

**Molekularbiologische Charakterisierung
von spannungssensitiven Natriumkanälen
in humanen Gliomen
unterschiedlicher biologischer Wertigkeit**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Michael Schrey**
geboren am 19. November 1975 in Bensheim

5. April 2004

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stephan Patt, Jena
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Stefan Wöfl, Heidelberg
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Baukowitz, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 1. März 2005

1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
(a)OA	(anaplastisches) Oligoastrozytom
A	Adenosin
AMV-RT	Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase
AP	Aktionspotenzial
AT	Annealing Temperatur
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
DA	Diffuses Astrozytom
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZ	Elongationszeit
G	Guanosin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastom
H/E	Hämatoxylin/Eosin
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
mGw	Mittlerer Grauwert
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
Na _v 1.X	Spannungssensitiver Natriumkanal, Familie 1, Subtyp X
Na _x	Atypischer Natriumkanal
PA	Pilozytisches Astrozytom
PCR	Polymerase-Chainreaction
PNS	Peripheres Nervensystem
rRNA	Ribosomal-Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Chainreaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
T	Thymidin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris, Borsäure, EDTA
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid
ZNS	Zentralnervensystem

2 Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	3
2	Inhaltsverzeichnis	4
3	Zusammenfassung	7
4	Einleitung	9
4.1	Spannungssensitive Natriumkanäle	10
4.1.1	Nomenklatur und Einteilung.....	10
4.1.1.1	Typische Isoformen	10
4.1.1.2	Atypische Isoform	12
4.1.2	Struktur	12
4.1.2.1	TTX-Affinität.....	14
4.1.3	Verteilung und Regulation der Expression	14
4.1.3.1	Isoformen Na _v 1.1, Na _v 1.2, Na _v 1.3 und Na _v 1.6.....	15
4.1.3.2	Verhältnis der einzelnen Isoformen	15
4.1.4	Funktion	16
4.1.4.1	Funktion in Neuronen und Muskelzellen.....	16
4.1.4.2	Funktion in Gliazellen	17
4.1.4.3	Rolle der intrazellulären Natriumkonzentration.....	18
4.2	Humane Gliome.....	18
4.2.1	Klassifikation von Gliomen.....	19
4.2.2	Astrozytome.....	21
4.2.2.1	Pilozytische Astrozytome.....	21
4.2.2.2	Diffuse Astrozytome.....	21
4.2.2.3	Anaplastische Astrozytome	22
4.2.2.4	Glioblastoma multiforme	22
4.2.3	Oligodendrogliale Tumoren	23
4.2.4	Oligoastrozytome.....	23
4.3	Ionenkanäle in Tumoren.....	24
4.3.1.1	Spannungssensitive Natriumkanäle in Gliomen	25
5	Ziele der Arbeit	27
6	Material und Methoden.....	28
6.1	Gewebeproben und Materialien.....	28
6.1.1	Gewebeproben	28
6.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	30
6.1.3	Medien, Puffer und Lösungen.....	31
6.1.4	Oligonukleotidprimer.....	32

6.1.5	Kits und Enzyme.....	33
6.1.6	Geräte.....	33
6.1.7	Software.....	33
6.2	Methode.....	33
6.2.1	Gesamt-RNA-Isolation.....	34
6.2.2	Reverse Transkription.....	35
6.2.3	Polymerase-Chain-Reaction (PCR).....	35
6.2.3.1	Äquilibrierung über GAPDH-Standard.....	36
6.2.3.2	Primerdesign.....	37
6.2.3.3	Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	37
6.2.3.4	Isoform-spezifische PCR.....	38
6.2.3.5	Elektrophorese.....	39
6.2.4	Sequenzierung der PCR- Produkte.....	40
6.2.4.1	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	40
6.2.4.2	Klonierung.....	40
6.2.4.3	Plasmidpräparation.....	40
6.2.4.4	Sequenzierung.....	40
6.3	Auswertung.....	41
6.3.1	Densiometrische Messungen.....	41
6.3.1	Statistische Methoden.....	41
7	Ergebnisse.....	43
7.1	RNA-Isolierung und Äquilibrierungsexperimente.....	43
7.1.1	RNA-Isolierung.....	43
7.1.1.1	Äquilibrierung an einem GAPDH-Standard.....	43
7.2	PCR-Experimente.....	44
7.2.1	Spannungssensitive Natriumkanäle in nicht-neoplastischen Gewebeproben.....	44
7.2.1.1	Infiltrationszone eines Glioblastoms.....	45
7.2.2	Spannungssensitive Natriumkanäle in Gliomen.....	46
7.2.2.1	Na _v 1.1.....	47
7.2.2.2	Nav1.2.....	48
7.2.2.3	Na _v 1.3.....	49
7.2.2.4	Na _v 1.4.....	51
7.2.2.5	Na _v 1.6.....	51
7.2.2.6	Na _x	52
7.2.3	Vergleich OA WHO II / aOA WHO Grad II.....	53
7.2.4	Qualitative Vergleiche.....	53
7.3	Sequenzierung.....	55

8	Diskussion	56
8.1	Material und Methoden	56
8.1.1	Tumormaterial und gewonnene mRNA	56
8.1.2	RT-PCR	57
8.1.3	GAPDH-Äquilibrierung.....	57
8.1.4	PCR-Experimente.....	58
8.1.5	Elektrophorese und densitometrische Auswertung	59
8.2	Spannungssensitive Natriumkanäle in nicht-neoplastischen Ge-webeproben ...	60
8.2.1	Gewebeprobe aus dem Randbereich eines Glioblastoms.....	61
8.3	Spannungssensitive Natriumkanäle in Gliomen	63
8.3.1	Isoformen sind in unterschiedlichem Maße in den verschiedenen Tumorentitäten nachweisbar.....	63
8.3.1.1	Benigne Tumoren vom WHO Grad I und II.....	63
8.3.1.2	Maligne Tumoren vom WHO Grad III und IV.....	64
8.4	Die Rolle von spannungssensitiven Natriumkanälen in Gliomen	66
8.4.1	Proliferation.....	67
8.4.2	Invasion und Motilität.....	68
8.4.3	Tumor-assoziierte Epilepsie	69
8.4.4	Subtypisierungen	70
9	Schlussfolgerungen	72
10	Literaturverzeichnis.....	73
11	Ehrenwörtliche Erklärung.....	83
12	Lebenslauf	84
13	Danksagung.....	85

3 Zusammenfassung

Spannungssensitive Natriumkanäle ermöglichen Natriumionen das Passieren der Zellmembran von extra- nach intrazellulär in Abhängigkeit von einer an der Membran anliegenden Spannung. Die wichtigste Funktion der dabei fließenden Natriumströme ist die Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen. Spannungssensitive Natriumkanäle dienen daher in erster Linie in Neuronen der Informationsverarbeitung und in Muskelzellen der Erregungsausbreitung. Mittlerweile können zahlreiche Isoformen anhand unterschiedlicher Aminosäuresequenzen unterschieden werden, deren Verteilung inter- und intrazellulär unterschiedlich ist. Zu den in Neuronen des ZNS vorkommenden Isoformen zählen insbesondere $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.6$ und Na_x (Goldin 2001; Yu und Catterall 2003). Doch auch in Zellen, die per se nicht zur Bildung von Aktionspotentialen befähigt sind, konnten diese Isoformen nachgewiesen werden. Hierbei sind insbesondere verschiedene Zellen der Glia zu nennen. Die Bedeutung dieser glialen Natriumkanäle ist noch nicht ausreichend verstanden (Sontheimer *et al.* 1996). Auch in Gliomen konnten mittels elektrophysiologischer Untersuchungen spannungssensitive Natriumkanäle nachgewiesen werden, deren Rolle unklar ist (Bordey und Sontheimer 1998; Labrakakis *et al.* 1997; Patt *et al.* 1996). In anderen Tumorarten, beispielsweise Prostatakarzinomen, konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von spannungssensitiven Natriumkanälen und Tumoreigenschaften gefunden werden (Diss *et al.* 2001; Fraser *et al.* 2000). Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die Identität der in Gliomen unterschiedlicher biologischer Wertigkeit vorkommenden Isoformen zu klären. Darüber hinaus sollen Hypothesen über die möglichen Funktionen dieser Kanäle erarbeitet und eventuelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Gliomen im Hinblick auf ihre Kanalausstattung sollen herausgearbeitet werden.

Zu diesem Zwecke wurden Operationspräparate von 17 humanen Gliomen unterschiedlicher Histologie und biologischer Wertigkeit und drei tumor-freie Hirngewebe-proben mittels RT-PCR auf das Vorhandensein von cDNA für spannungssensitive Natriumkanäle untersucht. Die durch spezifische Primer amplifizierte PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und densitometrisch erfasst. Sequenzierungen der PCR-Produkte bestätigten die Identität der Sequenzen.

Die Kanalausstattung der tumor-freien Proben entsprach der aktuellen Literatur; sämtliche ZNS-Isoformen waren amplifizierbar. In astroglial veränderten Proben

fanden wir eine besonders starke Bande für $\text{Na}_v1.3$, weshalb diese Isoform möglicherweise ein Gliose-Marker sein könnte.

Die Kanalprofile der Gliome waren von den nicht-neoplastischen Geweben und untereinander verschieden. Tendenziell zeigten Gliome von niedrigem WHO-Grad ein größeres Spektrum an verschiedenen Isoformen als die malignen Gliome. Außerdem fanden wir für die nachweisbaren Isoformen in den benignen Tumoren stärkere Signale als für die jeweiligen Kanäle in den malignen Tumoren. Die Unterschiede ließen sich zum Teil mit statistischer Signifikanz sichern.

Im Vergleich zwischen nicht-neoplastischem und neoplastischem Gewebe fanden wir deutlich stärkere Werte für $\text{Na}_v1.3$ bei allen Gliomen, für $\text{Na}_v1.6$ bei den pilozytischen Astrozytomen und für Na_x bei den benignen Tumoren.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die in anderen Tumoren für spannungssensitive Natriumkanäle nachgewiesenen malignitätsfördernden Eigenschaften (gesteigerte Invasionsfähigkeit) wahrscheinlich nicht auf Gliome übertragbar sind. Dahingegen bestätigten sich die elektrophysiologisch bekannten Befunde einer mit zunehmender Malignität abnehmenden Anzahl von Kanälen. Ob spannungssensitive Natriumkanäle eine Rolle in der Entstehung von symptomatischen Epilepsien (Patt *et al.* 2000) spielen, kann anhand der vorliegenden Daten nur vermutet werden; hohe Signale in niedriggradigen Tumoren schließen dies jedoch nicht aus.

