welchen der Tumor unter dem Operationsmikroskop besser dargestellt kann, die Rate an kompletten Resektionen und das progressionsfreie Überleben nach 6 Monaten erhöht werden (Stummer et al., 2006). Wenn ein postoperatives neurologisches Defizit zu erwarten ist, wird in den meisten Fällen nur eine partielle Resektion oder eine stereotaktische Biopsie zur Diagnosesicherung durchgeführt (Hall et al., 1998; McGirt et al., 2005).

1.2.2 Strahlentherapie

Schon vor mehr als 30 Jahren wurde in klinischen Studien die Wirksamkeit der Strahlentherapie in der Behandlung maligner Gliome gezeigt. Dabei wurde durch die Bestrahlung der erweiterten Tumorregion die mediane postoperative Überlebenszeit von 4 auf 9 Monate verlängert (Walker et al., 1978). Die damals durchgeführte Ganzhirnbestrahlung führt bei Gliomen nicht zu einer Verbesserung der Ergebnisse und ist wegen der zusätzlichen Nebenwirkungen heute obsolet. Die Standardtherapie des Glioblastoms umfasst 60 Gy in 1,8 – 2 Gy Fraktionen (Laperriere et al., 2002). Eine Dosiserhöhung auf über 60 Gy hinaus brachte keinen zusätzlichen Überlebensvorteil. Allerdings kann bei schlechter Prognose die Gesamtbestrahlungsdauer durch eine Erhöhung der Einzeldosis und Reduktion der Gesamtdosis bei gleicher biologischer

Wirksamkeit verringert werden (Roa et al., 2004). Vor Behandlungsbeginn wird mittels prä- und postoperativer Schnittbilddiagnostik das Zielvolumen festgelegt, um möglichst hohe Strahlendosen auf die Tumorregion (involved-field) applizieren zu können und das umliegende gesunde Gewebe zu schonen. Da von einer umliegenden Tumordinfiltration auszugehen ist, umfasst die Bestrahlung die erweiterte Tumorregion, d.h. das kontrastmittelaufnehmende Tumorgewebe plus 2 cm Sicherheitsabstand im gesunden angrenzenden Gewebe. Über alle Schritte der Planung und der Durchführung der Behandlung muss auf eine exakte und reproduzierbare Lagerung des Patienten geachtet werden. Dabei helfen u.a. Gesichtsmasken oder Bite-Blocks.

1.2.3 Chemotherapie

Seit 2005 besteht die Standardtherapie für Glioblastome aus Strahlentherapie und begleitender bzw. nachfolgender Behandlung mit Temozolomid. Die Zulassungsstudie zeigte einen Anstieg des 2-Jahresüberlebens von 10,4% auf 26,5% und einen Anstieg des medianen Überlebens von 12,1 Monate ohne Temozolomid auf 14,6 Monate unter Strahlentherapie und adjuvanter Temozolomid-Therapie (Stupp et al., 2005). Eine retrospektive Begleituntersuchung ergab, dass Patienten, deren Tumoren eine Methylierung der Promotorregion des O⁶-Methyl-Guanyl-Methyl-Transferase (MGMT)-Gens aufweisen, besonders von der Chemotherapie profitierten. Hier betrug das mediane Überleben 21,7 Monate und das 2-Jahresüberleben 46% (Hegi et al., 2005). Im Vergleich dazu lag bei Patienten ohne Methylierung der MGMT-Promotorregion das mediane Überleben unter Strahlen- und Chemotherapie bei nur 12,7 Monate und das 2-Jahresüberleben bei 13,8%.

MGMT ist ein Enzym, das Alkylgruppen von der Desoxyribonukleinsäure (DNS) entfernt. Die Methylierung der Promotorregion dieses Gens verhindert die Transkription und führt somit zu einer verminderten Proteinexpression. Tumorzellen neigen dazu, verschiedene Gene durch DNS-Methylierung abzuschalten oder dadurch deren Transkription zu verringern. Diese epigenetische Regulierung des MGMT-Gens erklärt die unterschiedliche Sensitivität gegenüber alkylierenden Chemotherapeutika wie Temozolomid. Bis

auf vergleichsweise milde unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie Übelkeit und Obstipation, wird Temozolomid von dem Großteil der Patienten gut vertragen. Wenn Temozolomid nicht in der Primärtherapie verwendet wurde, ist es beim Rezidiv ebenso indiziert. Eine erneute Temozolomid Therapie wird auch empfohlen, wenn das Rezidiv nach einem mehrmonatigen progressionsfreien Intervall wieder auftritt. Meistens werden im Rezidivfall dosisintensivierte Protokolle von Temozolomid verwendet, die der Standarddosierung vielleicht überlegen sind, aber auch ein höheres Risiko unerwünschter Arzneimittelwirkungen mit sich bringen (Wick et al., 2007). In klinischen Studien wird der Einsatz von MGMT-Inhibitoren wie O⁶-Benzylguanin untersucht, welche dazu beitragen können, eine Chemoresistenz zu überwinden (Quinn et al., 2009). Alternativ zu Temozolomid, besonders bei Temozolomid vorbehandelten Patienten, kommen Nitrosoharnstoffe wie Lomustin, Nimustin oder Carmustin zum Einsatz. Bei Patienten, für die eine systemische Chemotherapie nicht in Frage kommt, existiert die Möglichkeit der lokalen Therapie in Form von Carmustin-beschichteten „Wafern“, die in die Tumorregion implantiert werden. Ein positiver Effekt auf das Überleben von Glioblastompatienten konnte dadurch jedoch nicht gezeigt werden (Westphal et al., 2006).

1.3 Experimentelle Therapieansätze

Gegenstand reger Forschungstätigkeit sind experimentelle Therapieansätze, die aufgrund ihres Umfangs in dieser Arbeit nur ansatzweise vorgestellt werden können.

Ein Bestandteil der experimentellen Therapie ist der Einsatz von Antikörpern, welche sich gegen Tumor-spezifische Antigene oder gegen Moleküle, die Tumoren überexprimieren, richten. Ein Beispiel hierfür ist der für die Therapie des Glioblastomrezidivs in den USA und der Schweiz offiziell zugelassene anti-*Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) Antikörper Bevacizumab (*Avastin*), welcher in Phase II Studien vielversprechende Ergebnisse lieferte (Friedman et al., 2009). Ein weiterer Angiogeneseinhibitor ist der Integrinantagonist

Cilengitide, der bei Glioblastompatienten ebenfalls mit guten Resultaten in einer Phase I/IIa Studie erprobt worden ist (Stupp et al., 2010).

Zalutsky et al. (2008) veröffentlichten eine klinische Studie, bei welcher ein Antitenascin-Antikörper mit dem α -Teilchen-emittierenden Radionuklid $^{211}\text{Astatine}$ gekoppelt und nach maximaler Resektion in die Operationshöhle appliziert wurde mit hoffnungsvollen Ergebnissen für die zukünftige Behandlung von malignen Tumoren des ZNS.

Auch die Anwendung von Impfstoffen, die auf dendritischen Zellen (DC) basieren, welche das Immunsystem aktivieren sollen, sind Gegenstand aktueller klinischer Forschung (Sampson et al., 2009; Wheeler, 2010). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass die intratumorale und/oder intrakutane Injektion von mit Tumorlysaten gepulsten DC das Überleben signifikant verlängerte (Pellegatta et al., 2010).

Zu weiteren neuen Therapieansätzen zählen unter anderem verschiedenste niedermolekulare Inhibitoren, die in präklinischen (Roth et al., 2009) und auch in diversen klinischen Studien (Prados et al., 2009) zum Einsatz kommen.

Diese Substanzen interferieren selektiv in bei der Onkogenese beteiligte Signaltransduktionswege, wie zum Beispiel des Zellzyklus, von Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren und wirken somit antitumoral (Clarke et al., 2010).

Ein weiterer Teil der experimentellen Therapieansätze ist die Gentherapie. Hierbei wird versucht, eine Krankheit durch das Einschleusen von Genen mittels diverser Vektoren in eine (Tumor-)Zelle oder durch die Veränderung von Genen zu behandeln. In Gliomen wurden beispielsweise Viren als Vektoren benutzt, um Suizidgene, proapoptotische Gene, p53, Zytokine oder Caspasen in eine Zelle zu transduzieren (Germano et al., 2009).

1.4 Semaphorine

Semaphorine sind eine heterogene Gruppe von sezernierten, transmembranösen und Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen, die sich in 8 Klassen unterteilen lassen (Abb. 1). Semaphorine der Klasse 1 und 2 kommen nur bei den Invertebraten vor. Die Klassen 3-7 sind vertebrale Semaphorine. Zusätzlich ist ein virales Semaphorin beschrieben (Goodman et al., 1999). Alle Semaphorine besitzen eine Sema-Domäne, die ca. 500 Aminosäuren lang ist, sich am N-terminalen Ende dieser Proteine befindet und für die Semaphorin-Signaltransduktion essentiell ist (Yu et al., 1999; Neufeld et al., 2008). In dieser Sema-Domäne befindet sich eine 70 Aminosäuren-lange 7-blättrige β -Propellerstruktur, die der β -Propellerstruktur von α -Integrinen ähnelt (Love et al., 2003; Gherardi et al., 2004). Am C-terminalen Ende befindet sich eine konservierte, ca. 54 Aminosäuren-lange PSI (Plexine, Semaphorine und Integrine) Domäne (Bork et al., 1999; Comoglio et al., 2003). In C-terminaler Richtung der Sema- und PSI-Domänen findet sich bei den Semaphorinen der Gruppe 2, 3, 4 und 7 eine Immunglobulin-ähnliche Domäne, während die Semaphorine der Gruppe 5 mehrere Thrombospondin-Gruppen besitzen (Kruger et al., 2005). Semaphorine der Gruppe 3 und die viralen Semaphorine werden sezerniert. Die Semaphorine der Gruppen 4–7 sind in der Zellmembran verankert. Zudem wird das membranständige Semaphorin 4D proteolytisch abgespalten und dadurch in eine aktive und lösliche Form gebracht (Basile et al., 2007).

Semaphorine wurden erstmals im Zusammenhang mit axonalem Wachstum beschrieben (Luo et al., 1993). Besonders während der Entwicklung des ZNS werden die meisten Semaphorine exprimiert (Fiore et al., 2003). Sie sind zudem bei der Progression von Tumoren beteiligt, indem sie die Chemotaxis, Zellviabilität, Tumorigenese, Metastasierung und Angiogenese beeinflussen (Neufeld et al., 2005).

Die Methylierung der Promotorregion oder der Verlust der Heterozygotizität des Semaphorin 3B-Gens steht im Zusammenhang mit der Entstehung des Bronchialkarzinoms, (Tomizawa et al., 2001; Kuroki et al., 2003), hepatozellulären Karzinoms (Tischhoff et al., 2005) und Neuroblastoms (Nair et

al., 2007). Semaphorine der Gruppe 3 werden als Tumorsuppressoren bei der Entstehung des Mammakarzinoms, des Ovarialkarzinoms und des Prostatakarzinoms beschrieben (Neufeld et al., 2008). Im Gegensatz dazu ist Semaphorin 3A auch bei der Tumorigenese des Pankreaskarzinoms und des Kolonkarzinoms beteiligt (Nguyen et al., 2006; Müller et al., 2007). Semaphorin 4D soll die Progression von Gliomen fördern, indem es in den *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) Signalweg eingreift (Hu et al., 2007). *In vitro* Versuche zeigten, dass eine verringerte Semaphorin 5B Expression die Viabilität von Nierenzellkarzinom-Zellen herabsetzt (Hirota et al., 2006).

Semaphorin 4D wurde als erstes Semaphorin mit immunregulatorischen Eigenschaften beschrieben und ist bei der Aktivierung von B-Zellen und DC beteiligt (Kumanogoh et al., 2000). Semaphorin 4A hat eine wichtige Funktion bei der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen (Kumanogoh et al., 2005). Durch die Sekretion von Semaphorin 3A durch Tumorzellen wird die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen verhindert (Catalano et al., 2006).

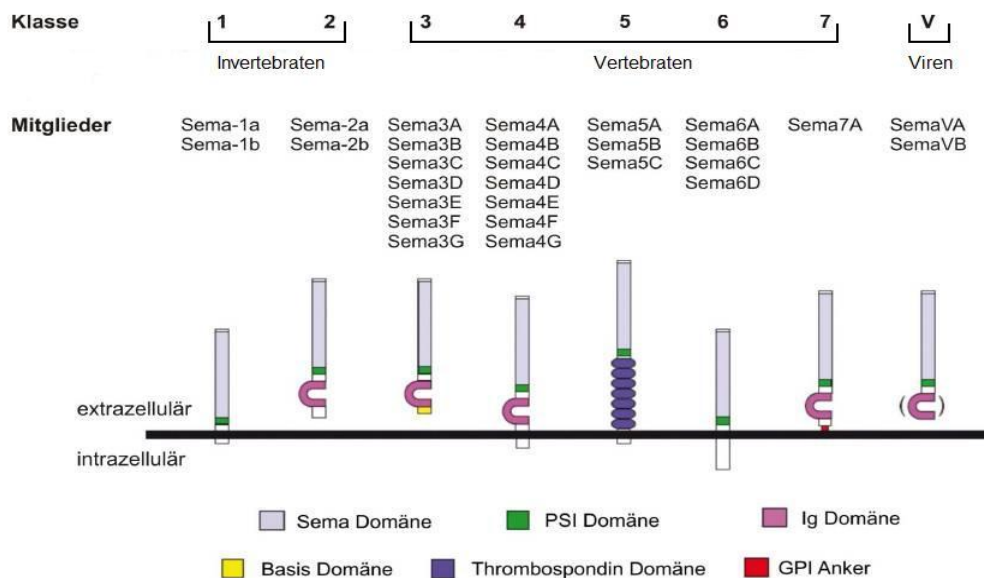


Abbildung 1 Schematische Darstellung der verschiedenen Semaphorinklassen und deren Mitglieder. Modifiziert nach Yazdani U und Terman JR. The semaphorins. Genome Biol 2006;7:211.

1.4.1 Semaphorin 7A

Semaphorin 7A ist membranständig und als einziges der Semaphorine durch einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden. Es fördert das Wachstum und die regelhafte Formation von Axonen des peripheren und zentralen Nervensystems während der embryonalen Entwicklung (Pasterkamp et al., 2003a; 2003b). Semaphorin 7A, früher auch CDw108 oder Sema-K1 genannt, wurde erstmals durch die Suche nach einem Homolog des viralen Semaphorin A39R identifiziert (Lange et al., 1998; Xu et al., 1998; Yamada et al., 1999). Es wird angenommen, dass viral kodierte Semaphorine von infizierten Zellen exprimiert werden, um eine Immunantwort des betroffenen Organismus zu verhindern (Kruger et al., 2005). Semaphorin 7A und die viralen Semaphorine weisen eine große Homologie auf (Comeau et al., 1998; Liu et al., 2010). Dies führte zu der Überlegung, dass auch Semaphorin 7A eine Rolle in der Funktion des Immunsystems von Wirbeltieren spielt. Im Immunsystem wird Semaphorin 7A auf aktivierten T- und B-Zellen, auf Natürlichen Killer (NK)-Zellen und auf Monozyten exprimiert (Holmes et al., 2002; Mine et al., 2000; Angelisova et al., 1999; Yamada et al., 1999; Xu et al., 1998). Zudem schütten Monozyten auf eine Stimulation mit Semaphorin 7A die Zytokine Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 und *Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α* aus und es kommt zu einem signifikanten Anstieg der Produktion von *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)* (Holmes et al., 2002). Semaphorin 7A-defiziente Mäuse zeigen pathologische Immunantworten. Diese Mäuse wiesen bei dem Versuch eine Typ IV Immunreaktion (Aktivierung Allergen-spezifischer T-Zellen) oder eine Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) auszulösen keine Zeichen einer Entzündung auf (Suzuki et al., 2007). Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass Semaphorin 7A auch ein negativer Regulator von Immunzellantworten sein kann. Hier zeigten T-Zellen mit einer defizienten Semaphorin 7A Expression eine verstärkte proliferative und homöostatische Antwort auf eine Antigenstimulation, eine schwerwiegende EAE und eine verstärkte Typ IV Immunreaktion. Die Semaphorin 7A-Defizienz führte zu einer Hyperreaktivität der T-Zellen *in vivo* und *in vitro* (Czopik et al., 2006). Die Widersprüchlichkeit dieser Daten bleibt bisher ungeklärt.

1.4.2 Rezeptoren von Semaphorin 7A

Plexin C1 ist einer der Semaphorin 7A-Rezeptoren (Tamagnone et al., 1999). Plexin C1 (damals als Virus-Encoded Semaphorin Protein Receptor (VESPR) bezeichnet) wurde erstmals im Zusammenhang mit dem viralen Semaphorin A39R genannt (Comeau et al., 1998). Die Bindung von Semaphorin 7A an Plexin C1, das auf DC exprimiert wird, verhindert die Zytokin-abhängige Migration der DC zu Virus-infizierten Zellen und führt zu einer verminderten Integrin-abhängigen Zellausbreitung und Dendritenausbildung (Walzer et al., 2005).

Ein weiterer Rezeptor von Semaphorin 7A gehört zu der Gruppe der Integrine. Integrine sind eine große Familie von heterodimeren Proteinen, die aus α - und β -Ketten bestehen. Sie werden in verschiedensten Geweben exprimiert und dienen der Zellanhaftung und Zellmigration entlang von Proteinen der extrazellulären Matrix (Danen et al., 2005). β_1 -Integrin interagiert mit Semaphorin 7A und fördert somit das Wachstum von zentralen und peripheren Axonen und wird für die korrekte Ausbildung von Nervenbahnen während der embryonalen Entwicklung benötigt (Pasterkamp et al., 2003a; 2003b). Durch Versuche mit blockierenden Antikörpern wurde nachgewiesen, dass bei T-Zell-abhängigen Immunreaktionen und der Semaphorin 7A-abhängigen Stimulation von Monozyten nicht nur β_1 -Integrin, sondern ein Heterodimer aus α_1 -Integrin und β_1 -Integrin als Rezeptor für Semaphorin 7A fungiert. Makrophagen, die aus dem Knochenmark von α_1 -Integrin-defizienten Mäusen stammen, zeigen bei Kontakt zu einer Semaphorin 7A-beschichteten Oberfläche eine signifikant herabgesetzte Fähigkeit zur Adhäsion und Zytokinproduktion im Vergleich zu Wildtyp Makrophagen (Suzuki et al., 2007). Auch weitere Immunzellen, wie CD4+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen und NK-Zellen exprimieren $\alpha_1\beta_1$ -Integrin (Richter et al., 2007; Ray et al., 2004; Pérez-Villar et al., 1996).