Es konnte gezeigt werden, dass manchen Isoformen möglicherweise Marker-Eigenschaften zukommen, insbesondere der Isoform $\text{Na}_v1.6$ als Marker für hohe Differenzierung der Tumorzellen, sowie Na_x als Marker für astrozytäre Differenzierung in benignen Tumoren. Einzelne Ausreißer innerhalb der Tumorgruppen können entweder statistisch begründet sein oder aber Hinweise auf spezielle Subtypen sein, beispielsweise für unterschiedliche Kanalprofile bei primären und sekundären Glioblastomen. Nicht zuletzt ist es möglich, dass manche Isoformen lediglich als Epiphänomen auftreten.

Die vorliegende Arbeit sollte durch weiterführende Untersuchungen an größeren Stichproben und eventuell verschiedenen Abschnitten desselben Tumors ergänzt werden. Die Anwendung subtilerer Techniken, wie in-situ-Hybridisierung oder Chip-Technologie zum Nachweis von spannungssensitiven Natriumkanälen wäre wünschenswert.

4 Einleitung

Ionenkanäle sind integrale Bestandteile nahezu jeder Zellmembran. Sie bilden eine Pore, durch welche geladene Teilchen die Zellmembran passieren können. Dadurch werden zahlreiche physiologische Funktionen erfüllt und Prozesse im Zellinneren in Gang gesetzt.

Entscheidend für die Einteilung der Ionenkanäle in verschiedene Gruppen und deren Nomenklatur sind die Art des passierenden Ions sowie die Steuerung des Öffnungsverhaltens des Kanalproteins. Es existieren verschiedene Steuerungsmöglichkeiten, beispielsweise über Ligandenbindung, pH-Wert-Änderung, mechanische Deformierung und Änderung der an der Zellmembran anliegenden Spannung.

Spannungssensitive Natriumkanäle sind Proteine, die Natriumionen die Passage der Zellmembran entlang eines Konzentrationsgradienten in Abhängigkeit von der an der Membran anliegenden Spannung ermöglichen. Die wichtigste Funktion der dabei fließenden Natriumströme ist die Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen. Damit sind spannungssensitive Natriumkanäle die entscheidenden Membranstrukturen für die Weiterleitung und Verarbeitung von Informationen im Nervensystem höherer Lebewesen.

Spannungssensitive Natriumkanäle sind zunächst erwartungsgemäß in Neuronen gefunden und untersucht worden. Mittlerweile können zahlreiche Isoformen, das heißt in ihrer Proteinstruktur verschiedene Subtypen, unterschieden werden. Doch auch in Zellen, die per se nicht zur Bildung von Aktionspotentialen befähigt sind, konnten in nahezu alle neuronalen Isoformen nachgewiesen werden. Hierbei sind insbesondere verschiedene Zellen der Glia zu nennen. Die Bedeutung dieser glialen Natriumkanäle ist noch nicht ausreichend verstanden.

Überraschenderweise zeigten auch gliale Tumorzellen in elektrophysiologischen Untersuchungen die Fähigkeit, Aktionspotentiale zu bilden. Dies weist auf die funktionelle Expression von spannungssensitiven Natriumkanälen hin. Welche der bekannten Isoformen in diesen Tumoren exprimiert werden, ist bisher nicht untersucht worden und Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Unbekannt ist auch, welche Funktion diese Kanäle für die Tumorzellen *in vivo* haben. Eine Perspektive zur Klärung dieser Fragen bietet die hier vorgelegte molekulargenetische Charakterisierung unterschiedlicher Gliome anhand der von ihnen exprimierten Kanalisformen.

Im Folgenden werden zunächst die bekannten Daten über die Struktur, Expression und Funktion der spannungssensitiven Natriumkanäle vorgestellt. Anschließend folgt

ein Überblick über die Neuropathologie der in der Studie untersuchten Tumorentitäten. Nach einem kurzen Überblick über Bedeutung von Ionenkanälen für die Onkogenese wird schließlich das Vorkommen der spannungssensitiven Natriumkanäle in Gliomen - soweit bisher untersucht - beschrieben.

4.1 Spannungssensitive Natriumkanäle

4.1.1 Nomenklatur und Einteilung

Spannungssensitive Natriumkanäle bestehen aus einer α -Untereinheit, die in verschiedenen Geweben mit einer oder zwei β -Untereinheiten assoziiert ist (Catterall 1993; Isom *et al.* 1994). Die α -Untereinheit alleine vermittelt die entscheidenden Charakteristika wie Natriumselektivität und Spannungssensitivität (Denac *et al.* 2000). Die Assoziation mit β -Untereinheiten wirkt modulierend auf die Kinetik des Aktivierungs- und Inaktivierungsverhaltens sowie die Spannungssensitivität der α -Untereinheit (Isom 2001). 1980 gelang es erstmals, die α -Untereinheit in Axonen des Zitteraals *Electrophorus electricus* zu isolieren (Agnew *et al.* 1980). Eine komplette cDNA der α -Untereinheit dieses Kanals konnte 1984 sequenziert werden (Noda *et al.* 1984). Durch Anwendung von elektrophysiologischen und molekularbiologischen Techniken konnten mittlerweile zahlreiche Isoformen der α -Untereinheit nachgewiesen und in heterologen Systemen funktionell exprimiert werden. Einen Überblick über die derzeit bekannten α -Untereinheiten der spannungssensitiven Natriumkanäle gibt Tabelle 1.

4.1.1.1 Typische Isoformen

Die allermeisten der bisher bekannten Isoformen können aufgrund evolutionärer Verwandtschaft untereinander in einer gemeinsamen Familie zusammengefasst werden. Die bis vor kurzem vertretene Ansicht, dass es zumindest drei unterschiedliche Familien gäbe (Goldin 1999), wurde verlassen. Grund hierfür waren neue Untersuchungen über die phylogenetische Entwicklung der Isoformen (Goldin 2001).

Tabelle 1: α -Untereinheiten spannungssensitiver Natriumkanäle

Isoform	Gen Symbol	Chromosomale Lokalisation	Vorherrschend in:	TTX IC ₅₀	Ausgewählte Literatur
Na_v1.1	SCN1A	2q24	ZNS/PNS	10 nM	(Lu et al. 1992)
Na_v1.2	SCN2A	2q23-24	ZNS	10 nM	(Lu et al. 1992)
Na_v1.3	SCN3A	2q24-31	ZNS	15 nM	(Jeong et al. 2001)
Na_v1.4	SCN4A	17q23-25	Skelettmuskel Prostatakarzinom	25 nM	(George, Jr. et al. 1992b)
Na_v1.5	SCN5A	3p21	Herzmuskel, ZNS*	6 μ M	(Gellens et al. 1992; Wu et al. 2002)
Na_v1.6	SCN8A	12q13	ZNS	<10 nM	(Plummer et al. 1998)
Na_v1.7	SCN9A	2q24	Medulläres Schilddrüsen-Ca, PNS**, Prostatakarzinom	25 nM	(Klugbauer et al. 1995)
Na_v1.8	SCN10A	3p22-p21	PNS	>100 μ M	(Rabert et al. 1998)
Na_v1.9	SCN11A	3p21-24	PNS	1 μ M	(Dib-Hajj et al. 1999)
Na_x/Na_c	SCN6A	2q21-23	Herzmuskel, Uterus, ZNS***	-	(Gautron et al. 1992; George, Jr. et al. 1992a; Watanabe et al. 2002)

Isoform: Bezeichnung gemäß aktueller Nomenklatur; Gen Symbol: Bezeichnung des Gens; Chromosom: Lokalisation im menschlichen Genom; Gewebe: Vorkommen der Isoform im Menschen; TTX IC₅₀: TTX-Konzentration zur Blockade; * Maus; ** Ratte; *** Astrozyten der Ratte, periventrikuläres Organ; ZNS: Zentralnervensystem; PNS: peripheres Nervensystem

Übrig geblieben ist eine einzige große Familie von spannungssensitiven Natriumkanalisformen, die mit Na_v1.x bezeichnet wird, wobei x die Nummer der jeweiligen Isoform bezeichnet. Diese Nomenklatur ist in Anlehnung an die bereits für Kalzium- und Kaliumkanäle entwickelte Nomenklatur gewählt worden, nach der ein Kanal nach dem bevorzugten Ion (Na), des Steuerungsmechanismus (voltage), der Familie (1) und der jeweiligen Isoform (.x) benannt wird (Chandy 1991; Ertel *et al.* 2000; Goldin *et al.* 2000). Eine Unterteilung der Familie in Untergruppen kann aufgrund von Sequenzähnlichkeiten untereinander versucht werden. Die Isoformen Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3 und Na_v1.7 liegen beim Menschen nahe beieinander auf Chromosom 2 und sind untereinander eng verwandt. Die drei Isoformen, die eine geringere TTX-Sensitivität zeigen, nämlich Na_v1.5, Na_v1.8 und Na_v1.9, liegen auf Chromosom 3 des Menschen und sind ebenso untereinander enger als mit anderen Isoformen verwandt. Na_v1.4 und Na_v1.6 finden sich jeweils auf wiederum anderen Chromosomen,

17 bzw. 12, und können jeweils als eigene Untergruppe angesehen werden (Plummer und Meisler 1999).

4.1.1.2 Atypische Isoform

Eine weitere Isoform, die in Astrozyten der Ratte (NaG, Gautron *et al.* 1992), humanen Herzmuskelzellen (Nav2.1, George, Jr. *et al.* 1992a), Zellen des murinen Atriums (Nav2.3, Felipe *et al.* 1994) und in Hinterwurzelganglien der Ratte (SCL11, Akopian *et al.* 1997) unter verschiedenen Bezeichnungen nachgewiesen werden konnte, wurde zunächst für eine Glia-spezifische Isoform der spannungssensitiven Natriumkanäle gehalten (Gautron *et al.* 1992; Potts *et al.* 1993). Es stellte sich jedoch heraus, dass es sich wahrscheinlich um ein und dieselbe Isoform handelt. Ihre funktionelle Expression in heterologen Systemen ist bisher nicht geglückt (Gautron *et al.* 1992; Goldin 2001; Smith und Goldin 1998). Überdies weist ihre Primärsequenz signifikante Unterschiede in gerade für die Charakteristika eines spannungssensitiven Natriumkanals essentiellen Motiven auf. Die Isoform wurde daher längere Zeit unter der Bezeichnung Na_x geführt. Neuere Untersuchungen (Hiyama *et al.* 2002; Watanabe *et al.* 2002) zeigen jedoch, dass es sich bei Na_x möglicherweise um einen durch Änderungen der extrazellulären Natriumkonzentration gesteuerten Kanal handelt, der eine Rolle in der Regulation des Wasserhaushalts des Gesamtorganismus und der Regulation der lokalen Natriumkonzentration spielt. Von Ogata und Ohishi (2002) wurde vorgeschlagen, Na_x daher als Na_c für „concentration-sensitive“ zu bezeichnen. In unserer Untersuchung wird diese Isoform weiterhin als Na_x bezeichnet. Unklar ist, ob diese Isoform neben normalen Astrozyten auch in neoplastischen astrozytären Tumorzellen exprimiert wird, weshalb wir Na_x trotz seiner Unterschiede zu den anderen „typischen“ Isoformen in unserer Studie mit untersuchten.

4.1.2 Struktur

Unterschiede zwischen den bekannten Isoformen finden sich in der Aminosäuresequenz der α -Untereinheit. Die drei bekannten β -Untereinheiten β_1 bis β_3 , die mit manchen α -Untereinheiten in unterschiedlichen Geweben assoziiert sind, sind unabhängig von der assoziierten α -Untereinheit und Gewebeart in ihrer Proteinstruktur stets konstant. Eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Isoformen beruht auf den Unterschieden zwischen den α -Untereinheiten (Goldin *et al.* 2000; Goldin 2001). Die Proteinstruktur der α -Untereinheiten ist allen Isoformen in wesentlichen

Motiven gemeinsam. Es handelt sich bei der α -Untereinheit um ein etwa 280 kDa großes Glykoprotein mit zwischen 1700 und 2000 Aminosäuren (Catterall 2000). Das Molekül besteht aus vier homologen Domänen, die als D I bis D IV bezeichnet werden. Sie sind untereinander durch zytoplasmatisch gelegene, unterschiedlich lange Zwischensequenzen verbunden. Jede der vier Domänen besteht aus sechs transmembranal angeordneten α -helikalen Segmenten, bezeichnet mit S1 bis S6. Die einzelnen Segmente sind durch Zwischensequenzen miteinander verbunden. Dabei kommt der vergleichsweise langen Sequenz zwischen den Segmenten S5 und S6, bezeichnet als P-Segment, eine besondere Bedeutung zu. Im gefalteten Protein bilden alle vier Domänen gemeinsam die Pore des Kanals (Catterall 2000; Denac et al. 2000; Goldin 2001; Marban et al. 1998; Yu und Catterall 2003). Die voneinander verschiedenen P-Segmente aller vier Domänen kleiden diese Pore aus (Yellen *et al.* 1991). Hierin besteht ein deutlicher Unterschied zu den verwandten Kaliumkanälen, deren P-Segmente untereinander identisch sind. Die innere Porenöffnung wird durch die S6-Segmente der Domänen gebildet (Yu und Catterall 2003). Eine schematische Darstellung des Kanalproteins zeigt Abbildung 1.

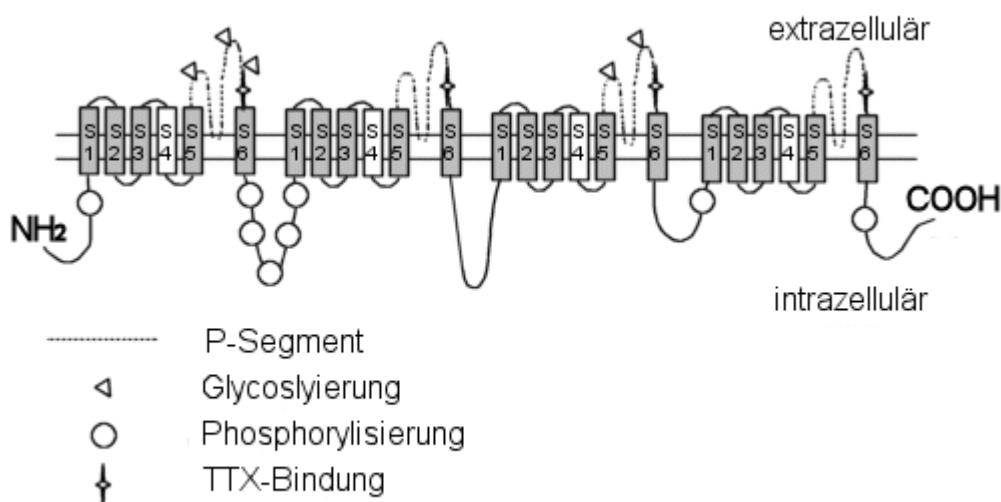


Abbildung 1: Struktur der α -Untereinheit eines spannungssensitiven Natriumkanals, modifiziert nach Denac et al. (2000). S1-S6 Segmente 1-6

Verschiedene Charakteristika des Kanalproteins finden ihre Entsprechung auf molekularer Ebene. Zu diesen Eigenschaften der spannungssensitiven Natriumkanäle gehören die Ionenselektivität, das Öffnen und die schnelle Inaktivierung, sowie die Beeinflussbarkeit durch Pharmaka und Toxine. Eine ausführliche Beschreibung dieser Mechanismen und ihrer molekularen Organisation findet sich beispielsweise bei Marban (1998) und Denac (Denac *et al.* 2000). Zusammenfassend lässt sich festhal-

ten, dass die funktionellen Einheiten der Kanalproteine hauptsächlich aus der äußeren Öffnung nebst Selektivitätsfilter und Toxinbindungsstellen, einem Spannungssensor und dem damit verbundenen Aktivierungsmechanismus, und einer inneren, zytosolischen Öffnung mit Inaktivierungsmechanismus bestehen. Diese funktionellen Einheiten sind in allen Subtypen sowohl innerhalb als auch zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert.

4.1.2.1 TTX-Affinität

Verschiedene Toxine binden und blockieren die spannungssensitiven Natriumkanäle (Denac *et al.* 2000). Von besonderem Interesse ist das Tetrodotoxin (TTX), das Gift des Kugelfisches, dessen Affinität zu spannungssensitiven Natriumkanälen zur Unterscheidung in TTX-sensitive und TTX-resistente Isoformen geführt hat. Die unterschiedliche Affinität ist auf einen geringen Unterschied in der Aminosäuresequenz des P-Segments (Abbildung 1) zurückzuführen (Terlau *et al.* 1991). TTX führt zu einer reversiblen Blockade des Kanals. Bei TTX-sensitiven Isoformen bewirkt TTX in nanomolarer Konzentration eine Blockade des Kanals für Natriumionen, bei TTX-insensitiven Isoformen liegt die zur Blockade benötigte TTX-Konzentration um ein Vielfaches höher, teilweise im mikromolaren Bereich (Marban *et al.* 1998). In Untersuchungen an isolierten funktionell exprimierten Isoformen haben sich die im ZNS vorherrschenden Kanalisofomen $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ und $Na_v1.6$ als TTX-sensitiv herausgestellt (Chahine *et al.* 1994; Ogata und Ohishi 2002; Smith *et al.* 1998a; Smith und Goldin 1998; Suzuki *et al.* 1988). Die Isoformen $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ und $Na_v1.9$, die im peripheren Nervensystem dominieren, sind bis auf $Na_v1.7$ dagegen TTX-resistent (Klugbauer *et al.* 1995; Ogata *et al.* 2000; Sangameswaran *et al.* 1997). Von den bekannten Muskel-Isoformen ist $Na_v1.4$ TTX-sensitiv und $Na_v1.5$ wiederum TTX-resistent (Chahine *et al.* 1994; Gellens *et al.* 1992) (s. Tabelle 1).

4.1.3 Verteilung und Regulation der Expression

Generell können die spannungssensitiven Natriumkanäle hinsichtlich des Vorkommens in unterschiedlichen Geweben in drei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe mit den Isoformen $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ und $Na_v1.6$ ist in Zellen des Zentralnervensystems die dominierende Gruppe. Alle Isoformen werden in Neuronen und Gliazellen exprimiert (Black *et al.* 1994a; Oh *et al.* 1994; Schaller *et al.* 1995). Die zweite Gruppe mit den Isoformen $Na_v1.4$ und $Na_v1.5$ ist die im Muskel vorherrschende

de Gruppe. $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ und $Na_v1.9$ dominieren in Zellen des peripheren Nervensystems (Goldin 2001). Na_x konnte in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, darunter Herzmuskel, Uterus und Astrozyten (Gautron *et al.* 1992), sowie periventriculären Neuronen und Ependymzellen (Watanabe *et al.* 2000).

Die Expression von spannungssensitiven Natriumkanälen in Neuronen und Gliazellen ist dynamisch reguliert und von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehören:

- Lokalisation des Kanals innerhalb einer Zelle,
- Lokalisation der Zelle innerhalb des ZNS,
- Differenzierungsgrad der Zelle.

Im Folgenden sollen kurz die Unterschiede bezüglich der oben genannten Faktoren für die in dieser Studie untersuchten Isoformen beleuchtet werden.

4.1.3.1 Isoformen $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ und $Na_v1.6$

$Na_v1.1$ ist die in kaudalen Regionen des Gehirns sowie im Rückenmark dominierende Isoform und kommt in hohen Konzentrationen insbesondere im Soma der Zellen vor. $Na_v1.2$ dagegen dominiert in unmyelinisierten Axonen, wo sie die Aktionspotentiale weiterleitet (Boiko *et al.* 2001; Gong *et al.* 1999; Kaplan *et al.* 2001; Westenbroek *et al.* 1989), und findet sich besonders ausgeprägt in rostralen Abschnitten des ZNS (Beckh *et al.* 1989; Westenbroek *et al.* 1989). $Na_v1.3$ zeigt insbesondere bei Ratten eine stark entwicklungsabhängige Expression. Besonders hohe Konzentrationen fanden sich im neonatalen Kortex und hier ähnlich wie $Na_v1.1$ in den Somata der Zellen (Beckh *et al.* 1989; Felts *et al.* 1997; Yu und Catterall 2003). Bei Menschen dagegen findet sich $Na_v1.3$ auch im adulten Gehirn (Whitaker *et al.* 2001). $Na_v1.6$ ist die am reichlichsten exprimierte Isoform im adulten ZNS (Schaller *et al.* 1995). Sie ersetzt im adulten Gehirn die Isoform $Na_v1.2$ und findet sich insbesondere an den Ranvier'schen Schnürringen, wo sie in myelinisierten Axonen das Aktionspotential generiert (Caldwell *et al.* 2000; Kaplan *et al.* 2001; Krzemien *et al.* 2000).

4.1.3.2 Verhältnis der einzelnen Isoformen

Ältere Untersuchungen an Präparationen des Neokortex der Ratte ergaben zur Frage der Häufigkeit der einzelnen Isoformen für $Na_v1.2$ einen Anteil von 80% der nachgewiesenen Kanäle und für $Na_v1.1$ einen Anteil von 18% (Gordon *et al.* 1987). Die Isoform $Na_v1.1$ wurde in einer weiteren Untersuchung in allen untersuchten Gewe-

ben stets geringer als $\text{Na}_v1.2$ exprimiert gefunden (Westenbroek *et al.* 1989). Neuere Untersuchungen haben mittlerweile gezeigt, dass $\text{Na}_v1.6$ ebenfalls mindestens so häufig exprimiert ist wie $\text{Na}_v1.2$ (Schaller *et al.* 1995). Die Dichte von Kanälen ist in Astrozyten 100-10.000fach geringer als in Neuronen (Sontheimer *et al.* 1996; Verkhratsky und Steinhauser 2000). Die Spannbreite ist sehr groß. Sie bewegt sich zwischen 10.000 und weniger als einem Kanal pro Quadratmikrometer Zelloberfläche und ist abhängig von Zellart, Lokalisation im Nervensystem und intrazellulär sowie der Spezies (Sontheimer *et al.* 1996). Zur Häufigkeit von Na_x liegen derzeit keine Daten vor.