Durch die Interaktion von Semaphorin 7A mit β_1 -Integrin kommt es zur Aktivierung der *Focal Adhesion Kinase* (FAK) und *Extracellular Regulated Kinase* (ERK) 1 und 2 (Pasterkamp et al., 2003b). In der Sema-Domäne des Semaphorin 7A befindet sich ein bekanntes Integrin-bindendes Motiv, die RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) (Ruoslahti et al., 1996), über die β_1 -Integrin seinen

Liganden Semaphorin 7A erkennt und bindet (Pasterkamp et al., 2003b). Semaphorin 7A und seine Rezeptoren besitzen auch für andere Zellarten eine wichtige Bedeutung für die Zellausbreitung und Zellmotilität. Beispielsweise wird durch die Expression von Semaphorin 7A auf menschlichen Melanozyten und dessen Interaktion mit β_1 -Integrin die Zellausbreitung initiiert. Im Gegensatz dazu scheint die Interaktion von Semaphorin 7A mit Plexin C1 zu einer verminderten Zellausbreitung und Dendritenausbildung der Melanozyten zu führen (Scott et al., 2008). Der Verlust der Plexin C1 Expression beim metastasierten Melanom führte zusätzlich zu der Annahme, dass Plexin C1 die Funktion eines Tumorsuppressors haben könnte (Lazova et al., 2009; Scott et al., 2009).

Die Expression von Semaphorin 7A und seiner Rezeptoren Plexin C1 und β_1 -Integrin wird in der murinen Lunge durch den *Transforming Growth Factor* (TGF)- β_1 induziert. Semaphorin 7A steht hier über einen *Phosphatidylinositol 3-Kinase* (PI3K) und *Protein Kinase B* (PKB) abhängigen Signalweg in engem Zusammenhang zur Pathogenese der Lungenfibrose (Kang et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Rolle von Semaphorin 7A und seiner Rezeptoren bezüglich der Entwicklung und Funktion des Nervensystems bis zum jetzigen Zeitpunkt gut untersucht worden sind. Auch die Bedeutung von Semaphorin 7A für die Zellmotilität und –migration im Beispiel der humanen Melanozyten wurde gut untersucht und verstanden. Umgekehrt bleibt es unklar, welche Funktion Semaphorin 7A und seine Rezeptoren innerhalb des Immunsystems besitzen, da sowohl über immuninhibitorische als auch über immunaktivierende Eigenschaften in der Literatur berichtet wurde.

1.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Maligne Gliome zeichnen sich durch ein stark migratorisches Verhalten, die diffuse Infiltration von benachbarten Hirnarealen und durch die Resistenz gegenüber verschiedenen apoptotischen Stimuli aus. Zudem verschaffen sie sich durch die Sezernierung und Expression von immunsupprimierenden Zytokinen ein Milieu, das es ihnen ermöglicht einer Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem zu entgehen (Weller et al., 1995; Wiendl et al., 2003; Albesiano et al., 2010).

Semaphorin 7A beeinflusst Prozesse, wie die Zellausbreitung oder die Interaktion zwischen Zellen des Immunsystems.

Basierend auf diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit die folgenden Fragestellungen untersucht:

- Exprimieren Gliomzellen Semaphorin 7A?
- Exprimieren Gliomzellen die Semaphorin 7A-Rezeptoren Plexin C1, α_1 -Integrin und β_1 -Integrin?
- Welche Funktion besitzt Semaphorin 7A bei der Migration und Invasion von Gliomzellen?
- Welche Bedeutung besitzt Semaphorin 7A für die Immunogenität von Gliomzellen?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
• 10 x PCR-Mix	Gibco BRL (Basel, CH)
• ⁵¹ Cr Natriumchromat	Hartmann Analytic (Braunschweig, D)
• Accutase	PAA (Pasching, A)
• Acrylamid	Roth (Karlsruhe, D)
• Agarose SeaKem®	Lonza (Basel, CH)
• Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth (Karlsruhe, D)
• Aprotinin	Sigma (Deisenhofen, D)
• Äthylendiamintetraessigsäure(EDTA)	Sigma (Deisenhofen, D)
• Bad Stabil	Neo Lab (Heidelberg, D)
• Bradford-Reagenz	Bio-Rad (München, D)
• Bromphenolblau	Serva (Heidelberg, D)
• BSA	Merck (Darmstadt, D)
• Difko Skim Milk	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
• Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe, D)
• dNTP-Mix	Qiagen (Hilden, D)
• Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium (DMEM), High Glucose	Gibco BRL (Basel, CH)
• Dulbecco´s PBS (phosphate buffered saline)	PAA (Pasching, A)
• Essigsäure	Merck (Darmstadt, D)
• Äthanol	Merck (Darmstadt, D)
• Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG (Berlin, D)
• First Strand Buffer	Gibco BRL (Basel, CH)

- Gelatine Merck (Darmstadt, D)
- Gelelektrophorese, Längenmarker 100bp Boehringer (Mannheim, D)
- Glycerin Merck (Darmstadt, D)
- Glycin Roth (Karlsruhe, D)
- Hämalan Merck (Darmstadt, D)
- Interleukin-2 PeproTech (Hamburg, D)
- Kaliumhydrogensulfat Roth (Karlsruhe, D)
- Leupeptin Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Lymphozytenseparationsmedium Biocoll Biochrom KG (Berlin, D)
- Mercaptoäthanol Roth (Karlsruhe, D)
- Methanol Merck (Darmstadt, D)
- Mg Fluka (Neu-Ulm, D)
- N,N'-N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) Roth (Karlsruhe, D)
- Natriumchlorid Roth (Karlsruhe, D)
- NP-40 (Nonidet) Fluka (Neu-Ulm, D)
- Penicillin / Streptomycin Gibco BRL (Basel, CH)
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Roth (Karlsruhe, D)
- Pierce ECL Western Blotting Substrate Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
- Ponceau-Rot S Merk (Darmstadt, D)
- Random hexamers Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- RNase freies Wasser Quiagen (Hilden, D)
- RPMI 1640 Lonza (Veviers, BE)
- SDS-PAGE, Molecular Weight Standard, Broad Range BioRad (München, D)
- Sodiumdodecylsulfatpolyacrylamid (SDS) Roth (Karlsruhe, D)

- Superscript II RNase H⁻ Invitrogen (Paisley, UK)
- TrisHCl Applichem (Darmstadt, D)
- Trypsin Hyclone (Rogan, UT, USA)
- Tween Merck (Darmstadt, D)
- Xylenyanol Fluka (Neu-Ulm, D)

2.2 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
• ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
• Bestrahlungsmaschine: Gammacell 40 Exactor	MDS Nordion (Ottawa, CDN)
• CO ₂ -Inkubator	Sanyo (Gunma, JP)
• Durchflusszytometer: Cyan ADP flow cytometer	Dako (Cambridge, UK)
• Elisa Reader Mithras LB 940	Berthold Technologies (Bad Wildbad, D)
• Eppendorf Pipetten Research 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl	Eppendorf (Hamburg, D)
• Heizbad	Haake Messtechnik (Karlsruhe, D)
• Mikroskop Eclipse TS100	Nikon (Tokio, JP)
• Mini-Protean 2 Elektrophoresekammer	BioRad (München, D)
• NK-Zellyse Messgerät: 1205 Betaplatte liquid scintillation counter	PerkinElmer Wallac (Freiburg, D)
• Photometer NanoDrop 2000	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
• Pipettierhilfe, Pipetus-Akku	Hirschmann (Eberstadt, D)
• Schüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments (Schwabach, D)
• Schwämme für Western Blot	BioRad Laboratories (München, D)

- Sterilbank HeraSafe Heraeus (Hanau, D)
- Thermocycler: Biometra (Göttingen, D)
Biometra TProfessional
- Thermomixer comfort Eppendorf (Hamburg, D)
- Waagen: Kern (Balingen, D)
Analysenwaage ABJ 320-4
Feinwaage PLJ2100-2M
- Zentrifugen: Eppendorf (Hamburg, D)
Centrifuge 54AR
Biofuge pico Hereaus (Hanau, D)
Multifuge 3S-R Hereaus (Hanau, D)
- Zentrifugenfilter Centricon® Millipore Corporation (Bedford, MA, USA)
YM-3

2.3 Verbrauchsmaterialien

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>
• Deckgläschen 22x60mm	Menzel (Braunschweig, D)
• Disposable Serological Pipette 5ml, 15ml, 25ml	Corning Costar (Bodenheim, D)
• ECL-Filme Hyperfilm™ ECL™	Amersham Pharmacia Biotech, (Freiburg, D)
• Eppendorf-Reaktionsgefäße Safe-Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg, D)
• Falcon Tubes 10 ml, 50 ml	Becton-Dickinson (Heidelberg, D)
• Invasionskammer	BD Bioscience (New York City, NY, USA)
• Luma Plates	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
• Migrationskammer	BD Bioscience (New York City, NY, USA)
• Nitrozellulosemembran	Bio-Rad (München, D)

- | | |
|---|--|
| • Objektträger 76x26mm | Menzel Gläser (Braunschweig, D) |
| • PCR Tubes Pure Packs | Molecular BioProducts (San Diego, CA, USA) |
| • Pipettenspitzen Gilson | Greiner Bio-One (Frickenhausen, D) |
| • Pipettenspitzen, gestopft,
1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl | Biozym (Oldendorf, D) |
| • qPCR Platten Micro Amp | Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) |
| • Röntgenfilm
Hyperfilm ECL | Amersham Biosciences (Freiburg, D) |
| • Trans Blot-Kammer | BioRad (München, D) |
| • Zellkulturflaschen | Nunc (Roskilde, DK) |
| • Zellkulturplatten
24-Well, 6-Well, 12-Well | Nunc (Roskilde, DK) |
| • Zellschaber | Corning Costar (Bodenheim, D) |

2.4 Komplettsysteme

- | <u>Artikel</u> | <u>Hersteller</u> |
|-----------------------------------|----------------------|
| • qPCR™ Mastermix for SYBRGreen I | Eurogentec (Köln, D) |
| • RNeasy Mini Kit | QIAgen (Hilden, D) |

2.5 Antikörper

2.5.1 Antikörper für Analysen im Durchflusszytometer

Bezeichnung/ Spezifität	Organismus/ Typ	Konjugat	Hersteller	Verdünnung der Stocklösung
Anti-human- Semaphorin7A (CD108) Klon KS-2	Maus IgG _{2a} ,κ	R-Phycoerythrin	BD Biosciences	2 µg/ml
Isotyp-Kontrolle Klon G155178	Maus IgG _{2a} ,κ	R-Phycoerythrin	BD Biosciences	25 µg/ml
Anti-human- α ₁ -Integrin (CD49a) Klon SR84	Maus IgG1,κ	R-Phycoerythrin	BD Biosciences	2 µg/ml
Anti-human- β ₁ -Integrin (CD29) Klon MAR4	Maus IgG1,κ	R-Phycoerythrin	BD Biosciences	2 µg/ml
Isotyp-Kontrolle Klon MOPC-21	Maus IgG1,κ	R-Phycoerythrin	BD Biosciences	25 µg/ml
Anti-human- Plexin C1 (CD232)	Goat IgG	/	R&D Systems	2 µg/ml
Zweitantikörper Anti-goat-IgG Sc-53803	Maus IgG	R-Phycoerythrin	Santa Cruz	100 µg/ml
Isotyp- Kontrolle Anti-human-IgG Sc-3992	Goat IgG	R-Phycoerythrin	Santa Cruz	100 µg/ml

Tabelle 1 Antikörper für Analysen im Durchflusszytometer

2.5.2 Antikörper für Analysen im Western Blot

Bezeichnung/ Spezifität	Organismus/ Typ	Firma	Verdünnung
Anti-human- Semaphorin 7A (CD108) Klon MEM-150	Maus IgM,k	BioLegend	1 : 500
Zweitantikörper Anti-Maus	Donkey IgG- Konjugat:HRP	Santa Cruz	1 : 3000

Tabelle 2 Antikörper für Analysen im Western Blot

2.6 Zelllinien und Zellkultur

Die humanen malignen Gliomzelllinien wurden bei 37°C und 5% Kohlendioxidgehalt der Brutschrankinnenluft in modifiziertem Dulbecco's Medium (DMEM) kultiviert. Zusätzlich wurden dem Medium 10% fetales Kälberserum (FCS), 100 IE/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Die Zellen wurden als Monolayer kultiviert und alle 2 – 3 Tage bei Erreichen von ca. 75% Konfluenz passagiert. Dazu wurden die Zellen nach vollständigem Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen und für 2 – 5 Minuten mit Trypsin zur Ablösung inkubiert. Anschließend wurden sie in frischem Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:5 bis 1:10 passagiert.

Die Gliomzelllinien U87MG, T98G, die murine Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 und die humane B-Zelllinie RPMI 8866 wurden bei der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) erworben. Die Gliomzelllinien LN-18, U138MG, LN-428, D247MG, LN-319, LNT-229, A172, U251MG, U373MG und LN-308 wurden von Prof. Dr. N. de Tribolet (Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

2.7 RNA-Isolierung und photometrische

Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Zellen einer konfluenten, mittleren Zellkulturflasche (75 cm²) wurden mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und in Vollmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm über 5 Minuten pelletiert. Danach wurden das überstehende Medium abgesaugt und die Zellpellets im Eisbad zwischengelagert. Jeder Arbeitsschritt erfolgte mit autoklaviertem Material, Handschuhen und gestopften Pipettenspitzen. Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen und gemäß der Herstelleranleitung zügig und auf Eis gekühlt isoliert. Der DNA-Verdau erfolgte mit dem RNase-Free DNase Set der Firma Qiagen gemäß Herstelleranleitung. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde 1 µl RNA-Lösung gegen 1 µl H₂O als Leerwert bei 260 nm im Photometer gemessen. Die RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.8 Umschreiben der RNA in cDNA - Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Für die cDNA Erststrangsynthese wurden 2 µg RNA als Template in 11 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die cDNA-Synthese erfolgte durch reverse Transkription der RNA. Den Poly(A)-Enden der mRNA wurden Random Hexamer Primer angelagert, indem die Random-Primer und das RNA-Gemisch für zehn Minuten bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt wurden. Nach Zugabe von 4 µl 5 x First Strand Puffer, 2 µl 0,1 mol DTT und 1 µl 10 mmol dNTP Mix, wurde für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Superscript II ermöglichen die Random-Primer die Verlängerung des cDNA-Strangs. Die Reverse Transkriptase-Reaktion wurde für 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden die Superscript II RNase H⁻ Reverse Transkriptase für 15 Minuten bei 70°C hitzedenaturiert und der Ansatz danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Die cDNA wurde nun entweder einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zugeführt oder bei -20°C eingefroren und für weitere Versuche aufbewahrt.

cDNA-Synthese-Ansatz: 2 µg RNA in 11µl H₂O
1 µl Random Primer
4 µl 5 x First Strand Buffer
2 µl 0,1 mol DTT
1 µl 10 mmol dNTP Mix
1 µl Superscript II

2.9 Amplifikation der cDNA und Bestimmung der mRNA Konzentration

Die in der reversen Transkription hergestellte cDNA wurde nun in einer nachfolgenden PCR-Reaktion eingesetzt, um die zu untersuchende Zielsequenz zu amplifizieren. Zu Amplifikation und qualitativen Nachweis der Zielnukleinsäure wurde die in Abschnitt 2.9.1 beschriebene konventionelle PCR benutzt. Für einen quantitativen Nachweis der Zielsequenz und einen dadurch möglichen Rückschluss auf die Menge der vor der RT-PCR vorhanden mRNA, wurde die cDNA einer quantitativen PCR (siehe Abschnitt 2.9.2) zugeführt. Um die Qualität der eingesetzten cDNA beurteilen zu können, wurde bei jedem Versuch zusätzlich zur untersuchten Zielsequenz die Sequenz eines Haushaltsgens amplifiziert und nachgewiesen. Zudem diente bei der quantitativen PCR die Messung der Expression des Haushaltsgens der relativen Quantifizierung der Genexpression der zu untersuchenden Zielsequenz.

2.9.1 Konventionelle PCR

Mittels einer PCR durch die Taq-Polymerase (temperaturstabile Polymerase aus *Thermus aquaticus*) wurde die cDNA mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert.

Das Temperaturprogramm sah wie folgt aus:

<u>Denaturierung:</u>	5 min bei 95°C
<u>Synthesezyklen (34):</u>	40 Sekunden bei 95°C (Denaturierung)
	1 Minute bei 57°C für Semaphorin 7A oder
	1 Minute bei 50.5°C für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Primer-Annealing)
	1 Minute bei 72°C (DNA-Synthese)
<u>Nachsynthese:</u>	10 Minuten bei 72°C
<u>PCR-Ansatz:</u>	40 µl H ₂ O
	3 µl Mg
	1 µl cDNA
	0,5 µl Taq-Polymerase
	1 µl 10 mmol dNTP-Mix
	0,25 µl forward Primer
	0,25 µl reverse Primer
	5µl 10 x PCR-Mix

Um das Ergebnis der PCR zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese der PCR Produkte durchgeführt. Hierbei wurden die DNA-Proben in einem 1%igen Agarosegel, das Ethidiumbromid (EtBr) enthält, der Größe nach aufgetrennt. Das Agarosegel wurde hergestellt, indem 1g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer thermisch in der Mikrowelle gelöst wurde. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C wurde das EtBr (0,2 µg/ml) hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung in eine Gelkammer gegossen und ausgehärtet. Die elektrophoretische

Auftrennung wurde bei 100 V für 20 Minuten durchgeführt. Als Längenstandard diente ein Broad-Range Marker der Firma BioRad.

50 x TAE-Puffer : 242 g Tris
 57,1 ml Essigsäure (100%)
 100 ml 0,5 mol EDTA, pH = 8

1 x TAE-Puffer : 10 ml 50 x TAE-Puffer mit dd H₂O
 ad 500 ml

DNA-Ladepuffer : 0,25% Bromphenolblau
 0,25% Xylenxyanol
 7 ml dd H₂O

2.9.2 Quantitative PCR

In Anwesenheit eines DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green I), der mit doppelsträngiger DNA interkaliert, wird eine PCR-Reaktion durchgeführt. Durch die Messung der Fluoreszenz nach jedem einzelnen Reaktionszyklus, werden eine kontinuierliche Aufzeichnung der Produktbildung über die Zeit ermöglicht und Rückschlüsse auf die Menge der eingesetzten Zielnukleinsäure zugelassen. Dabei ist die gemessene Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Produktmenge, welche mit dem ABI Prism 7000 Sequence Detection System mit angeschlossener ABI Prism 7000 SDS Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gemessen wurde. Die PCR Reaktion wurde für alle Experimente nach denselben Bedingungen durchgeführt.

Das Temperaturprogramm sah wie folgt aus:

40 Zyklen mit 95°C über 15 Sekunden und 60°C über 1 Minute.

Die relative Quantifizierung der Genexpression erfolgte durch die Normalisierung der Expression des Zielgens mit der Expression eines nicht regulierten Referenzgens, welche beide aus der gleichen cDNA-Probe stammten und amplifiziert wurden. Als Referenzgen diente das Haushaltsgen 18S. Dieses Gen codiert die ribosomale Untereinheit 18S. Die Normalisierung auf dieses ubiquitär vorkommende und homogen exprimierte Haushaltsgen dient nicht der Bestimmung der absoluten Startkopienzahl oder Startkonzentrationen der mRNA. Vielmehr wird die Expression des Zielgens zur Expression des Haushaltsgens ins Verhältnis gesetzt. Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge werden die sog. CT(cycle threshold)-Werte herangezogen. Der CT-Wert beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt und ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau erreicht. Aus dem ermittelten Verhältnis aus Zielsequenz und endogenem Referenzgen kann nun die Genexpression abgeleitet und die unterschiedliche Ausprägungsmenge der Zielgenexpression in verschiedenen Zellen quantifiziert werden. Die relative Expression des Zielgens wird auf die Kontrollprobe, hier die cDNA der Gliomzelllinie D247 oder cDNA von Monozyten, bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte dann durch die sog. $\Delta\Delta$ -CT Methode. Der relative Expressionsunterschied (Ratio) eines Zielgens zwischen Tumorzellen und nicht-Tumorzellen, normalisiert zum Referenzgen (hier 18S) und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta ct}$ (Livak et al., 2001).

Diese setzt sich wie folgt zusammen:

$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}$

$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Tumorzellen} - \Delta CT \text{ nicht-Tumorzellen (Kontrolle)}$

Ratio = $2^{-\Delta\Delta ct}$

Die Ergebnisse werden als Vielfaches der zum endogenen Referenzgen normalisierten Genexpression des Zielgens und relativ zur Kontrolle angegeben. Anhand von Schmelzkurvenanalysen konnte zwischen spezifischen PCR-Produkten und eventuell nicht spezifischen PCR-Produkten oder gebildeten Primer-Dimeren, welche einen anderen bzw. niedrigeren Schmelzpunkt aufweisen würden, unterschieden werden. Primer des Referenzgens 18S lagen in einer 1 µmol Stocklösung vor und wurden im Verhältnis 1:100 mit dd H₂O verdünnt. Die spezifischen Primer lagen in einer 5 µmol Stocklösung vor und wurden im Verhältnis 1:20 mit dd H₂O verdünnt. Die verwendeten cDNA Proben wurden im Verhältnis 1:30 mit dd H₂O verdünnt.

PCR Ansatz: 0,7 µl H₂O
 0,9 µl forward Primer
 0,9 µl reverse Primer
 7,5 µl SYBR Green Master Mix I
 5 µl cDNA

2.9.3 Primer

<u>Primer</u> <u>quantitative PCR</u>	<u>Sequenz</u>
Plexin C1 vorwärts	5'-AGAAAAGCTGGCTGGATATTTTCGT-3'
Plexin C1 rückwärts	5'-GCTTCCCACCATAGTCACTGTA-3'
Semaphorin 7A vorwärts	5'-GGTGAATATCGGCTCCACAAA-3'
Semaphorin 7A rückwärts	5'-CACTGCATACCAGCATGGCTT-3'
18S vorwärts	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'
18S rückwärts	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'

Tabelle 3 Primer für die quantitative PCR. Diese wurden alle bei der Firma Sigma-Aldrich erworben.

<u>Primer</u> <u>konventionelle PCR</u>	<u>Sequenz</u>
Plexin C1 vorwärts	5'-TGAAAGAGTCCAACCAATCGC-3'
Plexin C1 rückwärts	5'-ACAGGATCAGGAACGAGTTTGTA-3'
Semaphorin 7A vorwärts	5'-ACGGTGAATATCGGCTCCAC-3'
Semaphorin 7A rückwärts	5'-CTCGTCCCCTTCAAACAGAAC-3'
GAPDH vorwärts	5'-ACGACAGTCCATGCCATCAC-3'
GAPDH rückwärts	5'-TCCACCACCCTGTTCTGTA-3'

Tabelle 4 Primer für die konventionelle PCR. Diese wurden alle bei der Firma Sigma-Aldrich erworben.

2.10 Durchflusszytometrie

Die Proteinexpression von Semaphorin 7A, Plexin C1, α_1 -Integrin und β_1 -Integrin der 12 humanen Gliomzelllinien wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (Antikörper siehe Tabelle 1). Die Zellen einer mittleren Zellkulturflasche, die zu 75% konfluent waren, wurden mit Accutase inkubiert, bis eine homogene Zellsuspension entstand. Von dieser Zellsuspension wurden 200 μ l mit $0,5 \times 10^6$ Zellen in eine 96-well-Platte mit rundem Boden pipettiert und für 3 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS, das 2% FCS enthielt, wurden die Zellpellets durch kurzes Vortexen aufgelockert und für 30 Minuten bei 4 °C lichtgeschützt mit dem spezifischem Antikörper (25 μ g/ml) oder dem jeweiligen Isotyp-Kontrollantikörper (25 μ g/ml) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen nochmals mit PBS + 2% FCS gewaschen und anschließend die Proteinspiegel im Durchflusszytometer gemessen. Der spezifische Fluoreszenz-Index (SFI) wurde aus dem Quotienten der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der mit dem spezifischen Antikörper gefärbten Zellen und der mit dem Kontrollantikörper gefärbten Zellen errechnet.

2.11 Herstellung von Proteinlysaten und Proteinbestimmung nach Bradford

Um Proteinlysate herzustellen, wurden von jeder Zelllinie 2×10^6 Zellen ausgesät. Nach 24 h waren die Zellen komplett adhärent. Nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen auf Eis gekühlt und mit einem Zellschaber in kaltem PBS, das 1 mmol PMSF enthielt, vom Boden der Zellkulturflasche abgeschabt. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten bei 1400 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Lyse-Puffer P resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand gewonnen und eine Proteinbestimmung nach Bradford angeschlossen.

Lyse-Puffer P:

- 1 mol TrisHCl
- 5 mol NaCl
- 0,5% NP-40 (Nonidet)
- 0,5 mmol EDTA pH8
- Aqua dest ad 100ml

Zugabe von Proteinaseinhibitoren:

- 1 ml Lyse-Puffer P
- 10 µg/ml Aprotinin
- 10 µg/ml Leupeptin
- 5,7 µl PMSF

Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde mit dem Protein Assay Dye Reagent (BioRad) nach Herstellerangaben durchgeführt und für die Kalibrierung diente eine Standardreihe BSA. Alle Proben wurden als Triplets pipettiert und die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch bei 595 nm im Elisa Reader.

2.12 Aufkonzentrieren von Zellüberständen

Für das Aufkonzentrieren von Zellüberständen wurden das Medium von Zellen einer mittleren Zellkulturflasche, welche zu 75% konfluent waren, durch serumfreies Medium ersetzt und die Zellen für weitere 48 h im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden der Zellüberstand aufgenommen, in Zentrifugen-filter mit einer Trenngrenze von 3000 Da gegeben und 45 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Bradford-Analyse wie in Abschnitt 2.11 beschrieben durchgeführt.

2.13 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine diskontinuierliche SDS-Gel-Elektrophorese unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen. Von jeder Probe wurde 20 µg Protein eingesetzt. Vor dem Beladen der Taschen des Sammelgels wurden die Proteinproben mit 10 µl 2 x Lämmli Puffer und 1 µl β-Mercaptoethanol versetzt und für 10 Minuten bei 95°C im Heizblock denaturiert. Anschließend wurden die Proben bis zu Beginn der Elektrophorese auf Eis gestellt. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte in einer Mini-Protean II Elektrophorese-Kammer mit einer konstanten Spannung von 200 V und einem 10%igem Trenngel. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der mitgeführte Proteinstandard die gewünschte Auftrennung anzeigte.

2 x Lämmli-Puffer: 100 mmol Tris-HCl pH 6,8
 4 % SDS
 0,2 % Bromphenolblau
 20 % Glycerol
 mit H₂O ad 10 ml

Trenngel 10%: 2 ml dd H₂O
 1,7 ml 30%iger Acrylamid-Mix
 1,3 ml 1,5 mol Tris-HCl, pH 8,8
 0,05 ml 10%iges SDS
 0,05 ml 10%iges APS
 0,002 ml TEMED

Sammelgel: 1,15 ml dd H₂O
 0,33 ml 30%igen Acrylamid-Mix
 0,5 ml 0,5 mol Tris-HCl, pH 6,8
 0,2 ml 10%iges SDS
 0,02 ml 10%iges APS
 0,002 ml TEMED

5 x Laufpuffer: 124 mmol Tris
 960 mmol Glycin pH 8,7
 0,5 % SDS

Vor Gebrauch wurde der 5 x Laufpuffer 1:5 mit H₂O verdünnt.

2.14 Western Blot und Immunodetektion

Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mittels einer Blot-Kammer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Auf die Kathode der Blotting-Klammer wurde ein Schwamm gelegt, darauf zwei Filterpapiere und das der Gelelektrophorese entnommene Gel, wobei vorher das Sammelgel abgetrennt wurde. Auf das Gel folgte die Nitrozellulose-Membran, dann weitere 2 Filterpapiere und ein Schwamm. Schwämme, Filterpapiere, Gel und die Nitrozellulose-Membran wurden vor Zusammenbau der Klammer auf eine Größe von 7,5 x 8,5 cm zugeschnitten und in 1 x Transferpuffer äquibriert. Die Kathode der Blotting-Klammer wurde auf den zweiten Schwamm aufgelegt und in die mit gekühltem 1 x Transferpuffer gefüllte Blot-Kammer gesteckt. Das Blotting wurde mit einer konstanten Spannung von 100 V für 60 min unter gekühlten Bedingungen durchgeführt. Im Anschluss folgte die Immunodetektion mittels spezifischer Antikörper (siehe Tab. 2). Hierfür wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Blot für 30 min bei Raumtemperatur in Blocking-Solution geschwenkt, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem spezifischen Erstantikörper in TS-TMBSA inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween 20 für jeweils 10 Minuten folgte die Inkubation mit einem HRP-

konjugierten Zweitantikörper der 1 : 3000 in 7 ml 5%iger Magermilch und 14 ml PBS/Tween verdünnt wurde. Es folgte nochmal dreimaliges Waschen der Membran mit PBS/Tween für jeweils 10 Minuten. Danach wurde die Membran mit Pierce ECL-Lösung für 1–5 Minuten inkubiert und anschließend im Dunkeln ein Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt.

10 x Transferpuffer: 250 mmol Tris
1,92 mol Glycin

1 x Transferpuffer: 100 ml 10 x Transferpuffer
200 ml Methanol
700 ml dd H₂O

TS-TMBSA: 10 mmol TrisHCl, pH 7,4
100 mmol NaCl
0,1 % Tween 20
5 % Magermilch
2 % BSA
0,01 % Natriumazid
Ad 500 ml dd H₂O

Blocking Solution: PBS
5% Magermilch
0.05% Tween 20

2.15 Posttranskriptionelles Gene Silencing mittels RNA-Interferenz

Das Prinzip der RNA-Interferenz mittels siRNAs wurde erstmals 2001 von Elbashir et al. beschrieben und hat in den letzten 10 Jahren enorm an Bedeutung gewonnen. Seitdem hat sich das Gebiet der RNA-Interferenz stetig weiterentwickelt bis hin zur Anwendung in klinischen Studien (Castanotto et al., 2009; Behlke et al., 2008). Das Prinzip des Gene-Silencing mittels siRNAs lehnt sich an einen natürlich vorkommenden Mechanismus zum Schutz des Genoms an. Zu diesen Schutzmechanismen gehören u.a. die antivirale Verteidigung, wie man sie in Pflanzen findet (Voinnet et al., 2001) und der Schutz vor Transposons (Tabara et al., 1999; Ketting et al., 1999).

Der postulierte siRNA-Mechanismus wird in Abb. 2 schematisch dargestellt. Dabei wird doppelsträngige RNA (dsRNA) in eine Zelle eingeschleust, welche intrazellulär mit verschiedenen Proteinen den RNA-induced silencing complex (RISC) bildet. Durch einen ATP-abhängigen Vorgang wird die doppelsträngige siRNA entwunden und es entsteht ein Komplex, der die Zielsequenz der komplementären mRNA erkennt und somit deren Abbau einleitet.

Die Transfektion mit spezifischen Semaphorin7A siRNA und unspezifischer non-target siRNA als Negativkontrolle wurde in 6-well Gewebekulturplatten durchgeführt. Hierzu wurden 300 000 der zu transfizierenden Zellen 24 h vor der Transfektion ausgesät. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und antibiotikafreies Vollmedium vorgelegt. Als Transfektionsreagenz wurde Metafectene Pro gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration der verwendeten siRNAs betrug 100 nm.

2.15.1 siRNAs

<u>siRNA</u>	<u>Sequenz</u>
Semaphorin 7A siRNA	5'-CUGAGAAUGAGGGCACCGA [dt] [dt]-3' 5'-UCGGUGCCCUCAUUCUCAG [dt] [dt]-3' Sigma-Aldrich
siControl® Non-Target siRNA # 4	Dharmacon

Tabelle 5 siRNA

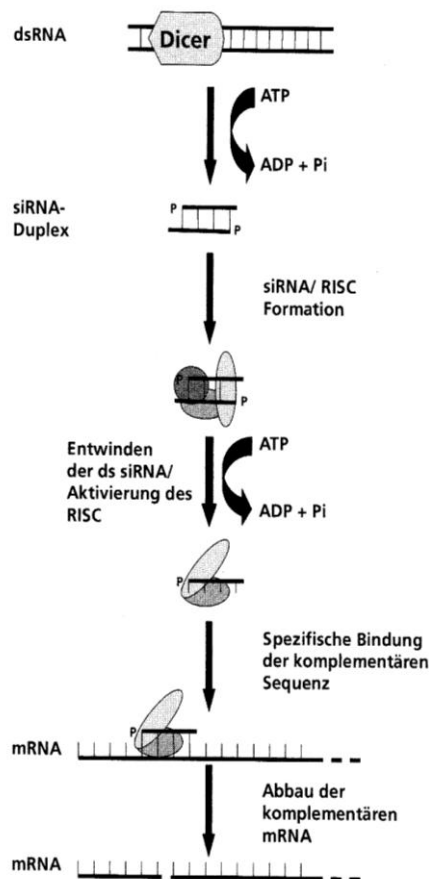


Abbildung 2 Mechanismus der RNA Interferenz. Nachdem das Enzym Dicer eine lange dsRNA in viele 21-25mere Ribonukleotide (siRNA) gespalten hat, interagieren diese siRNAs mit verschiedenen Proteinen zur Ausbildung des so genannten „RNA-induced silencing complex“ (RISC). Die Helicaseaktivität des RISC entwindet unter ATP-Verbrauch die doppelsträngige siRNA (siRNA-Duplex), so dass diese als Einzelstrang siRNA an ihre einzelsträngige komplementäre mRNA in der Zelle binden kann. Die Endonukleaseaktivität des RISC spaltet nun die gebundene mRNA und leitet dadurch deren Abbau ein. (modifiziert nach Bopp T, aus Gentechnische Methoden, 4.Auflage; 2007)

2.16 Invasion und Migration

Das Migrations- und Invasionsverhalten der mit siRNA transfizierten Zellen wurde mit Hilfe eines modifizierten Boyden-Kammer-Systems durchgeführt. Dazu wurden zweikammerige Matrigel-Invasionskammern und Migrationskammern verwendet (Abb. 3). Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens sind beide Kammern durch eine PET-Membran mit 8 µm großen Poren voneinander getrennt. Zur Untersuchung des Invasionsverhaltens waren die beiden Kammern zusätzlich durch eine künstliche Basalmembran (Matrigel) voneinander getrennt. Matrigel ist ein lösliches Basalmembranextrakt, welches aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Sarkom der Maus gewonnen wurde (Kleinmann et al., 1982). Dieser Tumor ist reich an Proteinen der extrazellulären Matrix von Basalmembranen wie Laminin, Kollagen Typ IV, Heparan-Sulfat Proteoglykane und Entacin/Nidogen (Kleinmann et al., 1986). Zu Beginn mussten die Invasionskammern von -20°C auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Migrationskammern konnten bei Raumtemperatur gelagert werden. Die unteren Kammern und die oberen Kammern (Inserts) wurden mit jeweils 500 µl serumfreiem Medium (SFM) befüllt und für 2 h bei 37°C im Brutschrank rehydriert. Während dieser Zeit wurden die zu untersuchenden Zellen mit Accutase inkubiert, bis eine homogene Zellsuspension entstand. Die Zellen wurden in Vollmedium aufgenommen, vorsichtig herunter zentrifugiert und wiederum in SFM aufgenommen und auf die für die Invasion bzw. Migration nötige Zellanzahl gebracht. Für die Zelllinie U87MG betrug die benötigte Zellzahl 80 000 Zellen/Insert für die Migration und 320 000 Zellen/Insert für die Invasionsversuche. Das SFM wurde aus den Wells und Inserts abgesaugt und die Kammern mit jeweils 750 µl des durch die embryonale Mausfibroblastenzelllinie NIH/3T3 konditionierten Mediums befüllt. Das NIH/3T3-konditionierte Medium wurde dadurch gewonnen, dass 2×10^6 NIH/3T3 Zellen in eine mittlere Zellkulturflasche ausgesät wurden und nach 24 h das Medium durch 7 ml SFM ersetzt wurde. Nach weiteren 48 h konnte das SFM gewonnen werden und diente durch die im Medium befindlichen chemotaktischen Substanzen der Induzierung der Migration bzw. Invasion. Die

Inserts wurden eingesetzt und 500 µl Zellsuspension mit der gewünschten Zellanzahl vorgelegt.

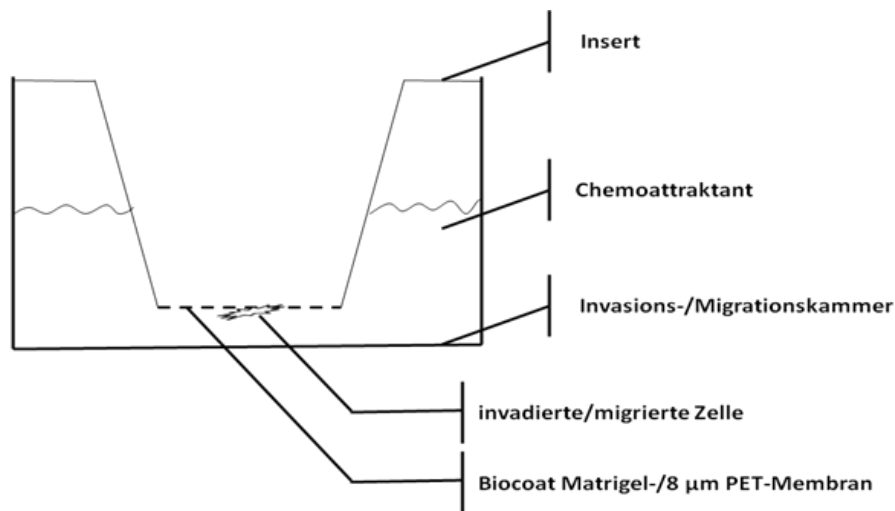


Abbildung 3 Schematische Darstellung einer Migrations-/Invasionskammer

Nach 16 h wurden die nicht invadierten/migrierten Zellen mit einem Wattestäbchen von der Membranoberfläche entfernt und die invadierten/migrierten Zellen 10 Minuten mit Methanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten mit Hämalaun gefärbt und in Leitungswasser gewaschen. Die Membran wurde mit einem Skalpell aus dem Insert geschnitten, mit der Unterseite nach oben auf einen Objektträger gelegt und das Deckglas mit Gelatine fixiert. Die Auszählung der Zellen erfolgte am Mikroskop bei 125-facher Vergrößerung.