4.1.4 Funktion

4.1.4.1 Funktion in Neuronen und Muskelzellen

Spannungssensitive Natriumkanäle sind verantwortlich für die Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen in Nerven und Muskelfasern. Eine Aktivierung der spannungssensitiven Natriumkanäle durch eine initiale Depolarisierung der Zellmembran über den Schwellenwert ausgehend vom Ruhepotential bewirkt einen dem Konzentrationsgefälle folgenden schnellen Einstrom von Natriumionen aus dem Extrazellularraum in den Intrazellularraum. An der Zellmembran führt dieser Ionenstrom zu einer Depolarisation, die in einem sogenannten „Overshoot“ bis in den positiven Bereich gipfelt. Die anschließende Zunahme der Leitfähigkeit der auswärtsgerichteten Kaliumkanäle und gleichzeitige Abnahme der Natriumleitfähigkeit bewirkt eine Repolarisation und u. U. kurzfristige Hyperpolarisation der Zellmembran bis zum und über das Ruhepotential hinaus. Das Kanalprotein durchläuft dabei zyklisch drei Zustände, deren molekulare Grundlagen oben geschildert wurden. Diese Zustände sind aktiviert, inaktiviert und ruhend. Der Unterschied zwischen dem inaktivierten und dem ruhenden Zustand liegt in der Nicht-Aktivierbarkeit von inaktiven Kanälen im Gegensatz zu den ruhenden Kanälen. Generell ist ein Ionenfluss nur im aktivierten Zustand möglich, obgleich ein geringer Strom auch durch ruhende Kanäle fließt (Denac *et al.* 2000; Goldin 2001; Marban *et al.* 1998).

Bezüglich der funktionellen Unterschiede der einzelnen Kanalisoforamen konnten in elektrophysiologischen Experimenten subtile Unterschiede zwischen den Isoformen belegt werden. Dazu wurden Untersuchungen an Purkinjezellen des Cerebellums durchgeführt, die die Isoformen $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$ und $\text{Na}_v1.6$ exprimieren (Black *et al.*

1994a; Vega-Saenz de Miera *et al.* 1997). Dabei zeigte sich, dass unterschiedliche Isoformen für unterschiedliche Ströme verantwortlich sind, beispielsweise $\text{Na}_v1.1$ für einen transienten Strom und $\text{Na}_v1.6$ für einen persistierenden Strom. Hinsichtlich der Kinetik von Aktivierungs- und Inaktivierungsgeschwindigkeit sowie der Stärke eines persistierenden Stroms existieren ebenfalls subtile Unterschiede zwischen den verschiedenen Isoformen, die zum Großteil durch die β -Untereinheiten vermittelt werden (Smith *et al.* 1998a). Die Unterschiede könnten möglicherweise auch auf zellspezifische posttranslationelle Modifikationen des Kanalproteins beruhen bzw. Eigenschaften von spezifischen Splice-Varianten einer Isoform darstellen (Goldin 2001).

4.1.4.2 Funktion in Gliazellen

Die Entdeckung, dass auch per se nicht erregbare Zellen über spannungssensitive Natriumkanäle verfügen, war zunächst überraschend (Bevan *et al.* 1985; Chiu *et al.* 1984; MacVicar 1984). Bis heute ist die Funktion der spannungssensitiven Natriumkanäle in solchen Zellen nicht vollständig verstanden. Insbesondere die Expression von spannungssensitiven Natriumkanälen in Gliazellen ist Gegenstand der Forschung (Sontheimer *et al.* 1996). Verschiedene Hypothesen hinsichtlich der Rolle von spannungssensitiven Natriumkanälen in Gliazellen wurden vorgeschlagen: Astrozyten in unmittelbarer Nähe zu Neuronen könnten Natriumkanäle an diese abgeben, um deren Synthese-Last zu verringern. Dies wäre insbesondere dann von Interesse, wenn man die weiten Entfernungen zwischen dem ribosomalen Entstehungsort und dem Einsatzort in den Axonen für die spannungssensitiven Natriumkanäle bedenkt (Sontheimer *et al.* 1996). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass ein direkter Kontakt nicht zwingend notwendig für die axonale Anreicherung von spannungssensitiven Natriumkanälen ist (Deerinck *et al.* 1997). Astrozyten könnten außerdem mittels ihrer spannungssensitiven Natriumkanäle die Nähe von Neuronen „erspüren“ (Chao *et al.* 1994). Eine weitere Hypothese stützt sich auf das Vorhandensein eines auch in Ruhe vorhandenen Ionenflusses durch die spannungssensitiven Natriumkanäle der Gliazellen. Der dadurch bedingte Anstieg der intrazellulären Natriumionenkonzentration ist eine der treibenden Kräfte für die Aktivität der Na^+K^+ -ATPase. Durch deren Aktivität bleiben die Ionengradienten an der Zellmembran erhalten. Außerdem kann über die Na^+K^+ -ATPase-Aktivität eine Pufferung des extrazellulären Kaliums erfolgen. Eine Depolarisation der Gliazellen durch einen Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration würde eine Steigerung des Natriumeinstroms durch die spannungssensitiven Natriumkanäle bewirken. Durch stimulierte

Na^+K^+ -ATPase-Aktivität bliebe die neuronale Erregbarkeit erhalten (Sontheimer *et al.* 1994).

4.1.4.3 Rolle der intrazellulären Natriumkonzentration

Die Erhöhung des intrazellulären Natriums kann neben der Fortleitung des Aktionspotentials und der damit vermittelten Information weitere Reaktionen im Zellinneren auslösen. Dazu gehören unter anderem eine Beeinflussung des Energieniveaus, Beeinflussung von DNA-Synthese und Zellzyklus, sowie eine Änderung der intrazellulären Ionenkonzentrationen. Die Rolle der *spannungssensitiven* Natriumkanäle für die Beeinflussung der intrazellulären Natriumkonzentration in Gliazellen ist wahrscheinlich aus mehreren Gründen von untergeordneter Bedeutung. So ist die Dichte der spannungssensitiven Natriumkanäle in glialen Zellen verhältnismäßig gering (s.o.). Nur eine geringe Anzahl wird beim physiologischen Ruhepotential aktivierbar sein. Die schnelle Inaktivierung limitiert die Menge des einströmenden Natriums. Schließlich sind gliale Zellen mit einer Reihe von leistungsfähigen Natriumtransportmechanismen ausgestattet, wie beispielsweise einem $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ Kotransporter oder einem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, die wahrscheinlich einen größeren Beitrag zum Natriumeinstrom beitragen (Verkhratsky und Steinhauser 2000; Yu und Catterall 2003). Eine in ihrer Bedeutung noch unklare Möglichkeit des Natriumtransports stellt die Isoform Na_x dar.

4.2 Humane Gliome

Intrakranielle Neoplasien können in Tumoren hirneigenen und nicht-hirneigenen Ursprungs unterteilt werden. Einen Überblick über die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Tumoren gibt Tabelle 2.

Die Inzidenz aller intrakraniellen Tumoren liegt bei etwa 7 bis 10 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern und Jahr. Das männliche Geschlecht ist bis auf die Inzidenz der Meningeome etwas häufiger betroffen. Den größten Anteil an hirneigenen Tumoren haben mit Abstand die astrozytären Tumoren.

Tabelle 2: Häufigkeitsverteilung der intrakraniellen Neoplasien, modifiziert nach Kleihues et al. (1997)

Bezeichnung	Anteil an allen intrakraniellen Tumoren
Astrozytome	30 %
Oligodendrogliome	5%
Ependymome	5%
Plexustumoren	<1%
Neuronale Tumoren	<3%
Pinealistumoren	<2%
embryonale Tumoren	5%
meningeale Tumoren	15%
Lymphome	<2%
Metastasen	25%
Sonstige Tumoren	~8%

4.2.1 Klassifikation von Gliomen

Die Gliome werden nach verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt. Im Folgenden wird eine Einteilung in Anlehnung an die WHO-Klassifikation von Hirntumoren nach Kleihues und Cavenee (Kleihues und Cavenee 2000) und modifiziert nach Greenberg (2001) beschrieben.

Gliome werden danach nach histogenetischen Gesichtspunkten unterteilt. Dabei erfolgt die Benennung nach der zu Grunde liegenden Zellart. So unterscheidet die WHO-Klassifikation in Astrozytome, Oligodendrogliome, Mischgliome (Oligoastrozytome) und Ependymome. Die Astrozytome werden weiter nach histologischen Gesichtspunkten in pilozytische, diffuse und anaplastische Astrozytome sowie Glioblastome unterteilt. Glioblastome nehmen eine gewisse Sonderstellung ein: Sie können nicht nur astrozytäre, sondern auch oligodendrogliale, ependymale oder gemischte Abschnitte aufweisen bzw. neben Astrozytomen auch aus Oligodendrogliomen, Ependymomen oder Mischtumoren hervorgegangen sein. Früher bildeten sie daher eine eigene Gruppe (Kleihues und Cavenee 1997), heute werden sie mit den Astrozytomen zusammengefasst (Kleihues und Cavenee 2000).

Die WHO-Klassifizierung kennt vier Grade von Gliomen, die mit WHO-Grad I bis WHO-Grad IV bezeichnet werden. Die verschiedenen Grade stellen unterschiedliche biologische Wertigkeiten der Tumoren dar, die sich auch auf Wachstumsverhalten

und Prognose niederschlagen und die histopathologische Korrelate haben (Tabelle 3). Dabei entspricht ein hochdifferenzierter, langsam wachsender Tumor einem WHO-Grad I mit günstiger Prognose, während WHO-Grad IV einem hochmalignen, aggressiv wachsenden Tumor mit schlechter Prognose entspricht (Kleihues und Cavenee 2000). Tabelle 4 zeigt die durchschnittlichen Lebenserwartungen von Patienten mit Astrozytomen.