2.17 Chromfreisetzungsversuch

2.17.1 PBMC-Präparation

Für die Gewinnung von PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) wurden 50 ml venöses, heparinisiertes Blut von gesunden Spendern gewonnen und 1:2 mit sterilem PBS verdünnt. Daraufhin wurden 15 ml eines Lymphozytenseparationsmedium in 50 ml Falcon Tubes vorgelegt und vorsichtig mit 35 ml Blut-PBS-Gemisch überschichtet. Dabei musste darauf geachtet werden, dass sich die Phasen nicht miteinander vermischen. Anschließend wurde für 20 Minuten bei 600 rpm und Raumtemperatur ohne

Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 10 – 15 ml der obersten Fraktion, die Serum, PBS und Thrombozyten enthält, abgenommen und verworfen. Danach wurde nochmals für 30 Minuten bei 1400 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, um die Trennung von Lymphozyten, Granulozyten, Erythrozyten und toten Zellen zu erreichen. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Fraktionen befanden sich von unten nach oben Erythrozyten, Lymphozytenseparationsmedium, Lymphozyten und darüber Serum (Abb. 4).

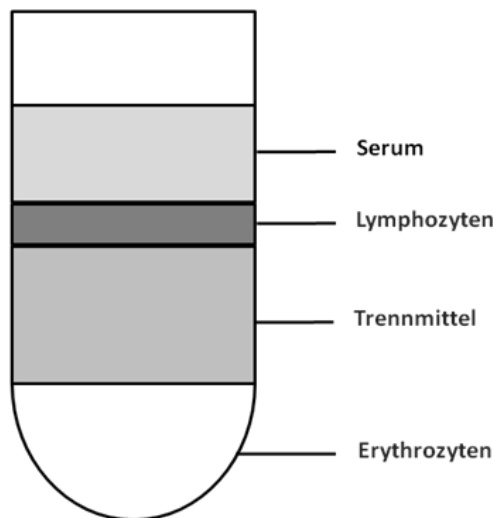


Abbildung 4 Schematische Darstellung des Dichtegradienten im Falcon-Tube

Die Lymphozyten wurden vorsichtig mit einer Pipette entnommen und in ein 50 ml Falcon-Tube überführt, in PBS suspendiert und für 8 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Sofern ein deutliches Pellet zu sehen war, wurde der Überstand verworfen und das Pellet erneut in PBS resuspendiert und nochmals für 8 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Lymphozyten in RPMI-1640 Medium, das 10% FCS enthielt, resuspendiert und gezählt. Im Anschluss folgte eine Monozytendepletion durch Adhärenz. Dazu wurden 8 – 10 Millionen PBMCs pro Well in eine 6-well Platte ausgesät und für 90 min im Brutschrank inkubiert. Dabei adhären die Monozyten an der Plastikoberfläche der Wells, während sich die restlichen Zellpopulationen, jetzt PBLs (peripheral blood lymphocytes) genannt, durch Spülen wieder in Suspension bringen lassen. Bei erneuter Zählung der Suspension lag der Anteil der durch Adhärenz depletierten Zellen bei ca. 15 – 25%.

2.17.2 Kokultivierung mit RPMI 8866 und Herstellung von NK-Zellklonen

Die PBLs wurden in RPMI-1640 Medium, das 10 % FCS enthielt, resuspendiert, auf eine Konzentration von $0,8 \times 10^6$ gebracht und anschließend jeweils eine Menge von 0,5 ml/Well in 24-Well Platten vorgelegt. Für die Gewinnung von NK-Zellklonen wurden die PBLs mit RPMI 8866 als feeder cells, die zuvor mit 30 Gy bestrahlt worden waren, in Kokultur genommen. Durch die Bestrahlung wurde eine weitere Proliferation der feeder cells verhindert. Das Verhältnis von PBLs und feeder cells lag bei 4:1. Zur weiteren Aktivierung der NK-Zellproliferation wurde einmalig 5000 U/ml Interleukin-2 der Zellkultur hinzugegeben. Die NK-Zellklone konnten nach 8 bis 11 Tagen geerntet werden.

2.17.3 Chromfreisetzungsversuch mit definierten Effektor/Target Verhältnissen

Mit dem Chromfreisetzungsversuch wird die Zytotoxizität von Effektorzellen, hier NK-Zellen, überprüft. Als Targetzellen dienen die Gliomzelllinien U87MG, LNT-229 und LN-18, welche vorher mit Semaphorin 7A siRNA oder non-target siRNA transfiziert und anschließend mit radioaktivem Chrom versetzt worden waren. Der Erfolg des transienten Gen-Knockdowns wurde im Durchflusszytometer mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern überprüft. Nach Koinkubation von Effektor und Targetzellen kam es zur Lyse der Targetzellen und somit zur Freisetzung des radioaktiven Chroms, welches im Überstand gemessen werden konnte.

Vorbereitung der Targetzellen: Die Tumorzellen wurden mit Accutase inkubiert, bis sich eine homogene Zellsuspension bildete. Anschließend wurden die Zellen in Vollmedium (VM) aufgenommen, gewaschen, gezählt und 1×10^6 der Targetzellen in 1 ml VM resuspendiert und anschließend mit 15 μ l radioaktivem ^{51}Cr Natriumchromat $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ für 90 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit nehmen die Targetzellen das Chrom aktiv auf. Nach dieser Inkubationszeit folgte nochmals 3-maliges Waschen mit PBS, um nicht aufgenommenes Chrom zu entfernen. Anschließend wurden die Targetzellen in 5 ml RPMI-1640 Medium resuspendiert.

Vorbereitung der Effektorzellen: Die NK-Zellen wurden während der Inkubation der Targetzellen in RPMI-1640 Medium aufgenommen, gezählt und auf eine Konzentration von 8×10^6 Zellen / ml gebracht. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Effektorzellen in eine 96-Well-Platte transferiert und eine Verdünnungsreihe erstellt, wobei die Zellen in 5 Schritten jeweils 1:2 verdünnt wurden und sich in der geringsten Verdünnung 12500 NK-Zellen pro Well befanden.

Koinkubation der Effektor- und Targetzellen: Es wurden jeweils 50 µl der vorbereiteten Targetzellen zu den Effektorzellen in der 96-Well-Platte gegeben. Die dadurch erreichte Target-/Effektor-Ratio betrug 1:40 bis 1:1,25. Das Endvolumen pro Well betrug 100 µl und es wurde 4 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank koinkubiert.

Um die Lyse der Zellen quantitativ erfassen zu können, wurden Kontrollen mit spontaner und maximaler Chromfreisetzung mitgeführt. Für die Minimum-Kontrolle, die die spontane Chromfreisetzung aufzeigen sollte, wurde zu den 50 µl der Targetzellsuspension 50 µl RPMI-1640 Medium addiert. Für die Maximum-Kontrolle, die die vollständige Chromfreisetzung aufzeigen sollte, wurde zu den 50 µl der Targetzellsuspension 50 µl Lyse-Puffer P pipettiert. Lyse-Puffer P führt zur kompletten Lyse der Zellen und somit zur maximalen Freisetzung des aufgenommenen Chroms.

Nach der 4-stündigen Koinkubation wurden 35 µl pro Well des radioaktiven Überstandes vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und auf eine 96-Well Luma Plate transferiert. Nach 24 h war der Überstand vollständig eingetrocknet und die Luma-Plate konnte im beta-plate-counter ausgemessen werden. Der prozentuale Anteil der durch die NK-Zellen erfolgten Lyse der Tumorzellen wurde wie folgt berechnet:

$$100 \times \frac{\text{Lyse im Versuchswell - spontane Chromfreisetzung}}{\text{(Maximale Lyse - spontane Chromfreisetzung)}}$$

Alle Wells wurden in Triplets pipettiert und ausgewertet.

2.18 Statistik

Die folgenden statistischen Verfahren wurden angewandt:

- arithmetisches Mittel (Mittelwert)
- Standardfehler
- T-Test (Student's t-Test) für unverbundene Stichproben mit folgenden Signifikanzniveaus:

$P > 0,05$ = nicht signifikant und $P^* \leq 0,01$ = signifikant

Die Versuchsergebnisse werden angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler. In den Grafiken sind die Signifikanzniveaus durch Symbole angegeben und in einer Legende erörtert. Alle Versuchsreihen wurden mindestens 3 mal unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt. Alle Berechnungen erfolgten mit Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse von Semaphorin 7A und seinem Rezeptor Plexin C1 in der PCR

Mittels konventioneller PCR wurde die Expression von Semaphorin 7A und die Expression seines Rezeptors Plexin C1 auf mRNA-Ebene untersucht (Abb. 5). Um die Qualität der verwendeten RNA sicherzustellen, wurde bei jedem Experiment zusätzlich die mRNA-Expression des Haushaltgens GAPDH untersucht. Als Positivkontrolle diente ein Semaphorin 7A Plasmid, das uns von Dr. Akira Yamada (Kurume, Jp) zur Verfügung gestellt wurde. Für die Plexin C1 Positivkontrolle wurde cDNA von Monozyten verwendet, die Plexin C1 exprimieren (Comeau et al., 1998). Als GAPDH-Positivkontrolle diente ein GAPDH-Plasmid.

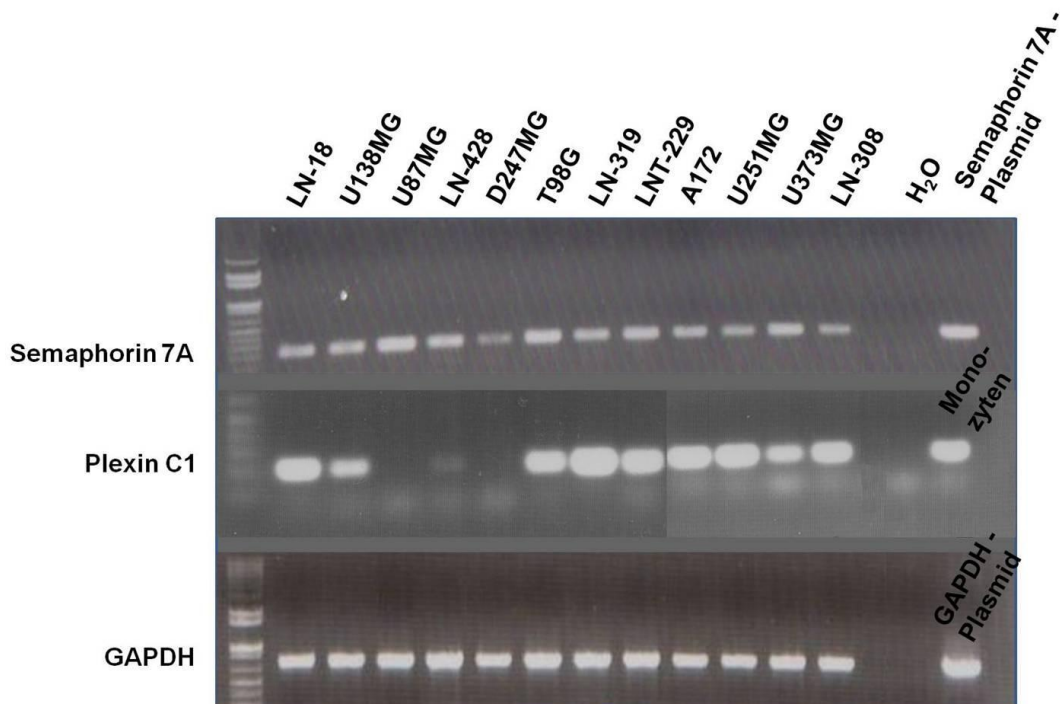


Abbildung 5 Maligne Gliomzellen exprimieren Semaphorin 7A mRNA und Plexin C1 mRNA *in vitro*. Die Semaphorin 7A und Plexin C1 Expression wurde mittels konventioneller PCR untersucht. Als Referenz diente das Haushaltgen GAPDH.

In allen 12 Gliomzelllinien konnte Semaphorin 7A mRNA detektiert werden. Besonders stark war dies bei U87MG, T98G, LNT-229 und U373MG:

Die Plexin C1 mRNA-Expression war bei LN-18, U138MG, T98G, LN-319, LNT-229, A172, U251MG, U373MG und LN-308 deutlich vorhanden, bei LN-428 dagegen kaum. Bei U87MG und D247MG lag die Plexin C1 mRNA-Expression unter der Nachweisgrenze.

Die als Ladekontrolle durchgeführte Amplifikation von GAPDH mRNA zeigte eine vergleichbare Expression in allen Zelllinien. Ebenso konnte durch die mitgeführte Wasserkontrolle eine unspezifische Amplifikation ausgeschlossen werden.

3.2 Expressionsanalyse von Semaphorin 7A und seinem Rezeptor Plexin C1 in der quantitativen PCR

3.2.1 Semaphorin 7A mRNA-Expression

Durch die quantitative real-time PCR konnte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SybrGreen, der nur mit doppelsträngiger DNA interkaliert, die Produktbildung in Echtzeit gemessen und dadurch die mRNA Expression von Semaphorin 7A in den 12 Gliomzelllinien quantitativ ermittelt werden. Die Semaphorin 7A Expression wurde dabei auf das ubiquitär exprimierte Referenzgen 18S normalisiert und relativ zur Expression der Gliomzelllinie D247 bestimmt, welche eine geringe Semaphorin 7A Expression gezeigt hatte (Abb. 6).

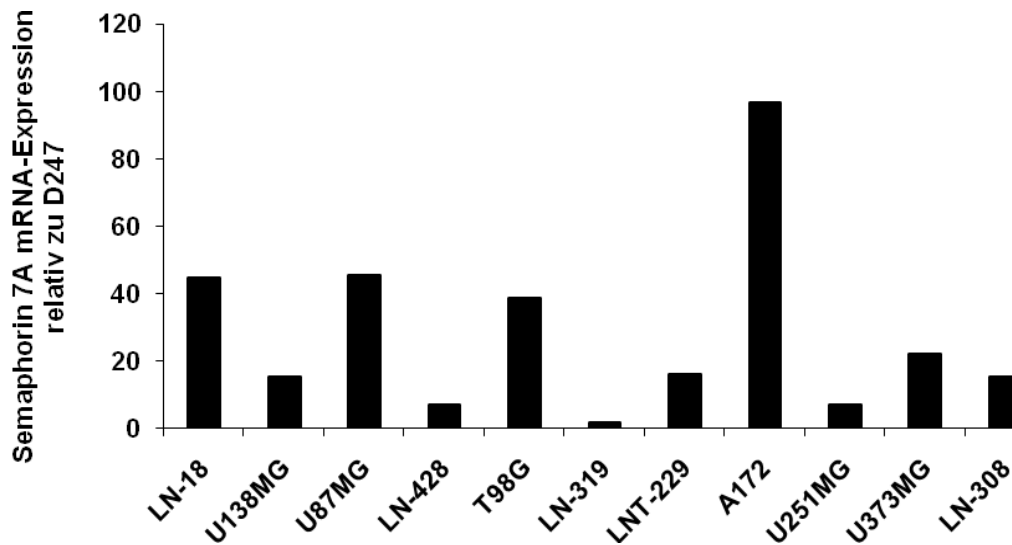


Abbildung 6 Maligne Gliomzellen exprimieren Semaphorin 7A *in vitro*. Die Semaphorin 7A Expression wurde mittels quantitativer PCR unter Verwendung von 18S-RNA als Referenzgen untersucht. Die quantitative Semaphorin 7A Expression wird relativ zur Semaphorin 7A RNA-Expression der Zelllinie D247 angegeben.

Die Gliomzelllinien LN-18, U87MG, T98G und A172 zeigten eine sehr hohe Semaphorin 7A mRNA-Expression, U138MG, LN-428, LNT-229, U251MG, U373MG und LN-308 eine mittlere und LN-319 eine niedrige Semaphorin 7A mRNA-Expression, verglichen mit der Semaphorin 7A mRNA-Expression in der Gliomzelllinie D247.

3.2.2 Plexin C1 mRNA-Expression

Auch die Plexin C1 mRNA-Expression wurde mittels quantitativer PCR untersucht. Hierbei wurde die Plexin C1 Expression ebenfalls auf das ubiquitär exprimierte Referenzgen 18S normalisiert und in Relation zur Plexin C1 Expression von Monozyten gesetzt (Abb. 7).

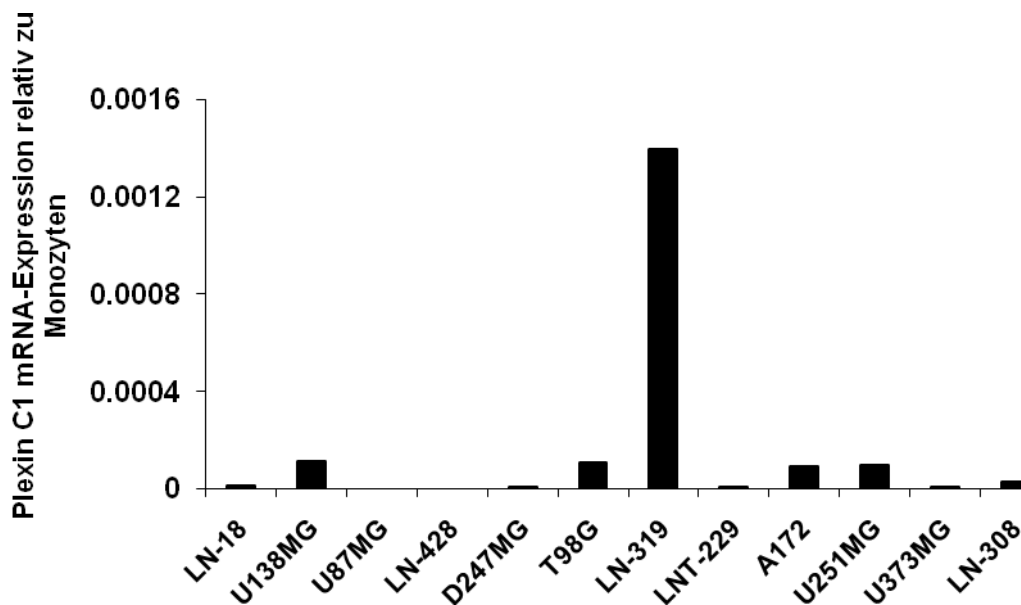


Abbildung 7 Maligne Gliomzellen exprimieren kaum Plexin C1 *in vitro*. Die Plexin C1 Expression wurde mittels quantitativer PCR unter Verwendung von 18S RNA als Referenzgen untersucht. Die quantitative Plexin C1 Expression wird relativ zur Plexin C1 RNA-Expression in Monozyten angegeben.

Hier zeigte sich im Gegensatz zur konventionellen PCR in allen Zelllinien eine geringe Plexin C1 mRNA-Expression verglichen mit der Expression in Monozyten.

3.3 Proteinexpression im Durchflusszytometer

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von Semaphorin 7A und seiner Rezeptoren Plexin C1 und $\alpha_1\beta_1$ -Integrin auf der Zelloberfläche maligner Gliomzellen bestimmt.