Tabelle 3: WHO-Grade, korrespondierende Gliome und histologische Kennzeichen, modifiziert nach Kleihues und Cavenee (2000)

WHO Grad	Tumorbezeichnung	Histopathologische Kennzeichen
I	Pilozytisches Astrozytom	biphasisches Zellbild, gut differenzierte bipolare astrozytäre Zellen, Rosenthal'sche Fasern, Proteindroplets
II	Diffuses Astrozytom	gut differenzierte, astrozytäre Zellen, drei Subtypen
II	Oligodendrogliom, Oligoastrozytom	Honigwaben-Textur, zellreich, astrozytäre Komponente bei Mischtumoren
III	Anaplastisches Astrozytom, anaplastisches Oligodendrogliom, anaplastisches Oligoastrozytom	Honigwaben-Textur meist noch erkennbar, jedoch Kernatypien und Mitosefiguren
IV	Glioblastoma multifome	Nekrosen, Anaplasie, Mitosen, vaskuläre Proliferation („Gefäßglomerula“)

Tabelle 4: Mittlere Überlebenszeit von Patienten mit Astrozytomen in Abhängigkeit vom WHO-Grad (nach Greenberg, 2001)

WHO-Grad	Mittlere Überlebenszeit (Jahre)
I	8-10
II	7-8
III	~2
IV	<1

4.2.2 Astrozytome

Die Gruppe der Astrozytome umfasst verschiedene Tumorentitäten, die sich in bevorzugter Lokalisation, Alter- und Geschlechtsverteilung, Wachstums- und Differenzierungsverhalten unterscheiden. Es existieren zunehmend Hinweise darauf, dass es sich bei den verschiedenen Tumorentitäten um das Ergebnis von aufeinander aufbauenden genetischen Veränderungen handelt, die zu einer sog. Malignisierung des Tumors führen. Die folgenden Daten sind aus Kleihues und Cavenee (2000) und Greenberg (2001) entnommen.

4.2.2.1 Pilozytische Astrozytome

Pilozytische Astrozytome (PA) entsprechen dem WHO-Grad I. Es handelt sich um gut differenzierte und begrenzte, langsam wachsende Tumoren mit generell günstiger Prognose. Sie treten bevorzugt bei Kindern und jungen Erwachsenen ohne eindeutige Geschlechterbevorzugung auf. Nach der zweiten Lebensdekade fällt die Inzidenz deutlich ab. PA entstehen entlang der gesamten Neuraxis, intrakraniell sowohl supra- als auch infratentoriell, selten auch spinal. Histologisch ist das PA durch ein biphasisches Muster charakterisiert. Darunter versteht man das gemeinsame Auftreten von bipolaren, piloiden Zellen mit Rosenthal-Fasern und multipolaren Zellen mit mikrozystischer Struktur und Granularkörperchen (Proteindroplets) (s. Abbildung 2, A). Generell wachsen PA makroskopisch gut abgrenzbar. In den meisten Fällen lässt sich eine relativ scharfe Abgrenzung mikroskopisch bestätigen, breitere Infiltrationszonen kommen jedoch mitunter vor. PA tendieren nicht zu einem destruierenden, aggressiven Wachstum.

4.2.2.2 Diffuse Astrozytome

Diffuse Astrozytome (DA) sind biologisch niedriggradige Astrozytome vom WHO-Grad II mit hochdifferenzierten Tumorzellen. Im Gegensatz zu den PA ist bei den DA ein diffus-infiltrierendes Wachstum in die umgebenden Gehirnstrukturen charakteristisch. DA treten bevorzugt bei jungen Erwachsenen zwischen 20 und 45 Jahren auf. DA wachsen bevorzugt in supratentoriellen Lokalisationen, meist im Frontal- und Temporallappen. Makroskopisch zeigen DA ein infiltrierendes Wachstumsverhalten, welches zu einer Verplumpung, Verdrängung und Verziehung von anatomischen Strukturen führt. Histopathologisch zeigen DA ein mäßig zellreiches Bild mit gelegentlich auftretenden Kernatypien und generell gut differenzierten fibrillären oder gemistozytischen neoplastischen Astrozyten (s. Abbildung 2, B). Nach dem vorherr-

schenden Zelltyp können drei große Subtypen unterschieden werden, in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit das fibrilläre Astrozytom, das gemistozytische Astrozytom und das protoplasmatische Astrozytom. DA, insbesondere gemistozytenreiche, zeigen eine Tendenz zur Malignisierung, d.h. zum Progress zu einem höheren WHO-Grad. Die mittlere Überlebenszeit für DA liegt bei etwa 6 bis 8 Jahren mit großen individuellen Schwankungen. Limitierend ist der schließliche Progress zum Glioblastom, ein Prozess, der im Mittel 4 bis 5 Jahre andauert.

4.2.2.3 Anaplastische Astrozytome

Anaplastische Astrozytome (AA) sind maligne Gliome vom WHO-Grad III, die sich durch eine Anaplasie und gesteigerte Proliferationstendenz auszeichnen. AA entstehen in den meisten Fällen aus niedriggradigen Gliomen und haben selbst die Tendenz, zum Glioblastom fortzuschreiten. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt mit 41 Jahren zwischen dem der DA (34 Jahre) und dem der Glioblastome (53 Jahre). Männer sind im Verhältnis von 1,8:1 häufiger betroffen als Frauen. AA treten hauptsächlich in den Großhirnhemisphären auf, wo sie ähnlich wie die DA zu einer Auftreibung von anatomischen Strukturen führen können. Eine eindeutige Tumorgrenze lässt sich durch das invasive Wachstum makro- und mikroskopisch nicht sicher festlegen. Histopathologisch zeigt sich ein zellreicher Tumor mit Kernatypien, zahlreichen Mitosefiguren und Nekrose. Die Progression zum Glioblastom beansprucht im Mittel etwa zwei Jahre. Ein günstiger Faktor ist das Vorhandensein eines oligodendroglialen Anteils im Tumor.

4.2.2.4 Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme (GBM) stellt den bösartigsten und mit etwa 15% aller intrakraniellen Neoplasien auch den häufigsten primären Hirntumor des Menschen dar. Sein Anteil an allen Astrozytomen liegt bei etwa 60%. Das GBM ist definitionsgemäß vom WHO-Grad IV. Es existieren zwei von einander verschiedene GBM-Varianten, die als „primär“ bzw. „*de novo*“ und als „sekundär“ bezeichnet werden. *De novo* GBM treten bei durchschnittlich älteren (Mittel 55 Jahre) Patienten auf und präsentieren sich mit einer nur sehr kurzen Anamnese von wenigen Monaten. Sie entstehen nicht über eine Tumorprogression aus niedergradigen Gliomen, wie es bei den sogenannten „sekundären“ GBM der Fall ist. Diese treten bei durchschnittlich jüngeren (Mittel <45 Jahre) Patienten als Folge der Tumorprogression von niedergradigen zu höhergradigen Gliomen auf. GBM treten bevorzugt supratentoriell

auf. Sie imponieren makroskopisch durch eine schlechte Abgrenzung zum Gesunden und ein buntes Schnittbild. Dieses resultiert aus der gräulichen Tumormasse, gelblicher Tumornekrose und stippchenförmigen oder auch größeren Einblutungen. GBM neigen zu einer raschen und weitreichenden Ausbreitung entlang vorbestehender Bahnen im ZNS. Histopathologisch ist das GBM ein anaplastischer, zellreicher Tumor aus schlecht differenzierten, pleomorphen astrozytären Tumorzellen mit zahlreichen Kernatypien und Mitosefiguren. Diagnosekriterien sind überdies glomerulaähnliche mikrovaskuläre Proliferationen und Tumorzellnekrosen, welche häufig strichförmig sind und umgebende Kernpallisaden aufweisen (s. Abbildung 2, E und F). Die intratumoröse Heterogenität kann sehr ausgeprägt sein. Die Prognose ist sehr schlecht (s. Tabelle 4).

4.2.3 Oligodendrogliale Tumoren

Unter oligodendroglialen Tumoren werden Oligodendrogliome (OD) und anaplastische Oligodendrogliome (aOD) zusammengefasst. Die Bezeichnung geht auf die morphologische Ähnlichkeit der Tumorzellen mit reifen Oligodendrozyten zurück. Eine tatsächliche Abstammung der Tumoren von diesen Zellen ist nicht bewiesen. Oligodendrogliome entsprechen einem WHO-Grad II. Es handelt sich um gut differenzierte, diffus infiltrierend wachsende Tumoren des Erwachsenenalters (mittleres Alter 43 Jahre). Sie wachsen bevorzugt in den Großhirnhemisphären, und hier zu über 50 % im Frontallappen und zeichnen sich durch die häufig auftretenden symptomatischen Epilepsien aus. Makroskopisch finden sich gut zu erkennende, graue Tumormassen. Histopathologisch zeigt sich ein mäßig zellreicher Tumor mit homogenen Zellen, deren klares Zytoplasma zur Bezeichnung der „Honigwabens“-Struktur geführt hat.

Treten zahlreiche Mitosen, mikrovaskuläre Proliferate und Tumorzellnekrosen auf, handelt es sich bereits um ein anaplastisches Oligodendrogliom vom WHO-Grad III.

4.2.4 Oligoastrozytome

Oligoastrozytome (OA) sind sogenannte Mischgliome, die aus zwei verschiedenen neoplastischen Zelltypen bestehen. Diese entsprechen jeweils Tumorzellen von diffusen Astrozytomen bzw. Oligodendrogliomen. OA entsprechen dem WHO-Grad II. Die Inzidenz dieser Tumoren wird sehr unterschiedlich angegeben, sie reicht je nach Serie von unter 2% aller intrakraniellen niedriggradigen Gliome bis zu 15%. Die hauptsächlich supratentoriell wachsenden Tumore unterscheiden sich makrosko-

pisch kaum von anderen niedriggradigen Gliomen. Histopathologisch ist die Identifizierung von Anteilen beider namensgebenden Neoplasien zur Diagnosestellung nötig. Über die Histogenese herrscht Unklarheit.

Die maligne Form wird als anaplastisches Oligoastrozytom (aOA) bezeichnet und entspricht dem WHO-Grad III. Sie zeichnen sich histologisch durch Zellreichtum, Kernatypien, pleomorphe Zellen und hohe mitotische Aktivität aus, die sowohl im astrozytären, als auch dem oligodendroglialen Tumoranteil auftreten können (s. Abbildung 2, C und D).