3.3.1 Semaphorin 7A Expression auf Proteinebene

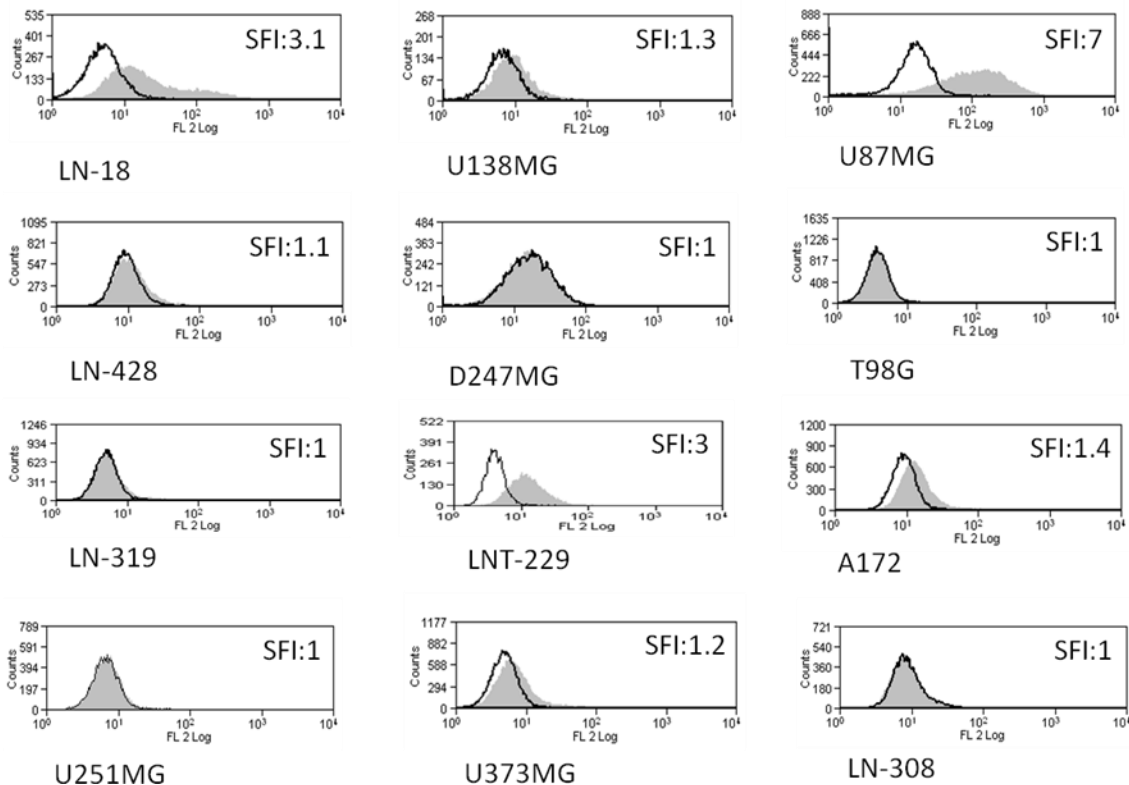


Abbildung 8 Die *in vitro* Proteinexpression von Semaphorin 7A auf der Zelloberfläche maligner Gliomzellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht und in Histogrammen dargestellt. Das schwarz umrandete, unausgefüllte Histogramm zeigt die unspezifische Bindung des Isotyp-Antikörpers an. Das grau ausgefüllte Histogramm zeigt die spezifische Bindung des Semaphorin 7A-Antikörpers. Die jeweiligen SFI Werte sind in den entsprechenden Darstellungen vermerkt.

Die Semaphorin 7A Proteinexpression (Abb. 8) zeigte ein sehr variables Bild, das nur teilweise mit der mRNA-Expression übereinstimmte. Obwohl sich in allen Zelllinien Semaphorin 7A mRNA nachweisen ließ (Abb. 5 und 6), zeigten nur die Zelllinien LN-18, U87MG und LNT-229 eine starke Proteinexpression im Durchflusszytometer. Die Zelllinien U138MG, A172 und U373 zeigten eine schwache, die übrigen Zelllinien keine Proteinexpression.

3.3.2 Plexin C1 Expression auf Proteinebene

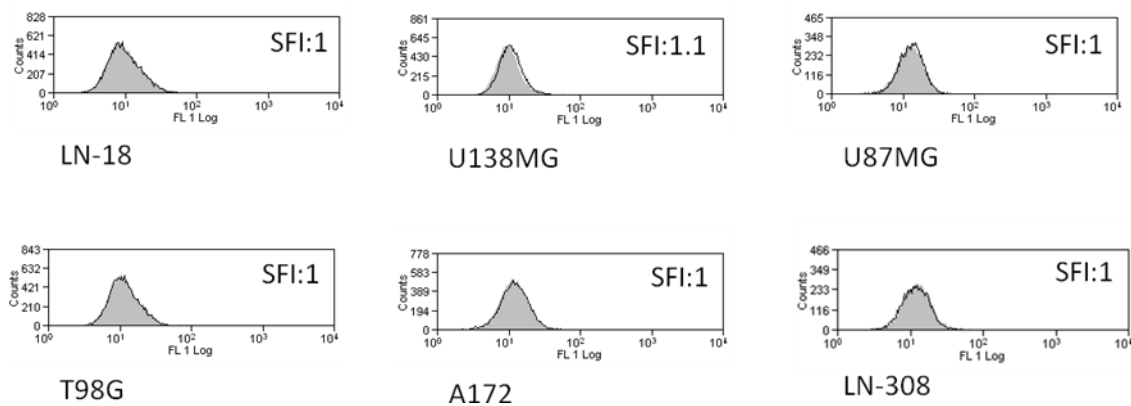


Abbildung 9 Maligne Gliomzellen exprimieren kein Plexin C1 auf ihrer Zelloberfläche. Die *in vitro* Proteinexpression von Plexin C1 auf der Zelloberfläche verschiedener Gliomzelllinien wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Das schwarz umrandete, unausgefüllte Histogramm zeigt die unspezifische Bindung des Isotyp-Antikörpers an. Das grau ausgefüllte Histogramm zeigt die spezifische Bindung des Semaphorin 7A Antikörpers. Die jeweiligen SFI Werte sind in den entsprechenden Darstellungen vermerkt.

Alle 12 untersuchten Gliomzelllinien zeigten keine Plexin C1 Expression auf ihrer Zelloberfläche, was exemplarisch in Abbildung 9 dargestellt wird. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den Daten aus der quantitativen PCR, bei welcher Plexin C1-mRNA (Abb. 7) nur in äußerst geringen Mengen nachgewiesen werden konnte.

3.3.3 α_1 -Integrin / β_1 -Integrin Expression auf Proteinebene

α_1 -Integrin:

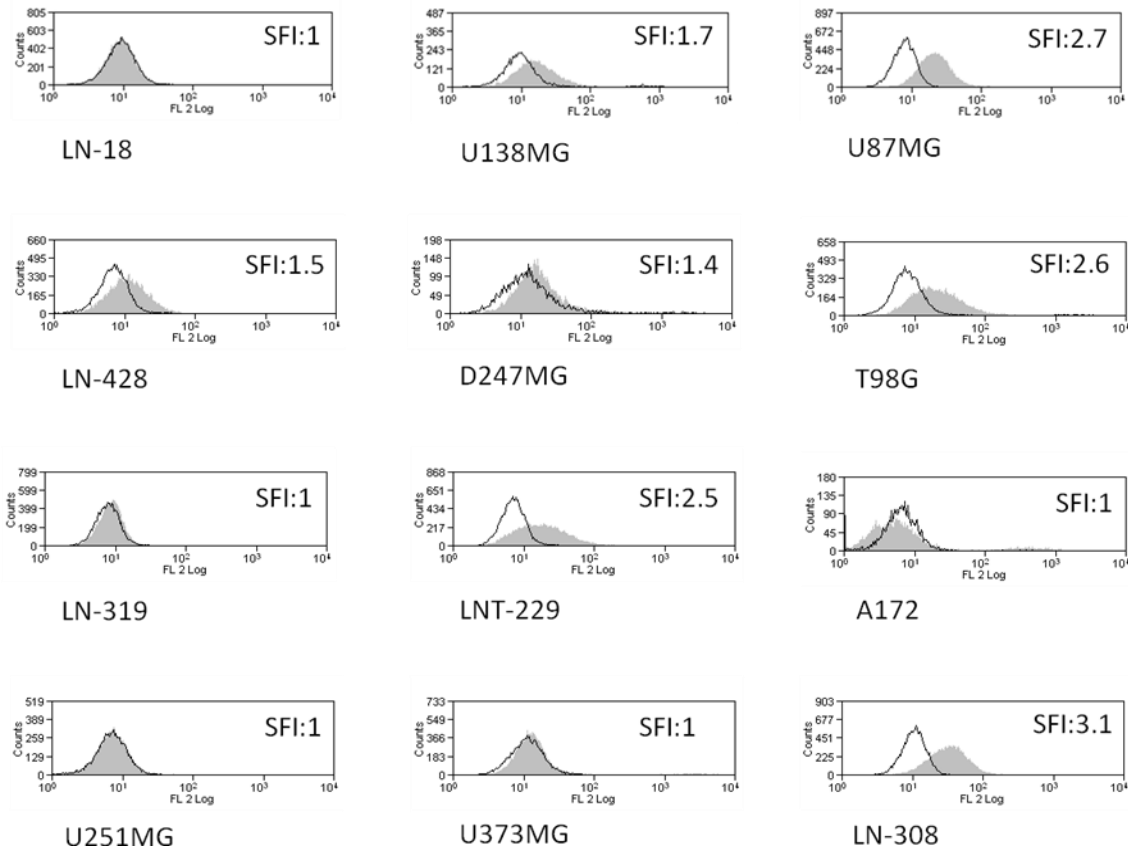


Abbildung 10 Die *in vitro* Proteinexpression von α_1 -Integrin auf der Zelloberfläche maligner Gliomzellen und wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht und in Histogrammen dargestellt. Das schwarz umrandete, unausgefüllte Histogramm zeigt die unspezifische Bindung des Isotyp-Antikörpers an. Das grau ausgefüllte Histogramm zeigt die spezifische Bindung des Semaphorin 7A Antikörpers. Die jeweiligen SFI Werte sind in den entsprechenden Darstellungen vermerkt.

β_1 -Integrin:

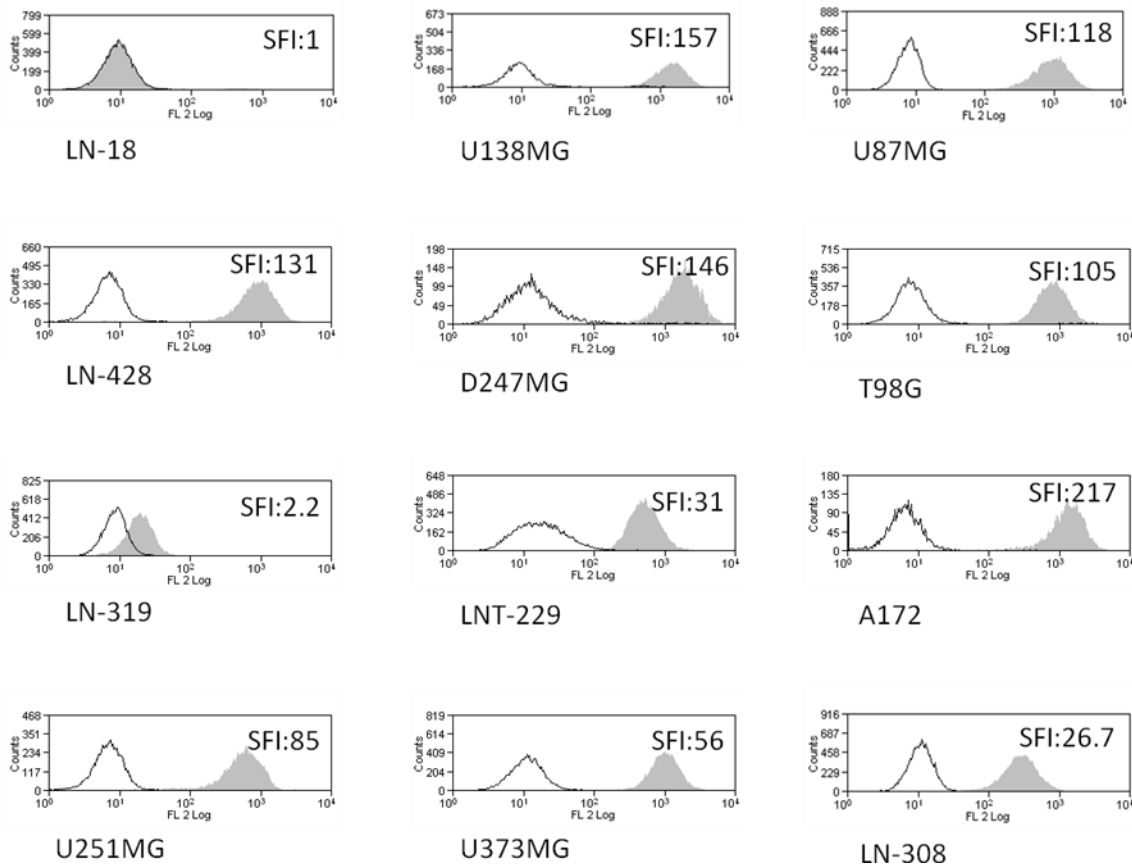


Abbildung 11 Die *in vitro* Proteinexpression von β_1 -Integrin auf der Zelloberfläche maligner Gliomzellen und wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht und in Histogrammen dargestellt. Das schwarz umrandete, unausgefüllte Histogramm zeigt die unspezifische Bindung des Isotyp-Antikörpers an. Das grau ausgefüllte Histogramm zeigt die spezifische Bindung des Semaphorin 7A Antikörpers. Die jeweiligen SFI Werte sind in den entsprechenden Darstellungen vermerkt.

Die Zelllinien U138MG, U87MG, LN-428, D247, T98G, LNT-229, und LN-308 zeigten eine positive α_1 -Integrin Expression im Durchflusszytometer, die restlichen Zelllinien zeigten keine Proteinexpression (Abb. 10). Dagegen wiesen alle Gliomzelllinien, bis auf LN-18, eine starke β_1 -Integrin-Expression auf der Zelloberfläche auf (Abb. 11).

3.4 Proteinexpression im Western Blot

Aufgrund fehlender Western Blot-tauglicher Antikörper, konnte zum Zeitpunkt der Erstellung der Dissertation keine Semaphorin 7A Western Blot Analysen durchgeführt werden. Eine Signaldetektion in Höhe der 60 kDa Bande in aufkonzentrierten Zellüberständen erwies sich als unspezifisch. Es wurden hierbei Western Blot Analysen von Zellüberständen von zuvor mit Semaphorin 7A siRNA und non-target siRNA behandelten Gliomzellen und wildtyp Gliomzellen miteinander verglichen. Der Erfolg des transienten Semaphorin 7A Gen-Knockdowns wurde zuvor im Durchflusszytometer überprüft und bestätigt. Im Western Blot zeigte sich sowohl in den mit siRNA behandelten, als auch in den Wildtypzellen ein eindeutiges Signal und kein Anhalt auf eine Suppression der Semaphorin 7A Expression, sodass von einer unspezifischen Antikörperbindung auszugehen ist und dieser für die Darstellung der Semaphorin 7A Proteinexpression im Western Blot nicht geeignet war.

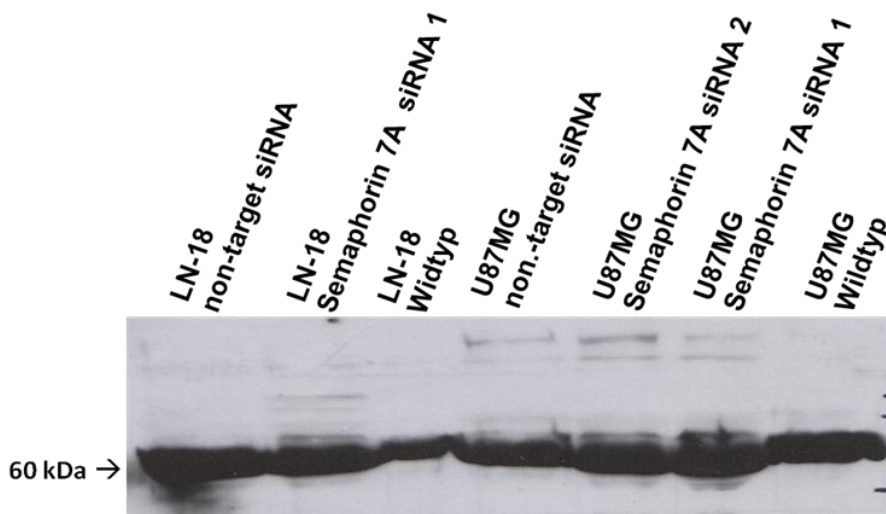


Abbildung 12 Nachweis unspezifischer Bindung des Semaphorin 7A Antikörpers. Western Blot Analysen mit aufkonzentrierten Überständen der Zelllinien LN-18 und U87MG, behandelt mit non-target siRNA, Semaphorin 7A spezifischer siRNA oder unbehandelt (wildtyp).

3.5 Posttranskriptionelles Gene Silencing mittels RNA-Interferenz

Um die funktionelle Bedeutung von Semaphorin 7A für die Tumorigenität und Immunogenität maligner Gliome näher untersuchen zu können, wurde ein Semaphorin 7A knock-down mittels RNA-Interferenz etabliert. Der Erfolg des transienten Genknockdowns wurde nach 48 h im Durchflusszytometer mittels eines Semaphorin 7A spezifischen Antikörpers überprüft. Um unspezifische Effekte der Semaphorin 7A siRNA ausschließen zu können, wurde bei jedem Experiment eine Negativkontrolle mitgeführt. Hierzu wurden die zu untersuchenden Zelllinien mit einer unspezifischen non-target siRNA transfiziert und unter identischen Bedingungen kultiviert.

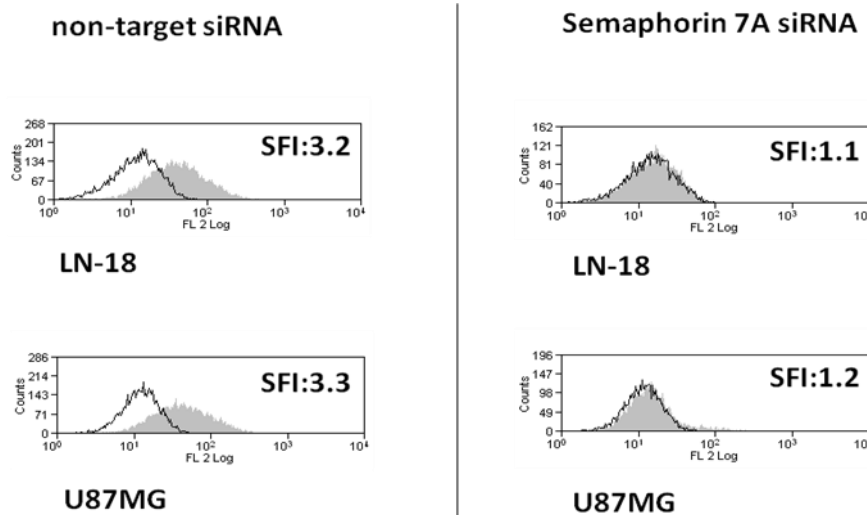


Abbildung 13 Posttranskriptionelles Semaphorin 7A-silencing mittels siRNA untersucht im Durchflusszytometer. Links: Semaphorin 7A Proteinexpression 48h nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (non-target). Rechts: Semaphorin 7A Proteinexpression 48h nach Transfektion mit Semaphorin 7A spezifischer siRNA. Das schwarz umrandete, unausgefüllte Histogramm zeigt die unspezifische Bindung des Isotyp-Antikörpers an. Das grau ausgefüllte Histogramm zeigt die spezifische Bindung des Semaphorin 7A Antikörpers. Die jeweiligen SFI Werte sind in den entsprechenden Darstellungen vermerkt.

Die Gliomzelllinien, welche mit non-target siRNA transfiziert wurden, weisen mit einem SFI von 3.2 für LN-18 bzw. 3.3 für U87MG eine eindeutige Semaphorin 7A Proteinexpression auf der Zelloberfläche auf. Nach Transfektion mit Semaphorin 7A siRNA zeigten sich deutlich niedrigere SFI Werte von 1.1 für LN-18 bzw. 1.2 für U87MG (Abb. 13).

3.6 Migration und Invasion

Da aufgrund der Eigenschaft von Semaphorin 7A als Membranprotein und seiner Interaktion mit $\alpha_1\beta_1$ -Integrin und Plexin C1 eine mögliche Beeinflussung der zellulären Motilität vermutet wird, wurde in den nächsten Experimenten das Migrations- und Invasionsverhalten in U87MG Wildtyp- und Semaphorin 7A-defizienten Zellen untersucht. Dazu wurden Migrations- und Invasionsassays mit einem modifizierten Boyden-Kammer-System in zweikammerigen Matrigel-Invasionskammern und Migrationskammern durchgeführt. Es wurde die Zelllinie U87MG untersucht, da diese auch in den vorhergehenden Experimenten sowohl auf mRNA-Ebene (Abb. 5 und 6), als auch auf Proteinebene (Abb. 8) eine starke Semaphorin 7A Expression gezeigt hatte. Als Kontrolle dienten U87MG Zellen, welche mit unspezifischer non-target siRNA transfiziert worden waren. Der transiente Semaphorin 7A Knockdown wurde bei jedem Migrations- und Invasionsversuch im Durchflusszytometer überprüft.

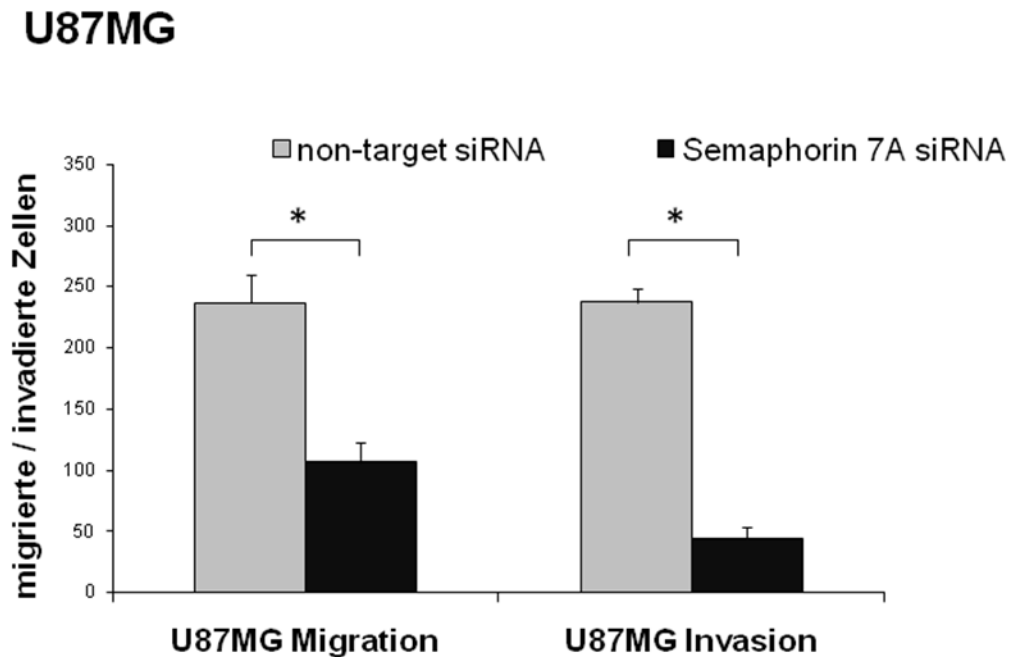


Abbildung 14 Eingeschränkte Migration und Invasion von Semaphorin 7A-defizienten U87MG Gliomzellen. Migration und Invasion von U87MG unter transientem Semaphorin 7A Knockdown mittels spezifischer Semaphorin 7A siRNA vs. U87MG Kontrollzellen behandelt mit non target siRNA. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte angegeben \pm Standardabweichung des Mittelwerts und repräsentieren 3 unabhängige Experimente (* $p \leq 0.01$; Students t-Test).

In den Migrations- und Invasionsversuchen konnte für die Gliomzelllinie U87MG (Abb. 14) gezeigt werden, dass eine verminderte Semaphorin 7A Expression auf der Zelloberfläche mit einer eingeschränkten Migration und Invasion der Zellen einhergeht.

3.7 Chromfreisetzungsversuch

Um herauszufinden, welche Bedeutung die Semaphorin 7A Expression für die Immunogenität von Gliomen haben könnte, wurde die NK-Zell-Zytotoxizität in einem 4-stündigen ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuch bestimmt. Als Effektorzellen dienten polyklonale NK-Zellen von gesunden Spendern. Die Gliomzelllinien LNT-229, U87MG und LN-18 dienten als Targetzellen und wurden zuvor mit non-target siRNA oder spezifischer Semaphorin 7A siRNA behandelt und anschließend mit ⁵¹Chrom markiert.

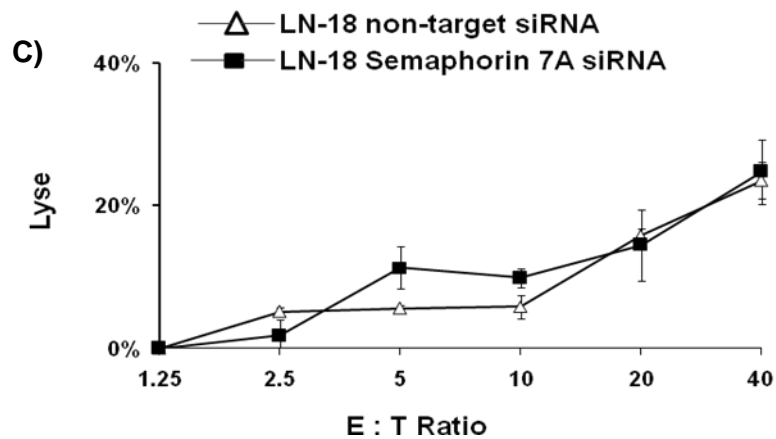
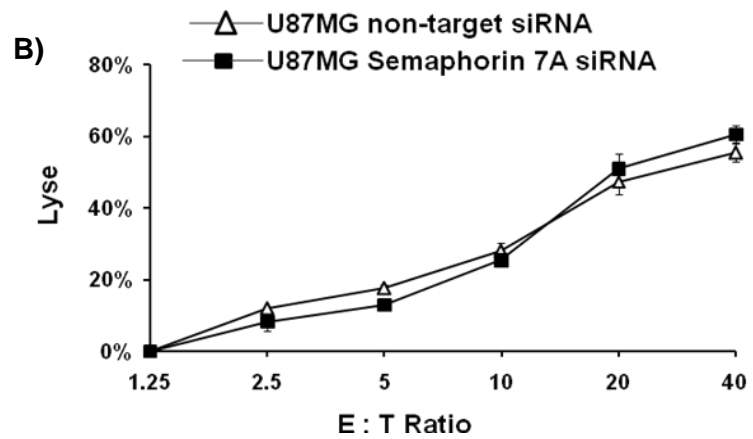
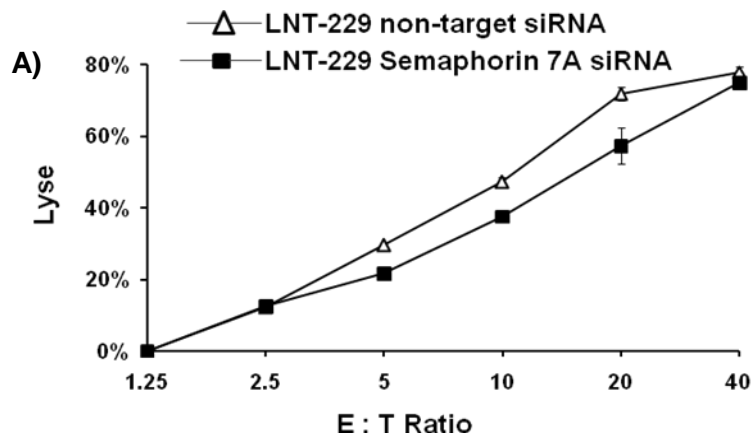


Abbildung 15 Semaphorin 7A hat keinen Einfluss auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen *in vitro*. A) LNT-229, B) U87MG und C) LN-18 Gliomzellen behandelt mit non-target siRNA oder spezifischer Semaphorin 7A siRNA wurden als Targetzellen eingesetzt. Die Diagramme zeigen die Ergebnisse des jeweiligen ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuchs, mit dem Ausmaß der Lyse in [%] auf der y-Achse und der Effektorzellen : Targetzellen Ratio auf der x-Achse.

Die Semaphorin 7A Expression auf den untersuchten Gliomzelllinien hatte keinen Einfluss auf ihre Suszeptibilität gegenüber NK-Zellen (Abb. 15, A-C). Die prozentuale Lyse der Semaphorin 7A knockdown-Zellen unterschied sich nicht signifikant von der prozentualen Lyse der Kontrollzellen, welche mit non-target siRNA behandelt worden waren.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob Gliomzellen Semaphorin 7A und seine Rezeptoren Plexin C1, α_1 -Integrin und β_1 -Integrin exprimieren. Dafür wurden konventionelle und quantitative PCR-Analysen durchgeführt, um die Semaphorin 7A und Plexin C1 Expression auf mRNA Ebene zu untersuchen. Des Weiteren wurde die Semaphorin 7A Expression und die Expression seiner Rezeptoren auf Proteinebene bestimmt, indem Analysen im Durchflusszytometer und im Western Blot durchgeführt wurden. Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob die Semaphorin 7A Expression die Migration, Invasion und Immunogenität der Gliomzellen beeinflusst.

4.1 mRNA-Expression in der konventionellen und quantitativen PCR

In den konventionellen PCR Analysen konnte in allen 12 untersuchten Gliomzelllinien eine Semaphorin 7A Expression *in vitro* gezeigt werden (Abb. 5). Durch die Verwendung eines Semaphorin 7A-Plasmids als Positivkontrolle konnte die Spezifität der verwendeten Primer bestätigt werden. Die Verwendung von H₂O als Negativkontrolle diente zum Ausschluss einer Kontamination der verwendeten Proben. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass Gliomzellen Semaphorin 7A exprimieren. Eine Beziehung zwischen Gliomen und Semaphorinen wurde bisher nur für Semaphorine der Gruppe 3 und Semaphorin 6B gezeigt (Correa et al., 2001; Rieger et al., 2003; Nasarre et al., 2010).

Der Plexin C1 mRNA-Nachweis zeigte in der konventionellen PCR ein heterogenes Bild. Hier konnte bei 9 der 12 untersuchten Gliomzelllinien ein Plexin C1-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 5). Da Plexin C1 von Monozyten exprimiert wird (Comeau et al., 1998), diente cDNA von Monozyten als Positivkontrolle. Dass Plexin C1 von Gliomzellen exprimiert wird, wurde erstmals im Zusammenhang mit der Expression von Galectin-1 und brain

expressed x-linked gene 2 (BEX2) berichtet. Galectin-1 und BEX2 sollen einen fördernden Einfluss auf die Chemoresistenz, Neoangiogenese und Migration von Oligodendrogliomzellen haben. Das Herabsetzen der BEX2 Expression führte zu einer vermehrten Plexin C1 Expression, welche mittels PCR und Western Blot untersucht worden war (Le Mercier et al., 2009). Durch die Interaktion von Plexin C1 und Semaphorin 7A wurde eine verminderte Dendritenausbildung bei Melanozyten beobachtet (Sott et al., 2008). Ebenso wurde Plexin C1 die Funktion eines Tumorsuppressors zugeschrieben, da die Plexin C1 Expression bei metastasierten malignen Melanomen verloren geht (Lazova et al., 2009; Scott et al., 2009). Diese Beobachtungen könnten darauf hinweisen, dass Plexin C1 die Bewegungsfähigkeit von Zellen kontrolliert und eine verminderte Plexin C1 Expression mit der Tumorigenese oder Tumورprogression von Malignomen einhergeht.

Für den quantitativen mRNA-Nachweis wurden real-time PCR-Analysen durchgeführt. Hierbei wurde die Genexpression des Zielgens mit der Genexpression eines ubiquitär vorkommenden, nicht regulierten Referenzgens normalisiert.

Die quantitative PCR mit Semaphorin 7A als Zielgen, 18S als Referenzgen ergab eine bis hundertfach erhöhte Semaphorin 7A Expression relativ zur Semaphorin 7A Expression der Gliomzelllinie D247, welche in allen Versuche gering ausgefallen ist (Abb. 6).

Es wurde ebenso eine quantitative PCR mit Plexin C1 als Zielgen, 18S als Referenzgen und Monozyten cDNA als Kontrolle durchgeführt. Im Gegensatz zur konventionellen PCR, in der eine Plexin C1 mRNA-Expression in allen 12 getesteten Zelllinien nachgewiesen werden konnte (Abb. 5), zeigte die quantitative PCR eine sehr geringe bis keine mRNA-Expression (Abb. 7). Im Vergleich zur Plexin C1 mRNA-Expression der Monozyten lag die Plexin C1 mRNA-Expression der 12 getesteten Gliomzelllinien um mehrere Zehnerpotenzen niedriger (10^{-3} bis 10^{-6} -fach). Bei den Zelllinien U87MG und LN-428 lag die Plexin C1 mRNA-Expression in der quantitativen PCR unter der Nachweisgrenze.

Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen der Plexin C1 mRNA-Expression in der konventionellen PCR und der quantitativen PCR wäre, dass die konventionelle PCR einen rein qualitativen mRNA Nachweis liefert und schon geringste Mengen an Template cDNA für einen Nachweis genügen. Dagegen kann man bei der quantitativen PCR aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt auf die Menge an eingesetzter cDNA-Template schließen.

Ein Schwachpunkt der relativen Quantifizierung mittels der $\Delta\Delta$ -CT Methode ist, dass von einer Verdoppelung der DNA-Menge in jedem PCR-Zyklus ausgegangen wird. Dies würde einer optimalen PCR-Effizienz von 2,0 in jeder Probe entsprechen. Die tatsächliche Effizienz liegt aber wahrscheinlich zwischen 1,5 und 2 und geringe Schwankungen der Effizienz zwischen Zielgen und Referenzgen könnten zu erheblichen Unterschieden in den Expressionsdaten führen.

4.2 Proteinexpression im Durchflusszytometer

Die Proteinexpression von Semaphorin 7A und seiner Rezeptoren Plexin C1, α_1 -Integrin und β_1 -Integrin wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Wie in Abbildung 8 für die Semaphorin 7A Proteinexpression auf der Zelloberfläche dargestellt, zeigten die Zelllinien LN-18, U138MG, U87MG, LNT-229, A172 und U373MG einen SFI ≥ 1.2 . Dieses Ergebnis deckt sich nur teilweise mit den Ergebnissen der konventionellen und quantitativen PCR, in welcher alle getesteten Gliomzelllinien eine im Vergleich zur geringen Expression der Gliomzelllinie D247 erhöhte Semaphorin 7A Expression auf mRNA-Ebene gezeigt hatten. Zu bedenken ist, dass die konventionelle PCR primär der qualitativen Detektion des entsprechenden mRNA-Transkript dient und die quantitative PCR nur einen Expressionsunterschied zum endogenen Referenzgen und relativ zur Expression der entsprechenden mRNA von D247 Gliomzellen angibt.

Die Proteinexpression von Plexin C1 wurde ebenfalls im Durchflusszytometer bestimmt. Abbildung 9 zeigt exemplarisch, dass keine Plexin C1 Proteinexpression auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der quantitativen PCR (Abb. 7),

welche zeigte, dass Plexin C1 mRNA im Vergleich zur Plexin C1 mRNA in Monozyten nur in äußerst geringen Mengen detektiert werden konnte. Allerdings war es nicht möglich, eine geeignete Positivkontrolle für die Plexin C1 Proteinexpression im Durchflusszytometer herzustellen, was die Spezifität des verwendeten Antikörpers in Frage stellen könnte. Die konventionelle PCR (Abb. 5) zeigte eine deutliche Plexin C1 mRNA Expression in den Zelllinien LN-18, U138MG, T98G, LN-319, LNT-229, A172, U251MG, U373MG und LN-308. Bei U87MG und D247 lag die Plexin C1 mRNA-Expression unter der Detektionsgrenze. Wie schon beschrieben, kann die konventionelle PCR nur als qualitativer Nachweis einer mRNA-Expression dienen und ein mRNA Nachweis bedeutet nicht gleichzeitig, dass auch eine Expression auf Proteinebene bzw. auf der Zelloberfläche stattfindet. Eine Plexin C1 Expression auf Proteinebene konnte für Gliomzellen bisher nur mittels Western Blot nachgewiesen werden (Le Mercier et al., 2009),

Die Proteinexpression von α_1 -Integrin und β_1 -Integrin, welche als Heterodimer $\alpha_1\beta_1$ -Integrin auch unter very late antigen (VLA)-1 bekannt sind, wurde auch mittels Durchflusszytometrie untersucht. Ein Antikörper, welcher nur das humane Heterodimer $\alpha_1\beta_1$ -Integrin erkennt, war zum Zeitpunkt der Experimente nicht verfügbar. $\alpha_1\beta_1$ -Integrin wird auf mesenchymalen Vorläuferzellen des Knochenmarks und auf verschiedensten ausdifferenzierten mesenchymalen Zellen exprimiert (Ben-Horin et al., 2004). Im Immunsystem wird $\alpha_1\beta_1$ -Integrin auf aktivierten T-Zellen, NK-Zellen, NK-T-Zellen und Makrophagen (Hemler et al., 1995; Dietl et al., 1992; Pérez-Villar et al., 1996; Rubio et al., 1995) exprimiert. Zudem soll $\alpha_1\beta_1$ -Integrin Expression die (Tumor-)Angiogenese fördern (Senger et al., 1997; Senger et al., 2002; Pozzi et al., 2000; Hynes, 2002). Gliome weisen eine Überexpression der β_1 -Untereinheit der Integrin Rezeptoren auf und der Einsatz von blockierenden Antikörpern führt zur Inhibition der *in vitro* Adhäsion, Motilität und Invasion von Gliomzellen (Paulus et al., 1996; Rooprai et al., 1999; Delamarre et al., 2009). Eine Expression der α_1 -Untereinheit von Integrin Rezeptoren oder eine Expression des Heterodimers $\alpha_1\beta_1$ -Integrin wurde für Gliomzellen bisher nicht beschrieben. In den untersuchten Gliomzelllinien konnte mittels Durchflusszytometer auf

U138MG, U87MG, LN-428, D247MG, T98G, LNT-229 und LN-308 eine Proteinexpression von α_1 -Integrin auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abb. 10). Bis auf die LN-18 Zellen zeigten alle untersuchten Gliomzelllinien eine starke β_1 -Integrin Proteinexpression (Abb. 11). $\alpha_1\beta_1$ -Integrin interagiert nicht nur mit Semaphorin 7A (Suzuki et al.; 2007), sondern unter anderem auch mit Kollagen IV (Briesewitz et al., 1993), Kollagen XIII (Nykqvist et al., 2000) und Galectin-1 (Moiseeva et al., 1999; Moiseeva et al., 2003) und bestimmt dadurch seine Bedeutung für Zellmotilität, Zelladhäsion und immunologische Entzündungsprozesse (Ben-Horin et al., 2004). Die Bedeutung von $\alpha_1\beta_1$ -Integrin für Gliomzellen bleibt noch unklar.