4.3 Ionenkanäle in Tumoren

Die Beziehung zwischen Tumorphänomenen und Ionenkanalexpression ist besonders intensiv für die Gruppe der Kaliumkanäle untersucht worden. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen Kaliumkanalexpression und Proliferationstendenz der untersuchten Tumorentität nachgewiesen werden (Wang *et al.* 2002). Untersuchungen liegen unter anderem zum kleinzelligen Bronchialkarzinom (Pancrazio *et al.* 1989), Leberzellkarzinom (Zhou *et al.* 2003), Kolonkarzinom (Abdul und Hoosein 2002a), Prostatakarzinom (Fraser *et al.* 2000) und zu Astrozytomen vor (Basrai *et al.* 2002). In den meisten Fällen führte eine Aktivierung von Kaliumkanälen zu einer Proliferation, bzw. eine Blockade von Kaliumkanälen zu einer Proliferationshemmung. Kraft *et al.* (2003) konnten eine Hemmung der Tumorzellmobilität in Gliomen nach Kaliumkanalaktivierung feststellen. Für Gliome konnte eine Korrelation zwischen biologischer Wertigkeit und Kaliumkanalexpression gezeigt werden (Preussat *et al.* 2003). Der funktionelle Zusammenhang zwischen Kaliumkanalexpression und Proliferation und Motilität ist jedoch nicht völlig geklärt. Möglicherweise beeinflusst das Membranpotential diese Zelleigenschaften. Es daher lag nahe, auch nach dem Einfluss anderer Ionenkanäle auf diese Tumorphänomene zu fragen. Untersuchungen an Prostatakarzinomzelllinien konnten eine Modulation der Metastasierungsneigung, der Motilität und der sekretorischen Aktivität durch spannungssensitive Natriumkanäle nachweisen (Abdul und Hoosein 2002b; Djamgoz *et al.* 2001; Fraser *et al.* 1999; Fraser *et al.* 2003; Grimes und Djamgoz 1998; Laniado *et al.* 1997; Mycielska *et al.* 2003; Smith *et al.* 1998b). Diss *et al.* (2001) zeigten, dass die Isoform $\text{Na}_v1.7$ wahrscheinlich mit hierfür verantwortlich ist. Der Zusammenhang zwischen spannungssensitiven Natriumkanälen und Tumorgenese bzw. Proliferation wird seit längerem diskutiert (Binggeli und Weinstein 1986).

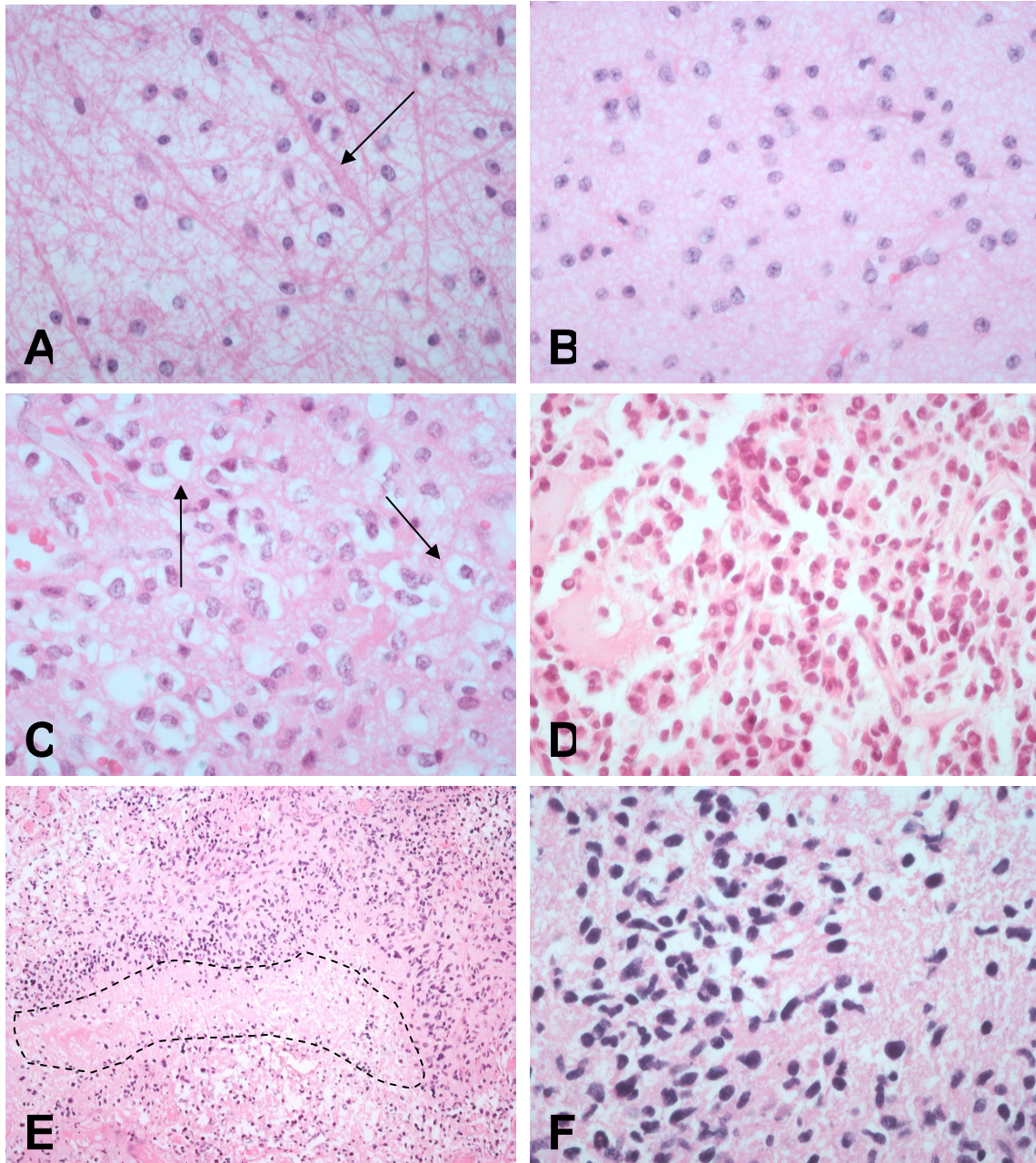


Abbildung 2: Charakteristische HE-Histologie der untersuchten Gliome

A: Pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I (Tumor 1, vgl. Tabelle 5) mit geringer Zelldichte und piloiden Zellen. Der Pfeil kennzeichnet eine Rosenthalfaser. B: Diffuses Astrozytom WHO-Grad II (Tumor 4) mit moderater Zelldichte und reifen astrozytären Zellen. C, D: Oligoastrozytom WHO-Grad III (Tumor 9), bei C reiferes Zellbild mit für Oligodendrogliome typischen Honigwaben (Pfeile: zwei Beispiele), bei D anaplastischer, zellreicherer Anteil. E, F: Glioblastom WHO-Grad IV (Tumor 15), Übersicht bei E mit strichförmiger Nekrose (gestrichelte Linie), stärkere Vergrößerung bei F mit unreifen, polymorphen Tumorzellen. A-D, F: x350, E: x87,5

4.3.1.1 Spannungssensitive Natriumkanäle in Gliomen

Bisher wenig beleuchtet ist die Rolle von spannungssensitiven Natriumkanälen in Gliomen. Obwohl bekannt war, dass Astrozyten, die putativen Vorläuferzellen von Gliomen, spannungssensitive Natriumkanäle exprimieren (Black et al. 1994a; Black

et al. 1994b; Oh et al. 1994; Schaller et al. 1995), war es überraschend, dass in einer großen Anzahl von Gliomzellen spannungssensitive Natriumkanäle in einer Dichte auftreten, die für das Erzeugen von Aktionspotentialen zumindest *in vitro* ausreichend hoch ist (Bordey und Sontheimer 1998; Labrakakis et al. 1997; Patt et al. 1996). Welche Funktion diese Kanäle haben, ist unklar. Möglich ist beispielweise neben den o.g. Funktionen in nicht-neoplastischer Glia eine Rolle in der Entstehung der Tumorepilepsie (Patt *et al.* 2000). Fraglich ist, ob Gliomzellen *in vivo* zur Aktionspotentialgenerierung in der Lage sind. Bisher unbekannt ist auch, welche der Isoformen in Gliomzellen exprimiert werden. Möglicherweise existieren Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Tumorentitäten im Hinblick auf die von ihnen exprimierten Kanalisoformen. Diese Unterschiede könnten unter Umständen zu einer genaueren Klassifizierung und Charakterisierung der Gliome herangezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wird dieser Frage nachgegangen.

5 Ziele der Arbeit

- Die vorliegende Arbeit soll mittels molekularbiologischer Methoden spannungssensitive Natriumkanäle auf mRNA-Ebene in Operationspräparaten von humanen Gliomen unterschiedlicher Histologie und biologischer Wertigkeit nachweisen.
- Durch Anwendung von spezifischen Oligonukleotidprimern soll versucht werden, eine Charakterisierung der Gliome anhand der nachweisbaren Kanalisformen vorzunehmen.
- Unterschiede zwischen Gliomen unterschiedlicher Histologie und biologischer Wertigkeit sollen anhand der nachweisbaren spannungssensitiven Natriumkanäle herausgearbeitet werden.
- Die Ergebnisse sollen mit den vorhandenen Daten der Literatur verglichen werden, um Hypothesen über die Rolle von spannungssensitiven Natriumkanälen in Gliomen zu erstellen.

6 Material und Methoden

6.1 Gewebeproben und Materialien

Im Folgenden werden die untersuchten Gewebeproben hinsichtlich ihrer klinisch-pathologischen Daten beschrieben. Weiterhin werden die verwendeten Chemikalien, Medien, Puffer, Lösungen, Primer und Geräte mit Angaben zur Herstellerfirma und Herkunftsland aufgelistet.

6.1.1 Gewebeproben

Die untersuchten Gewebeproben stammten aus operativ im Rahmen von neurochirurgischen Eingriffen gewonnenem Material. Die Patienten wurden in den Neurochirurgischen Kliniken der Friedrich-Schiller-Universität Jena, des Helios-Klinikums Erfurt und des Krankenhauses Bergmannstrost in Halle operiert. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Friedrich Schiller Universität Jena geprüft und freigegeben (No. 0198-02/99). Das operativ gewonnene Material wurde möglichst unmittelbar nach der Resektion in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Isolierung bei minus 80°C gelagert. Repräsentative H/E gefärbte Gefrierschnitte wurden gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation von Hirntumoren (Kleihues und Cavenee, Kleihues und Cavenee 2000) durch Prof. Dr. Patt beurteilt. Der Anteil neoplastischer Zellen in den Tumorproben betrug mindestens 80 %. Die als Positivkontrolle dienende tumorfreie Gewebeprobe (Biopsie; tumorfreies Randgebiet aus einer Gliomoperation, histologisch bestätigt) enthielt sowohl Neurone als auch gliale Zellen. Als weitere nicht-neoplastisch veränderte Gewebeproben wurde Gewebe aus dem Temporallappen eines Kindes mit chronischer Epilepsie (gewonnen im Rahmen eines epilepsiechirurgischen Eingriffs) und aus dem Frontallappen eines Patienten nach Schädel-Hirn-Trauma (gewonnen im Rahmen der Versorgung einer traumatischen intrakraniellen Blutung) untersucht. Die Gewebeproben (cDNAs freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. Reifenberger, Institut für Neuropathologie, Universität Düsseldorf) enthielten ebenfalls sowohl Neurone als auch gliale Zellen, und zeigten Zeichen einer Astrogliose.