4.3 Posttranskriptionelles Gene-Silencing mittels RNA-Interferenz

Für funktionelle Experimente wurden die Gliomzelllinien LN-18 und U87MG, welche in den vorherigen Versuchen die höchste Semaphorin 7A Expression auf mRNA- und Proteinebene gezeigt hatten, mittels spezifischer Semaphorin 7A siRNA und unspezifischer non-target siRNA als Negativkontrolle transfiziert. Der Erfolg der transienten Suppression der Proteinexpression (knock-down) wurde im Durchflusszytometer überprüft. Sowohl die spezifische Semaphorin 7A siRNA, als auch die unspezifische non-target siRNA wurden in einer Konzentration von 100 nm eingesetzt. Durch die Anwendung von strikten Transfektionsprotokollen wurde eine optimale Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht, sodass stets eine zuverlässige Transfektionseffizienz und Suppression der Semaphorin 7A Proteinexpression im Durchflusszytometer (Abb. 13) erzielt wurde.

4.4 Migration und Invasion

Die schlechte Prognose von Gliomen begründet sich unter anderem damit, dass Gliomzellen die Fähigkeit besitzen, aktiv in das sie umgebende gesunde Gewebe zu migrieren und dieses diffus zu infiltrieren. Eine komplette Resektion ist daher nicht möglich und es kommt immer zu einem Rezidiv (Claes et al., 2007; Giese et al., 2003)

In den in dieser Arbeit durchgeführten Boyden-Kammer Migrations- und Invasionsversuchen wurde gezeigt, dass eine Suppression der Semaphorin 7A Proteinexpression die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Gliomzelllinie U87MG signifikant herabsetzt (Abb. 14). Es zeigen sich Parallelen zu den Ergebnissen der Arbeit von Pasterkamp et al. (2003b). Hier wurde durch die Interaktion von Semaphorin 7A mit β_1 -Integrin die intrazelluläre Proteinkinase FAK und weitere Tyrosinkinasen wie die Mitogen-activated protein kinase (MAPK) und ERK 1 und 2 aktiviert und somit das Wachstum von Axonen gefördert. FAK ist eine Rezeptor-unabhängige Proteintyrosinkinase, welcher eine wichtige Bedeutung für die Zellmigration und Zellinvasion zugeschrieben wird (Hauck et al., 2002). Glioblastome und anaplastische Astrozytome weisen eine Überexpression von FAK auf und der Phosphorylierungsgrad von FAK (aktivierte FAK) korreliert mit der Invasivität verschiedener Tumorarten (Obarra et al., 2002; Zagzag et al., 2000; Natarajan et al., 2003). Zudem soll die (Über-)Expression von FAK in Gliomen mit einem reduzierten Gesamtüberleben in Zusammenhang stehen (Ding et al., 2010).

Durch die Reduktion der Semaphorin 7A Expression ist es also möglich, dass es zu einer Reduktion der FAK Aktivität gekommen ist und in Folge dessen Signalkaskaden für Migrations- und Invasionsprozesse unterbunden worden sind. Detaillierte Untersuchungen dieser Signalkaskaden wurden im Rahmen dieser Dissertation nicht durchgeführt. Semaphorin 7A und seine Rezeptoren besitzen auch für andere Zellarten eine wichtige Bedeutung für die Zellausbreitung und Zellmotilität. Beispielsweise wird durch die Expression von Semaphorin 7A auf menschlichen Melanozyten und dessen Interaktion mit β_1 -Integrin die Zellausbreitung und die Ausbildung von Dendriten initiiert. Im Gegensatz dazu scheint die Interaktion von Semaphorin 7A mit Plexin C1 zu

einer verminderten Zellausbreitung und Dendritenausbildung der Melanozyten zu führen (Scott et al., 2008). Auch das Wachstum und die regelhafte Formation von Axonen des peripheren und zentralen Nervensystems während der embryonalen Entwicklung wird durch Semaphorin 7A gefördert (Pasterkamp et al., 2003a; 2003b).

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass Semaphorin 7A bei diversen Prozessen, welche die Migration und Invasion von Zellen betreffen, eine wichtige Rolle spielt und eine verminderte Semaphorin 7A Expression oder die Blockierung der Semaphorin 7A-abhängigen Signalkaskade zu einer verminderten Zellmotilität führt.

4.5 Chromfreisetzungsvoruch

NK-Zellen sind zytotoxische Effektorzellen des angeborenen Immunsystems (Trapanai und Smyth, 2002) und haben die Fähigkeit, maligne körpereigene, wie auch körperfremde Zellen und virusinfizierte Zellen als Zielzellen zu erkennen und zu lysieren (Trinchieri et al., 1989; Medzhitov und Janeway, 2002). Zudem hat eine 11 Jahre dauernde epidemiologische Verlaufsuntersuchung gezeigt, dass ein Mangel an NK-Zellen bzw. NK-Zell-Aktivität mit einem erhöhten Krebsrisiko verbunden ist (Imai et al., 2000).

Glioblastome können mittels verschiedener Strategien einer Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem entgehen. Beispielsweise wird durch die Freisetzung des immunsuppressiven Zytokins TGF- β die Aktivierung von Bestandteilen der angeborenen Immunität, als auch der erworbenen Immunität zur Tumorbekämpfung supprimiert (Weller und Fontana, 1995; Gorelik et al., 2002). Beispielsweise bewirkt TGF- β bei der Bekämpfung von Gliomzellen durch NK-Zellen eine Funktionseinschränkung, indem die Expression des aktivierenden Rezeptors NKG2D (NK group 2, member D) auf NK-Zellen herunter reguliert wird (Friese et al., 2004; Crane et al., 2010) und auch die Expression seiner Liganden MHC Class I-chain related molecule A (MICA) und UL-16-binding protein 2 (ULBP2) auf Gliomzellen verringert wird (Eisele et al., 2006)

Die Expression von Semaphorin 7A und seiner Rezeptoren α_1 -Integrin und β_1 -Integrin wird durch TGF- β induziert (Kang et al., 2007) und es existieren widersprüchliche Berichte bezüglich Semaphorin 7A und seiner Funktion in der T-Zell-vermittelten Immunantwort (Suzuki et al., 2007; Czopik et al., 2006). NK-Zellen exprimieren nach Aktivierung mit Interleukin-2 die Semaphorin 7A Rezeptoren α_1 -Integrin und β_1 -Integrin auf ihrer Zelloberfläche (Pérez-Villar et al., 1996). Aus diesen Gründen und den oben erwähnten Mechanismen der Umgehung der angeborenen Immunität wurde die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegen Gliomzellen in Abhängigkeit ihrer Semaphorin 7A Expression mittels eines Chromfreisetzungsversuches untersucht. Als Targetzellen dienten hierfür die Gliomzelllinien LNT-229, U87MG und LN-18, welche mit Semaphorin 7A spezifischer siRNA transfiziert wurden. Die Negativkontrollen wurden mit unspezifischer non-target siRNA transfiziert. Polyklonale NK-Zellen von gesunden Spendern dienten als Effektorzellen.

Wie die Abbildung 15 A-C zeigt, hatte die Semaphorin 7A Expression auf den Gliomzellen LNT-229, U87MG und LN-18 keinen Einfluss auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen in einem 4-stündigen *in vitro* Lyseassay. Zusammenfassend scheint Semaphorin zumindest unter den hier gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die NK-Zellaktivität gegenüber Gliomzellen zu haben.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Semaphorin 7A ist ein Oberflächenprotein, das bei der Entwicklung des ZNS eine wichtige Rolle einnimmt, indem es die Ausbildung und Wegfindung von Axonen lenkt und die Migration von Neuronen steuert (Pasterkamp et al. 2003a; 2003b; 2007). Bei Regenerationsprozessen und Glianarbenbildung nach spinalen Verletzungen kommt es zur Einwanderung von aktivierten Astrozyten, welche sich durch eine vermehrte Semaphorin 7A Expression auszeichnen. Somit ist Semaphorin 7A auch bei pathophysiologischen Prozessen des adulten ZNS beteiligt (Kopp et al. 2010).

Auch bei der Interaktion zwischen Nervensystem und Immunsystem scheint Semaphorin 7A eine wichtige Funktion zu haben. Diese Bedeutung von Semaphorin 7A bleibt bis heute noch nicht abschließend geklärt (Suzuki et al. 2007; Czopik et al. 2006).

Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob Gliomzellen Semaphorin 7A exprimieren und welche Bedeutung dieses Oberflächenprotein für die Tumorigenität und Immunogenität von malignen Gliomen besitzt.

Die Expression von Semaphorin 7A und seiner Rezeptoren Plexin C1, α_1 -Integrin und β_1 -Integrin auf Gliomzellen wurde auf mRNA- und Proteinebene mittels konventioneller PCR, quantitativer PCR, Western Blot und Durchflusszytometrie untersucht. Auf funktioneller Ebene wurde mittels Boyden-Kammern die Migrations- und Invasionsfähigkeit und mittels Chromfreisetzungsversuchen die Immunogenität von Gliomzellen als Targetzellen für die Zytotoxizität von NK-Zellen untersucht. Hierfür wurde durch die Transfektion der Gliomzellen mit Semaphorin 7A-spezifischer siRNA die Semaphorin 7A Expression transient supprimiert. Es zeigte sich, dass alle 12 getesteten Gliomzelllinien Semaphorin 7A auf mRNA Ebene exprimieren (Abb. 5 und 6). Die mRNA-Expression des Rezeptors Plexin C1 konnte in der konventionellen PCR ebenso in fast allen Gliomzelllinien nachgewiesen werden (Abb. 5). Dagegen war die quantitative Plexin C1 mRNA-Expression im Vergleich zur physiologischen Plexin C1 mRNA-Expression in Monozyten äußerst gering (Abb. 7). Mittels Western Blot wurde auf Proteinebene keine

Semaphorin 7A Expression festgestellt. In weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass der verwendete Antikörper unspezifisch bindet und zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit existierten keine geeigneten Antikörper für Western Blot-Untersuchungen. Im Durchflusszytometer zeigten die Zelllinien LN-18, LNT-229 und U87MG die höchste Semaphorin 7A Proteinexpression. Hier wurde auch auf fast allen untersuchten Gliomzelllinien eine Proteinexpression des Semaphorin 7A Rezeptors α_1 Integrin und β_1 - Integrin, aber keine Plexin C1 Proteinexpression nachgewiesen.

Auf funktioneller Ebene konnte gezeigt werden, dass die Migrations- und Invasionsfähigkeit von U87MG Gliomzellen durch eine Suppression der Semaphorin 7A Proteinexpression mittels siRNAs herabgesetzt wird. Diese Zelllinie migrierte und invadierte nach Herunterregulation der Semaphorin 7A Expression schlechter als die Kontrolltransfektanten. Glioblastome zeichnen sich u.a. durch eine diffuse Einwanderung und Infiltration in das umliegende, gesunde Hirngewebe aus, wodurch eine kurative Behandlung durch Resektion unmöglich ist. Eine vermehrte Semaphorin 7A Expression könnte eine Ursache des Migrations- und Invasionsverhalten von Gliomzellen sein. In den NK-Zellyseassays hatte die Semaphorin 7A Expression auf Gliomzellen keinen Einfluss auf die Zytotoxizität von NK-Zellen. Daher scheint Semaphorin 7A die Erkennung von Gliomzellen als Targetzellen und die Aktivierung der NK-Zellen als zytotoxische Effektorzellen in diesem Paradigma nicht zu beeinflussen. Hier könnten folgende Arbeiten zum Zusammenhang zwischen Semaphorin 7A Expression und der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen weitere Erkenntnisse über eine mögliche Beeinflussung der Tumorummunologie maligner Gliome durch Semaphorin 7A ermöglichen. Aufgrund dieser Arbeit ist anzunehmen, dass sich durch die Antagonisierung von Semaphorin 7A die Migration und Invasion maligner Gliome hemmen lässt, was Gegenstand zukünftiger Studien sein sollte.

6 Abbildungen und Tabellen

Abb. 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Semaphorinklassen

Abb. 2: Schematische Darstellung des Mechanismus der RNA-Interferenz

Abb. 3: Schematische Darstellung einer Invasions- / Migrationskammer

Abb. 4: Schematische Darstellung des Dichte Gradienten im Falcon Tube

Abb. 5: Semaphorin 7A und Plexin C1 *in vitro* mRNA-Expression in der konventionellen PCR

Abb. 6: Semaphorin 7A *in vitro* mRNA-Expression in der quantitativen PCR

Abb. 7: Plexin C1 *in vitro* mRNA-Expression in der quantitativen PCR

Abb. 8: Semaphorin 7A *in vitro* Proteinexpression im Durchflusszytometer

Abb. 9: Plexin C1 *in vitro* Proteinexpression im Durchflusszytometer

Abb. 10: α_1 - Integrin *in vitro* Proteinexpression im Durchflusszytometer

Abb. 11: β_1 - Integrin *in vitro* Proteinexpression im Durchflusszytometer

Abb. 12: Nachweis der unspezifischen Bindung des Semaphorin 7A Antikörpers

Abb. 13: Posttranskriptionelles Semaphorin 7A-silencing mittels RNA-Interferenz

Abb. 14: Migration und Invasion von Semaphorin 7A defizienten U87MG Gliomzellen

Abb. 15 A-C: Chromfreisetzungsversuch mit LN-18, U87MG und LNT-229 Gliomzellen

Tab. 1: Verwendete Antikörper im Durchflusszytometer

Tab. 2: Verwendete Antikörper im Western Blot

Tab. 3: Verwendete Primer in der quantitativen PCR

Tab. 4: Verwendete Primer in der konventionellen PCR

Tab. 5: Verwendete siRNAs

7 Literaturliste

1. Albesiano E, Han JE, Lim M. Mechanisms of local immunoresistance in glioma. *Neurosurg Clin N Am* 2010; 21:17–29.
2. Angelisová P, Drbal K, Cerný J, Hilgert I, Horejsí V. Characterization of the human leukocyte GPI-anchored glycoprotein CDw108 and its relation to other similar molecules. *Immunobiology*. 1999;200:234–245.
3. Artigiani S, Conrotto P, Fazzari P, Gilestro GF, Barberis D, Giordano S, Comoglio PM, Tamagnone L. Plexin-B3 is a functional receptor for semaphorin 5A. *EMBO Rep* 2004;5:710–714.
4. Basile JR, Holmbeck K, Bugge TH, Gutkind JS. MT1-MMP controls tumor-induced angiogenesis through the release of semaphorin 4D. *J Biol Chem* 2007;282:6899–6905.
5. Behlke MA. Chemical modification of siRNAs for in vivo use. *Oligonucleotides* 2008;18:305–319.
6. Bellone G, Turletti A, Artusio E, Mareschi K, Carbone A, Tibaudi D, Robecchi A, Emanuelli G, Rodeck U. Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients. *Am J Pathol* 1999;155:537–547.
7. Ben-Horin S, Bank I. The role of very late antigen-1 in immune-mediated inflammation. *Clin Immunol* 2004;113:119-129.
8. Bork P, Doerks T, Springer TA, Snel B. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci* 1999;24:261–263.
9. Briesewitz R, Epstein MR, Marcantonio EE. Expression of native and truncated forms of the human integrin alpha 1 subunit. *J Biol Chem* 1993;268:2989-29896.
10. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 2009;457:426–433.
11. Catalano A, Caprari P, Moretti S, Faronato M, Tamagnone L, Procopio A. Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. *Blood* 2006;107:3321–3329.
12. CBTRUS (2011) Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 2004-2007. Published by the Central Brain Tumor Registry of the United States.
13. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, Salazer O, Perez-Tamayo R, Kramer S, Weinstein A, Nelson JS, Tsukada Y. Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. A joint Radiation Therapy Oncology Group and Eastern Cooperative Oncology Group study. *Cancer* 1983;52:997–1007.
14. Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol*. 2007;114:443–458.
15. Clarke J, Butowski N, Chang S. Recent advances in therapy for glioblastoma. *Arch Neurol* 2010;67:279–83.
16. Clarke JL, Iwamoto FM, Sul J, Panageas K, Lassman AB, DeAngelis LM, Hormigo A, Nolan CP, Gavrilovic I, Karimi S, Abrey LE. Randomized phase II trial of chemoradiotherapy followed by either dose-dense or metronomic temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009;27:3861–3867.
17. Comeau MR, Johnson R, DuBose RF, Petersen M, Gearing P, VandenBos T, Park L, Farrar T, Buller RM, Cohen JI, Strockbine LD, Rauch C, Spriggs MK. A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity* 1998;8:473–482.

18. Comoglio PM, Boccaccio C, Trusolino L. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:565–571.
19. Correa RG, Sasahara RM, Bengtson MH, Katayama ML, Salim AC, Brentani MM, Sogayar MC, de Souza SJ, Simpson AJ. Human semaphorin 6B [(HSA)SEMA6B], a novel human class 6 semaphorin gene: alternative splicing and all-trans-retinoic acid-dependent downregulation in glioblastoma cell lines. *Genomics* 2001;73:343–348.
20. Crane CA, Han SJ, Barry JJ, Ahn BJ, Lanier LL, Parsa AT. TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8+ T cells in glioma patients. *Neuro Oncol* 2010;12:7-13.
21. Czopik AK, Bynoe MS, Palm N, Raine CS, Medzhitov R. Semaphorin 7A is a negative regulator of T cell responses. *Immunity* 2006;24:591–600.
22. Danen EHJ, van Rheenen J, Franken W, Huvneers S, Sonneveld P, Jalink K, Sonnenberg A. Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway. *J Cell Biol* 2005;169:515–526.
23. Delamarre E, Taboubi S, Mathieu S, Bérenguer C, Rigot V, Lissitzky JC, Figarella-Branger D, Ouafik L, Luis J. Expression of integrin alpha6beta1 enhances tumorigenesis in glioma cells. *Am J Pathol* 2009;175:844-855.
24. Denli AM, Hannon GJ. RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem Sci* 2003;28:196–201.
25. Dietl J, Ruck P, Marzusch K, Horny HP, Kaiserling E, Handgretinger R. Uterine granular lymphocytes are activated natural killer cells expressing VLA-1. *Immunol Today*. 1992;13:236
26. Ding L, Sun X, You Y, Liu N, Fu Z. Expression of focal adhesion kinase and phosphorylated focal adhesion kinase in human gliomas is associated with unfavorable overall survival. *Transl Res* 2010;156:45–52.
27. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494–498.
28. Fiore R, Püschel AW. The function of semaphorins during nervous system development. *Front Biosci* 2003;8:484-499.
29. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, Yung WK, Paleologos N, Nicholas MK, Jensen R, Vredenburgh J, Huang J, Zheng M, Cloughesy T. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009;27:4733–4740.
30. Friese MA, Wischhusen J, Wick W, Weiler M, Eisele G, Steinle A, Weller M. RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* 2004;64:7596-7603.
31. Germano IM, Binello E. Gene therapy as an adjuvant treatment for malignant gliomas: from bench to bedside. *J Neurooncol* 2009;93:79–87.
32. Gherardi E, Love CA, Esnouf RM, Jones EY. The sema domain. *Curr Opin Struct Biol* 2004;14:669–678.
33. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol*. 2003;21:1624–1636.
34. Goodman CS, Kolodkin AL, Luo Y, Püschel AW, Raper JA. Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell* 1999;97:551–552.
35. Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor-β-Induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med* 2002;195:1499-1505.

36. Hall WA. The safety and efficacy of stereotactic biopsy for intracranial lesions. *Cancer* 1998;82:1749–55.
37. Hauck CR, Hsia DA, Schlaepfer DD. The focal adhesion kinase--a regulator of cell migration and invasion. *IUBMB Life* 2002;53:115–119.
38. Hemler ME, Lobb RR. The leukocyte beta 1 integrins. *Curr Opin Hematol* 1995;2:61-7
39. Hirota E, Yan L, Tsunoda T, Ashida S, Fujime M, Shuin T, Miki T, Nakamura Y, Katagiri T. Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2006;29:799–827.
40. Holmes S, Downs AM, Fosberry A, Hayes PD, Michalovich D, Murdoch P, Moores K, Fox J, Deen K, Pettman G, Wattam T, Lewis C. Sema7A is a potent monocyte stimulator. *Scand J Immunol* 2002;56:270–275.
41. Hu B, Guo P, Bar-Joseph I, Imanishi Y, Jarzynka MJ, Bogler O, Mikkelsen T, Hirose T, Nishikawa R, Cheng SY. Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway. *Oncogene* 2007;26:5577–5586.
42. Hynes RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* 2002;8:918-921.
43. Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 2002;71:907–920.
44. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2002;356:1795–1799.
45. Kang H, Lee CG, Homer RJ, Elias JA. Semaphorin 7A plays a critical role in TGF-beta1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 2007;204:1083–1093.
46. Ketting RF, Haverkamp TH, van Luenen HG, Plasterk RH. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 1999;99:133–141.
47. Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 1982;21:6188–6193.
48. Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 1986;25:312–318.
49. Kopp MA, Brommer B, Gatzemeier N, Schwab JM, Prüss H. Spinal cord injury induces differential expression of the profibrotic semaphorin 7A in the developing and mature glial scar. *Glia* 2010;58:1748–1756.
50. Kruger RP, Aurandt J, Guan K. Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:789–800.
51. Kumanogoh A, Shikina T, Suzuki K, Uematsu S, Yukawa K, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yamamoto M, Takamatsu H, Ko-Mitamura EP, Takegahara N, Marukawa S, Ishida I, Morishita H, Prasad DV, Tamura M, Mizui M, Toyofuku T, Akira S, Takeda K, Okabe M, Kikutani H. Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice. *Immunity* 2005;22:305–316.
52. Kumanogoh A, Watanabe C, Lee I, Wang X, Shi W, Araki H, Hirata H, Iwahori K, Uchida J, Yasui T, Matsumoto M, Yoshida K, Yakura H, Pan C, Parnes JR, Kikutani H. Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity* 2000 ;13:621–631.

53. Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Williams NN, Kaiser LR, Croce CM. Allelic loss on chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of semaphorin 3B in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003;63:3352–3355.
54. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001;95:190–198.
55. Lange C, Liehr T, Goen M, Gebhart E, Fleckenstein B, Ensser A. New eukaryotic semaphorins with close homology to semaphorins of DNA viruses. *Genomics* 1998;51:340–350.
56. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol* 2002;64:259–273.
57. Lazova R, Gould Rothberg BE, Rimm D, Scott G. The semaphorin 7A receptor Plexin C1 is lost during melanoma metastasis. *Am J Dermatopathol* 2009;31:177–781.
58. Le Mercier M, Fortin S, Mathieu V, Roland I, Spiegl-Kreinecker S, Haibe-Kains B, Bontempi G, Decaestecker C, Berger W, Lefranc F, Kiss R. Galectin 1 proangiogenic and promigratory effects in the Hs683 oligodendroglioma model are partly mediated through the control of BEX2 expression. *Neoplasia* 2009;11:485–496.
59. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method *Methods* 2001;25:402–408.
60. Love CA, Harlos K, Mavaddat N, Davis SJ, Stuart DI, Jones EY, Esnouf RM. The ligand-binding face of the semaphorins revealed by the high-resolution crystal structure of SEMA4D. *Nat Struct Biol* 2003;10:843–848.
61. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000;74:181–273.
62. McGirt MJ, Woodworth GF, Coon AL, Frazier JM, Amundson E, Garonzik I, Olivi A, Weingart JD. Independent predictors of morbidity after image-guided stereotactic brain biopsy: a risk assessment of 270 cases. *J Neurosurg* 2005;102:897–901.
63. Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000;173:89–97.
64. Miller J, Eisele G, Tabatabai G, Aulwurm S, von Kürthy G, Stitz L, Roth P, Weller M. Soluble CD70: a novel immunotherapeutic agent for experimental glioblastoma. *J Neurosurg* 2010;113:280–285.
65. Mine T, Harada K, Matsumoto T, Yamana H, Shirouzu K, Itoh K, Yamada A. CDw108 expression during T-cell development. *Tissue Antigens* 2000;55:429–436.
66. Moiseeva EP, Spring EL, Baron JH, de Bono DP. Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix. *J Vasc Res* 1999;36:47–58.
67. Moiseeva EP, Williams B, Goodall AH, Samani NJ. Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:1010–1016.
68. Müller MW, Giese NA, Swiercz JM, Ceyhan GO, Esposito I, Hinz U, Büchler P, Giese T, Büchler MW, Offermanns S, Friess H. Association of axon guidance factor semaphorin 3A with poor outcome in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2007;121:2421–2433.
69. Nair PN, McArdle L, Cornell J, Cohn SL, Stallings RL. High-resolution analysis of 3p deletion in neuroblastoma and differential methylation of the SEMA3B tumor suppressor gene. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;174:100–110.
70. Nasarre C, Roth M, Jacob L, Roth L, Koncina E, Thien A, Labourdette G, Poulet P, Hubert P, Crémel G, Roussel G, Aunis D, Bagnard D. Peptide-based interference of

- the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth in vivo. *Oncogene* 2010;29:2381–2392.
71. Natarajan M, Hecker TP, Gladson CL. FAK signaling in anaplastic astrocytoma and glioblastoma tumors. *Cancer J* 2003;9:126–133.
 72. Neufeld G, Kessler O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2008;8:632–45.
 73. Neufeld G, Shraga-Heled N, Lange T, Guttmann-Raviv N, Herzog Y, Kessler O. Semaphorins in cancer. *Front Biosci* 2005;10:751–760.
 74. Nguyen Q, Rodrigues S, Rodrigue CM, Rivat C, Grijelmo C, Bruyneel E, Emami S, Attoub S, Gespach C. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-165 and semaphorin 3A-mediated cellular invasion and tumor growth by the VEGF signaling inhibitor ZD4190 in human colon cancer cells and xenografts. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2070–2077.
 75. Noronha V, Berliner N, Ballen KK. Treatment-related myelodysplasia/AML in a patient with a history of breast cancer and an oligodendroglioma treated with temozolomide: case study and review of the literature. *Neuro-oncology* 2006;8:280–283.
 76. Nykvist P, Tu H, Ivaska J, Käpylä J, Pihlajaniemi T, Heino J. Distinct recognition of collagen subtypes by alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins. Alpha(1)beta(1) mediates cell adhesion to type XIII collagen. *J Biol Chem*. 2000;275:8255-8261
 77. Obara S, Nakata M, Takeshima H, Kuratsu J, Maruyama I, Kitajima I. Inhibition of migration of human glioblastoma cells by cerivastatin in association with focal adhesion kinase (FAK). *Cancer Lett* 2002;185:153–161.
 78. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J. Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:479–489.
 79. Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, Kisseleva E, Parman KS, Nadaf S, Carbone DP. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* 2003;101:4878–4886.
 80. Pasterkamp RJ, Kolk SM, Hellemons AJCGM, Kolodkin AL. Expression patterns of semaphorin7A and plexinC1 during rat neural development suggest roles in axon guidance and neuronal migration. *BMC Dev Biol* 2007;7:98.
 81. Pasterkamp RJ, Kolodkin AL. Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 2003a;13:79–89.
 82. Pasterkamp RJ, Peschon JJ, Spriggs MK, Kolodkin AL. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature* 2003b;424:398–405.
 83. Paulus W, Baur I, Beutler AS, Reeves SA. Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins. *Lab Invest* 1996;75:819-826.
 84. Pellegatta S, Poliani PL, Stucchi E, Corno D, Colombo CA, Orzan F, Ravanini M, Finocchiaro G. Intra-tumoral dendritic cells increase efficacy of peripheral vaccination by modulation of glioma microenvironment. *Neuro-oncology* 2010;12:377–388.
 85. Pérez-Villar JJ, Melero I, Gismondi A, Santoni A, López-Botet M. Functional analysis of alpha 1 beta 1 integrin in human natural killer cells. *Eur J Immunol* 1996;Sep;26:2023-2029.
 86. Pettit SJ, Seymour K, O'Flaherty E, Kirby JA. Immune selection in neoplasia: towards a microevolutionary model of cancer development. *Br J Cancer* 2000;82:1900–1906.
 87. Pichlmeier U, Bink A, Schackert G, Stummer W. Resection and survival in glioblastoma multiforme: an RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients. *Neuro-oncology* 2008;10:1025–1034.

88. Pozzi A, Moberg PE, Miles LA, Wagner S, Soloway P, Gardner HA. Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2202-2207
89. Prados MD, Chang SM, Butowski N, DeBoer R, Parvataneni R, Carliner H, Kabuubi P, Ayers-Ringler J, Rabbitt J, Page M, Fedoroff A, Sneed PK, Berger MS, McDermott MW, Parsa AT, Vandenberg S, James CD, Lamborn KR, Stokoe D, Haas-Kogan DA. Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. *J Clin Oncol* 2009;27:579-584.
90. Quinn JA, Jiang SX, Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Friedman AH, Sampson JH, McLendon RE, Herndon JE 2nd, Friedman HS. Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *J Clin Oncol* 2009;27:1262-1267.
91. Ray SJ, Franki SN, Pierce RH, Dimitrova S, Kotliansky V, Sprague AG, Doherty PC, de Fougères AR, Topham DJ. The collagen binding alpha1beta1 integrin VLA-1 regulates CD8 T cell-mediated immune protection against heterologous influenza infection. *Immunity* 2004;20:167-179.
92. Richter MV, Topham DJ. The alpha1beta1 integrin and TNF receptor II protect airway CD8+ effector T cells from apoptosis during influenza infection. *J Immunol* 2007;179:5054-5063.
93. Rieger J, Wick W, Weller M. Human malignant glioma cells express semaphorins and their receptors, neuropilins and plexins. *Glia* 2003;42:379-389.
94. Roa W, Brasher PMA, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, Fisher B, Fulton D, Gulavita S, Hao C, Husain S, Murtha A, Petruk K, Stewart D, Tai P, Urtasun R, Cairncross JG, Forsyth P. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol* 2004;22:1583-1588.
95. Roprai HK, Vanmeter T, Panou C, Schnüll S, Trillo-Pazos G, Davies D, Pilkington GJ. The role of integrin receptors in aspects of glioma invasion in vitro. *Int J Dev Neurosci* 1999;17:613-623.
96. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001;411:380-384.
97. Roth P, Kissel M, Herrmann C, Eisele G, Leban J, Weller M, Schmidt F. SC68896, a novel small molecule proteasome inhibitor, exerts antiglioma activity in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2009;15:6609-6618.
98. Rubio MA, Sotillos M, Jochems G, Alvarez V, Corbí AL. Monocyte activation: rapid induction of alpha 1/beta 1 (VLA-1) integrin expression by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Eur J Immunol* 1995;25:2701-2705.
99. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:697-715.
100. Sampson JH, Archer GE, Mitchell DA, Heimberger AB, Herndon JE 2nd, Lally-Goss D, McGehee-Norman S, Paolino A, Reardon DA, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD. An epidermal growth factor receptor variant III-targeted vaccine is safe and immunogenic in patients with glioblastoma multiforme. *Mol Cancer Ther* 2009;8:2773-2779.
101. Scott GA, McClelland LA, Fricke AF. Semaphorin 7a promotes spreading and dendricity in human melanocytes through beta1-integrins. *J Invest Dermatol* 2008;128:151-161.
102. Scott GA, McClelland LA, Fricke AF, Fender A. Plexin C1, a receptor for semaphorin 7a, inactivates cofilin and is a potential tumor suppressor for melanoma progression. *J Invest Dermatol* 2009;129:954-963.
103. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through

- alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:13612-13617.
104. Senger DR, Perruzzi CA, Streit M, Koteliansky VE, de Fougères AR, Detmar M. The alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2002;160:195-204.
 105. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen H. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006;7:392-401.
 106. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987-996.
 107. Stupp R, Hegi ME, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement PM, Grabenbauer GG, Ochsenbein AF, Simon M, Dietrich PY, Pietsch T, Hicking C, Tonn JC, Diserens AC, Pica A, Hermisson M, Krueger S, Picard M, Weller M. Phase I/IIa study of cilengitid and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* 2010;28:2712-2718
 108. Stupp R, Rugg C. Integrin inhibitors reaching the clinic. *J Clin Oncol* 2007;25:1637-1638.
 109. Suzuki K, Okuno T, Yamamoto M, Pasterkamp RJ, Takegahara N, Takamatsu H, Kitao T, Takagi J, Rennert PD, Kolodkin AL, Kumanogoh A, Kikutani H. Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin. *Nature* 2007;446:680-684.
 110. Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 1999;99:123-132.
 111. Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 1999;99:71-80.
 112. Tischoff I, Markwarth A, Witzigmann H, Uhlmann D, Hauss J, Mirmohammadsadeh A, Wittekind C, Hengge UR, Tannapfel A. Allele loss and epigenetic inactivation of 3p21.3 in malignant liver tumors. *Int J Cancer* 2005;115:684-689.
 113. Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, Gao B, Yokota J, Roche J, Drabkin H, Lerman MI, Gazdar AF, Minna JD. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001;98:13954-9.
 114. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2:735-747.
 115. Trichieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989;47:178-376.
 116. Voinnet O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* 2001;17:449-459.
 117. Walker MD, Alexander E, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, Norrell HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, Gehan EA, Strike TA. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* 1978;49:333-343.
 118. Walzer T, Galibert L, Comeau MR, Smedt T. Plexin C1 engagement on mouse dendritic cells by viral semaphorin A39R induces actin cytoskeleton rearrangement

- and inhibits integrin-mediated adhesion and chemokine-induced migration. *J Immunol* 2005;174:51–59.
119. Weller M, Fontana A. The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 1995;21:128–151.
 120. Wen PY, Schiff D, Kesari S, Drappatz J, Gigas DC, Doherty L. Medical management of patients with brain tumors. *J Neurooncol*. 2006;80:313–332.
 121. Westphal M, Ram Z, Riddle V, Hilt D, Bortey E. Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. *Acta Neurochir (Wien)* 2006;148:269-275.
 122. Wheeler CJ. Dendritic cell vaccines to combat glioblastoma. *Expert Rev Neurother* 2010;10:483–486.
 123. Wick A, Felsberg J, Steinbach JP, Herrlinger U, Platten M, Blaschke B, Meyermann R, Reifenberger G, Weller M, Wick W. Efficacy and tolerability of temozolomide in an alternating weekly regimen in patients with recurrent glioma. *J Clin Oncol* 2007;25:3357–3361.
 124. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Weller M. Hide-and-see in the brain: a role for HLA-G mediating immune privilege for glioma cells. *Semin Cancer Biol* 2003;13:343–351.
 125. Xu X, Ng S, Wu ZL, Nguyen D, Homburger S, Seidel-Dugan C, Ebens A, Luo Y. Human semaphorin K1 is glycosylphosphatidylinositol-linked and defines a new subfamily of viral-related semaphorins. *J Biol Chem* 1998;273:22428–22434.
 126. Yamada A, Kubo K, Takeshita T, Harashima N, Kawano K, Mine T, Sagawa K, Sugamura K, Itoh K. Molecular cloning of a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CDw108. *J Immunol* 1999;162:4094–4100.
 127. Yamamura M, Modlin RL, Ohmen JD, Moy RL. Local expression of antiinflammatory cytokines in cancer. *J Clin Invest* 1993;91:1005–1010.
 128. Yazdani U, Terman JR. The semaphorins. *Genome Biol* 2006;7:211.
 129. Yu HH, Kolodkin AL. Semaphorin signaling: a little less per-plexin. *Neuron* 1999;22:11–14.
 130. Zagzag D, Friedlander DR, Margolis B, Grumet M, Semenza GL, Zhong H, Simons JW, Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. Molecular events implicated in brain tumor angiogenesis and invasion. *Pediatr Neurosurg* 2000;33:49–55.
 131. Zalutsky MR, Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, McLendon RE, Wong TZ, Bigner DD. Clinical experience with alpha-particle emitting ²¹¹At: treatment of recurrent brain tumor patients with ²¹¹At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *J Nucl Med* 2008;49:30–38.
 132. Ziegler DS, Kung AL, Kieran MW. Anti-apoptosis mechanisms in malignant gliomas. *J Clin Oncol* 2008;26:493–500.

8 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	complementary DNA
CDw	Cluster of Differentiation wildtyp
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DC	Dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (von engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EHS-Sarkom	Engelbreth-Holm-Swarm Sarkom
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
EtBr	Ethidiumbromid
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Gy	Gray
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IE	Internationale Einheiten
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MGMT	Methyl-Guanyl-Methyl-Transferase
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nmol	Nanomol
PBL	peripheral blood lymphocytes
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (von engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (von engl.: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PET	Polyethylenterephthalat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Protein-Kinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSI	Plexin-Semaphorin-Integrin
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure (von engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (von engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodiumdodezylsulfat
SFI	spezifischer Fluoreszenzindex
SFM	serumfreies Medium
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
TAE-Puffer	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VESPR	Virus-encoded Semaphorin Protein Receptor
VLA	Very Late Antigen
VM	Vollmedium
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Professor Michael Weller für die Überlassung dieses interessanten Themas, die sehr geschätzte wissenschaftliche Unterstützung und die rasche Korrektur meiner Arbeit.

Herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Dr. Patrick Roth für die hervorragende Einarbeitung, Hilfestellung und fachliche Betreuung. Gleiches gilt auch für alle anderen Mitarbeiter des Labors für Molekulare Neuroonkologie, welche mir bei Fragen und Problemen immer hilfsbereit zur Seite gestanden haben.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir mein Studium ermöglichten und somit den Weg für die Erstellung dieser Arbeit geebnet haben. Meinem Freund Daniel danke ich dafür, dass er immer mit Rat und Tat an meiner Seite steht.