Die Tumoren verteilten sich wie folgt auf die verschiedenen Tumorentitäten (s. auch Abschnitt 4.2.1 und Tabellen 3 und 4): drei pilozytische Astrozytome (WHO-Grad I), vier diffuse Astrozytome (WHO-Grad II, eine der Proben entstammte einem Tumor-

rezidiv), fünf Mischgliome (ein Oligoastrozytom WHO-Grad II, vier anaplastische Oligoastrozytome WHO-Grad III) und fünf Glioblastome (WHO-Grad IV). Vier Tumorpatienten waren weiblich, dreizehn männlich. Das mittlere Alter zum Operationszeitpunkt betrug 40,2 Jahre. Tabelle 5 listet die klinisch-pathologischen Daten der Gewebeproben auf.

Tabelle 5: Klinisch-pathologische Daten der untersuchten Gewebeproben

Probe	Diagnose	Patientenalter (Jahre)	Patientengeschlecht
1	PA I	10	M
2	PA I	11	W
3	PA I	30	M
4	A II	38	M
5	A II	31	M
6	A II	21	W
7	A II	37	M
8	OA II	59	M
9	aOA III	31	M
10	aOA III	10	M
11	aOA III	45	W
12	aOA III	59	M
13	GBM IV	78	W
14	GBM IV	73	M
15	GBM IV	39	M
16	GBM IV	39	M
17	GBM IV	74	M
GG	Biopsiegewebe; nicht neoplastisch	65	M
IZ	Tumordinfiltrationszone der Tumor 13	78	W
E	Temporaler Epileptogener Fokus	Kind	M
T	Frontallappen, Z. n. Trauma	Erwachsen	M
Mu	Gepoolter Skelettmuskel, 3 Patienten	Erwachsen	M

PA Pilozytisches Astrozytom; DA Diffuses Astrozytom; OA Oligoastrozytom; aOA anaplastisches Oligoastrozytom; GBM Glioblastom; I-IV WHO-Malignitätsgrade; GG gesundes Gehirngewebe (Kontrollgewebe); IZ Infiltrationszone; E Epilepsie; T Trauma; Mu Skelettmuskulatur (Kontrollgewebe); W weiblich; M männlich; Z.n. Zustand nach

Das als gesundes Gehirngewebe diagnostizierte Probenmaterial wurde als positive Kontrolle für die Isoformen der spannungsensitiven Natriumkanäle des ZNS ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, und $Na_v1.6$) und Na_x verwendet. Als Positivkontrolle für die

Isoform Na_v1.4 diene gepooltes Material aus drei als gesund diagnostizierten Muskelbiopaten.

6.1.2 Chemikalien und Reagenzien (Tabelle 6)

Bezeichnung	Konzentration / Zusammensetzung	Hersteller
Agar	<i>bacteriological grade</i>	ICN Biomedicals, Eschwege
Agarose		SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ampicillin	50 mg / ml	SERVA, Heidelberg
β- Mercaptoethanol	> 98% rein	SIGMA, München
Borsäure	kristallin reinst	MERCK, Darmstadt
Chill-Out Wachs		MJ Research, Inc., Waltham, USA
Cäsiumchlorid	99,9 % rein	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethylformamid	research grade	SERVA, Heidelberg
pUC19 DNA/ <i>MspI</i> (<i>HpaII</i>) Marker	0.1 µg/µl	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
DTT Dithiothreitol	10 mM	Promega, Mannheim
dATP	100 pM	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
dGTP	100 pM	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
dCTP	100 pM	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
dTTP	100 pM	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
EDTA	0,5 M	SERVA, Heidelberg
Ethanol absolute	99,9% rein	J.T. BAKER, Phillipsburg, USA
Ethidium-Bromid	5 mg/ml	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Guanidiniumrhodanid	99% rein	MERCK, Darmstadt
Wasser als Aqua ad iniectabilia		Braun, Melsungen
IPTG	100 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid	>99% rein	SERVA, Heidelberg
Gel-Ladepuffer	6x (0.09% Bromophenolblau, 0.09% Xylencyanol FF, 60% Glycerol, 60mM EDTA)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Magnesiumchloridhexahydrate	>98 % rein	SERVA, Heidelberg
Natriumazetat	>99% rein	SERVA, Heidelberg
Natriumchlorid	>99% rein	SERVA, Heidelberg
Natriumhydroxid	>98% rein	MERCK, Darmstadt
Peptone	tryptic	SERVA, Heidelberg

SDS	20%	SERVA, Heidelberg
Tris	ultra pure	ICN Biomedicals, Eschwege
X-Gal	ultra pure	Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	in Pulverform	ICN Biomedicals, Eschwege

6.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Sambrook et al. (1989) hergestellt, Lösungen zur RNA Isolierung wurden jeweils frisch vor Gebrauch angesetzt.

- 100 ml 5,7 molare Cäsiumchloridlösung zur Gradientenzentrifugation enthielten in 50 ml H₂O bidest 95,97 g Cäsiumchlorid, 0,83 ml 3 M Natriumacetat (pH 6) und H₂O auf 100 ml. Die Lösung wurde abschließend steril abfiltriert.
- 200 ml 4 molarer Guanidiniumrhodanid-Homogenisationspuffer enthielten in 150 ml H₂O bidest 94,53 g Guanidiniumrhodanid, 1,67 ml 3 M Natriumacetat (pH 6) und wurden mit H₂O auf ein Endvolumen von 200 ml aufgefüllt. Direkt vor Gebrauch wurden 1,67 ml β-Mercaptoethanol zugesetzt.
- 1 Liter TBE-Puffer wurde als 10-fach konzentrierte Stocklösung hergestellt und enthielt 54 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure sowie 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Die Lösung wurde mit H₂O auf 1 l aufgefüllt.
- 1 Liter SOC-Flüssigmedium enthielt 20 g Pepton, 5 g Hefe-Extrakt (*yeast extract*) und 0,5 g NaCl. Dazu wurden 10 ml einer 250 mM KCl-Lösung gegeben. Der pH wurde mit 5 N NaOH auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde mit H₂O auf 1l aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlung auf 60°C wurden 5 ml 2 M MgCl₂ und 20 ml 1 M Glucose zugefügt.
- 1 Liter LB Flüssigmedium enthielt in 950ml H₂O 10g Pepton, 5g Hefe-Extrakt (*yeast extract*) und 10g NaCl, der pH wurde mittels 5 N NaOH auf 7,0 eingestellt.
- LB Agar: Zur Herstellung von LB Agar wurde 1l LB Medium (s. dort) vor dem Autoklavieren mit 15 g Agar versetzt.
- LB/IPTG/X-Gal Agar-Platten: LB Agar wurde im Wasserbad auf 60°C erwärmt. Pro 1 l Agar wurden 1 ml Ampicillin (50 mg/ml), 2 ml IPTG (100 mM) und 2 ml X-Gal (2% in Dimethylformamid) zugegeben. Ca. 30ml Agar wurden in je eine Petrischale gegossen, bei Raumtemperatur zum Erstarren gelassen und bis zum Gebrauch bei +4°C unter Lichtschutz gelagert.

6.1.4 Oligonukleotidprimer

Die lyophilisierten Oligonukleotidprimer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) in HPSF-Aufreinigung bezogen. Nach Herstellerangaben wurden durch Lösen in Wasser Primerkonzentrationen von 100 pmol/μl hergestellt. Frisch angesetzte Aliquots mit einer Konzentration von 10 pmol/μl dienten als Arbeitslösung. Für die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde ein am 5'-Ende mit IRD800 markiertes Oligonukleotid verwendet. Die Primersequenzen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Primersequenzen und Reaktionsbedingungen PCR Experimente

Primer	Sequenz		Bp	AT (°C)	EZ (Sek.)	[MgCl ₂] (mmol)
	Sense	Antisense				
GAPDH	5'-CGG GAA GCT TGT GAT CAA TGG-3'	5'-GGC AGT GAT GGC ATG GAC TG-3'	357	58	22	4
Na_v1.1	5'- CAG ATG ACC AGA GTG AAT ATG TGA C -3'	5'-GCT CGG CAA GAA ACA TAC CTA CAA TG- 3'	186	58	11	3.5
Na_v1.2	5'-CCA GAG GGC TTA CAG ACG CTA CCT CTT G- 3'	5'-GGG TGT TCC ATC ACA TTC TTT GCC- 3'	97	64	6	2.5
Na_v1.3	5'-CTT GCT GCT ACT GAT GAT GAC A- 3'	5'-TCT TCT AGT TCT GAC TCA CTG CTG- 3'	410	59	24	2.5
Na_v1.4	5'-TAG AGC TAG GCC TGG CCA ACG TAC- 3'	5'-CCA CAA GAT TGC CGA TGA CCA TGA C- 3'	414	64	24	2.5
Na_v1.6	5'-TGT TGT GTG GCC CAT AAA CTT C- 3'	5'-CGA AAT AAT GCC AAG AAG GCC C- 3'	230	60	14	3.5
Na_x	5'-CTA TCA AGG TTT TGG TAC ATC CCT T- 3'	5'-CTG CTT CAA GCA GTG GAT CAG- 3'	377	55	22	1.5
IRD800- M13_rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'					

GAPDH: Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase; Na_v1.1-Na_x: Isoformen der Natriumkanäle; Bp: Größe des amplifizierten Fragments in Basenpaaren; AT: Annealing Temperatur; EZ: Elongationszeit; [MgCl₂]: Magnesiumchloridkonzentration im Reaktionsansatz; A: Adenosin; C Cytosin; G Guanosin; T Thymidin

6.1.5 Kits und Enzyme (Tabelle 8)

Bezeichnung	Hersteller
Plasmid Miniprep Kit	Biometra, Göttingen
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Amersham Biosciences, Freiburg
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Organge, CA, U.S.A.

6.1.6 Geräte (Tabelle 9)

Bezeichnung	Hersteller
Gelelektrophoresekammer Agargel Maxi	Biometra, Göttingen
DNA-Sequencer Long ReadIR 4200	LI-COR, Bad Homburg
Kameratubus H6-EL (GH10) 0,8x	Polaroid, Offenbach
Polaroid DS-34 Gelkamera	Polaroid, Offenbach
Polaroid Type 667 film (ISO 3000)	Polaroid, Offenbach
Scanner CanoScan LiDE 20	Canon, Krefeld
Spektrophotometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
TRIO Thermoblock	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge Optima™ XL-100K	Beckmann Coulter, Krefeld
UV- Leuchttisch TFX 35 MC	Vilbert Lourmat, Marme la Vallée, Frankreich

6.1.7 Software (Tabelle 10)

Bezeichnung	Hersteller
<i>ImageJ</i> Version 1.22	Wayne Rasband (http://rsb.info.nih.gov/ij/)
Base ImageIR™ Version 3.0	LI-COR, Bad Homburg
SPSS Version 12	SPSS Inc., Chicago, U.S.A.

6.2 Methode

Mittels Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation gewonnene Gesamt-RNA wurde durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte eine Standardisierung der im Weiteren einzusetzenden cDNA mit Hilfe von GAPDH-spezifischen Primerpaaren. Die Expression von spannungssensitiven Natriumkanälen in den Gewebeproben wurde durch PCR-Experimente mit spezifischen Primer-

paaren untersucht. Nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese erfolgte eine densitometrische Messung der erhaltenen PCR-Produkte.

6.2.1 Gesamt-RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA der Gewebeproben wurde durch Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation nach der Methode von MacDonald et. al (1987) und Jacobson (1987) isoliert. Das Prinzip der Methode beruht auf dem Aufbau eines Cäsiumchloridgradienten in einer Lösung, der durch Zentrifugation zustande kommt. Die verschiedenen Zellbestandteile reichern sich dabei in Zonen unterschiedlicher Cäsiumchloridkonzentrationen innerhalb der Lösung an. Dadurch ist eine Auftrennung des Homogenisats in seine Bestandteile möglich. RNA lagert sich hierbei im Bereich der höchsten Cäsiumchloridkonzentration ab, die sich durch die Zentrifugalkräfte am Grund des Zentrifugenröhrchens findet. DNA und andere Zellbestandteile finden sich im niedriger konzentrierten Überstand. Reagenzien wurden bei Arbeiten mit RNA zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNase-Aktivität jeweils frisch angesetzt und Arbeiten stets mit Handschuhen und soweit möglich auf Eis durchgeführt und getrennt von den sonstigen Reagenzien aufbewahrt.

Die tiefgefrorenen Gewebeproben wurden in einem autoklavierten Glashomogenisator unter Zugabe von 10 ml 4 molarem Guanidiniumrhodanid-Homogenisationspuffer lysiert und homogenisiert. Pro Gewebeprobe wurde ein Zentrifugenröhrchen (Modell Beckman-SW 41) mit 4 ml 5,7 molarer Cäsiumchlorid-Lösung gefüllt. Darüber wurde das Gewebelysat geschichtet. Um ein Kollabieren der Lösung während der Zentrifugation zu verhindern, wurden die Röhrchen jeweils bis 2 mm unterhalb des Rands gefüllt und anschließend austariert, um Unwuchten zu vermeiden. Bei Raumtemperatur wurden die Proben 16 Stunden mit 32.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das RNA-Pellet wurde in 100 µl 0,2% SDS gelöst und für 5 Minuten auf 65°C erhitzt. Abschließend wurde die RNA gefällt. Dies erfolgte durch Zugabe von 10 µl (1/10 des Ausgangsvolumens) 3M Natriumacetat (pH 6) und 250 µl (2,5-fache des Ausgangsvolumens) 96% Ethanol. Nach gründlichem Mischen wurde die Probe über Nacht bei minus 20°C gelagert und dann für 15 Minuten mit 13.000 Upm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Anschließend erfolgte eine Waschung der Pellets mit 100 µl 70% Ethanol. Nach weiteren 3 Minuten Zentrifugation mit 13.000 Upm wurde der Überstand abgenommen und die Pellets luftgetrocknet. Die

Pellets wurden in 50 µl H₂O gelöst und bei minus 80°C gelagert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte in einer 100-fachen Verdünnung spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur Überprüfung der Reinheit der RNA wurde die Extinktion auch bei 280 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge absorbieren Proteine. Der Quotient $E_{260/280}$ der gemessenen Extinktionen lag zwischen 1,8 und 2,0 und bestätigte die Reinheit der RNA.

6.2.2 Reverse Transkription

Das Prinzip der Reversen Transkription beruht auf der enzymatischen Aktivität von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen. Diese Enzyme sind in der Lage, zu einem RNA-Strang einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren, wobei der RNA-Strang als Matrize dient. Die so gewonnene DNA wird als cDNA (für copyDNA) bezeichnet und kann selbst als Matrize für PCR-Experimente verwendet werden.

1,5 µg Gesamt-RNA, jeweils 200 pmol dTTP, dATP, dCTP und dGTP und 1 nm Oligo-(dT)₁₅ als Primer wurden mit Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 43 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde im Wasserbad für 3 Minuten auf 80°C erhitzt, und 3 Minuten auf Eis gekühlt. Dieser Zyklus wurde drei Mal wiederholt. Anschließend wurden 12 µl Reaktionspuffer (AMV Reverse Transcriptase 5x Reaction Buffer, Promega) und 2 µl DTT zugegeben. Die Transkription wurde nach drei Minuten bei Raumtemperatur durch Zugabe von 30 Units Reverser Transkriptase (AMV, Promega) und Inkubation bei Raumtemperatur für 8 Minuten gestartet. Der Reaktionsansatz wurde innerhalb von 10 Minuten in Schritten von 1°C im Thermoblock von 35°C auf 42°C erwärmt. Nach weiteren 50 Minuten bei 42°C wurde der Ansatz für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und im Anschluss sofort auf Eis abgekühlt und abschließend wie oben für die RNA-Fällung beschrieben gefällt.

6.2.3 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Entwickelt von Mullis et al. (1986) bietet die PCR die Möglichkeit, DNA-Sequenzen mittels enzymatischer Vermehrung nahezu beliebig häufig zu kopieren. Dabei binden spezifische Primer die komplementären Basen der DNA-Stränge und dienen so als Startpunkt für die Synthese der jeweils gegenläufigen Matrizenstränge. Es besteht die Möglichkeit, aus der Menge des entstandenen Produkts auf die Ausgangsmenge rückzuschließen. Je mehr Ausgangsmaterial vorhanden war, desto mehr Produkt

kann durch die PCR erzeugt werden. Theoretisch ist eine einzige Kopie der DNA-Matrize ausreichend, um eine nahezu beliebige Anzahl an Kopien herzustellen. Einen Überblick über den Ablauf der PCR gibt Abbildung 3.

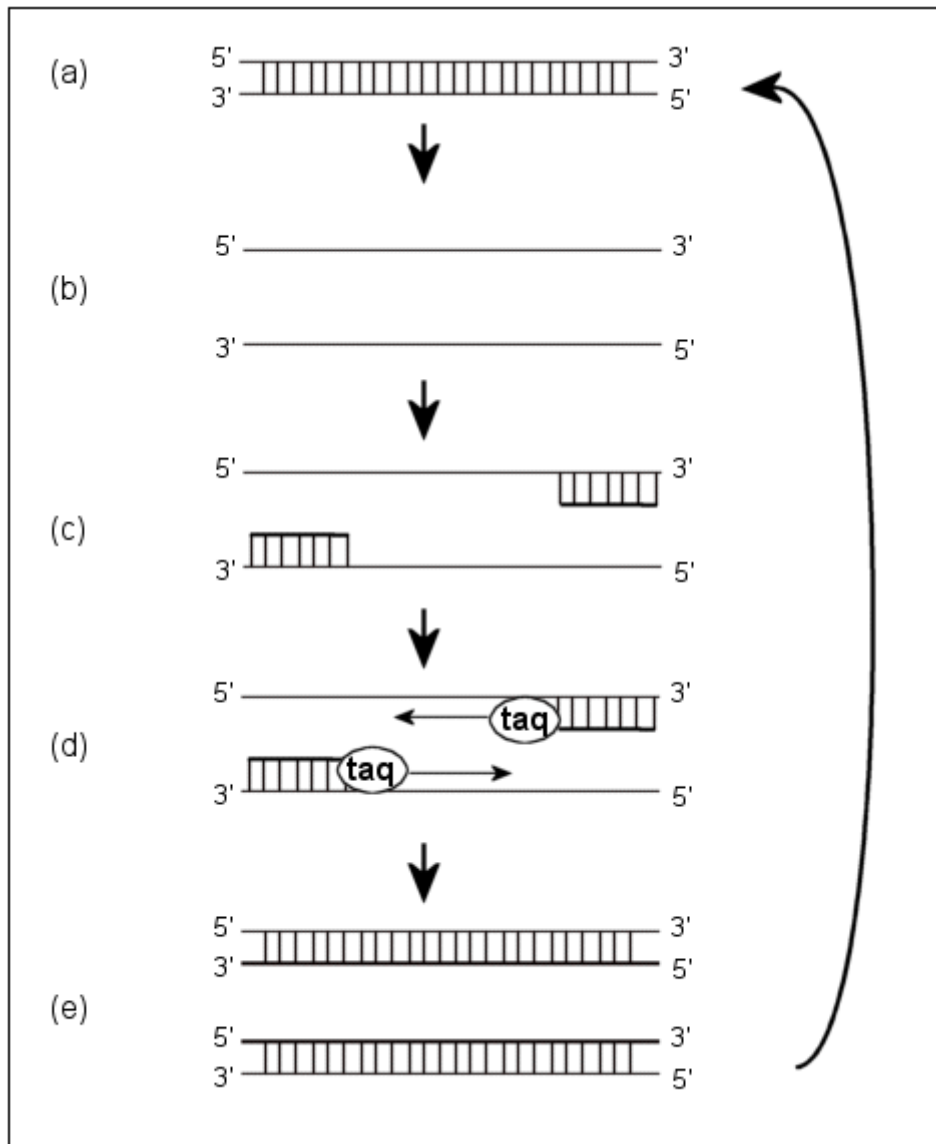


Abbildung 3: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion; (a) doppelsträngige DNA wird bei 94°C zu einzelsträngiger DNA (b) denaturiert, es binden sich die spezifischen Primerpaare (c) bei der jeweils gewählten Annealing-Temperatur. Im folgenden Schritt (d) synthetisiert eine DNA-abhängige DNA-Polymerase (taq) den jeweils komplementären Strang bei 72°C, so dass am Ende eines Zyklus zwei Kopien der Ausgangs-DNA vorliegen (e). Dieser Vorgang wird zyklisch wiederholt.

6.2.3.1 Äquilibration über GAPDH-Standard

Zur Vergleichbarkeit der Resultate war sicherzustellen, dass jeweils gleiche Mengen cDNA als Matrize für die PCR in den Reaktionsansätzen vorhanden war. Zu diesem Zweck wurde eine Äquilibration der einzusetzenden cDNA-Volumina anhand eines GAPDH-Standards durchgeführt. Für die Äquilibrations-Experimente wurden

GAPDH-spezifische Primer nach den Vorgaben von Prof. Dr. Wöfl, vormals IMB Jena, jetzt Universität Heidelberg, verwendet. Wir definierten einen Standard, dessen Signal dem aus 1 µl Kontrollgewebe (nicht-neoplastisches Zerebrum) resultierenden Signal entsprach. Es wurden mehrere Ansätze mit unterschiedlichen Mengen cDNA der Tumorgewebeproben untersucht und in die resultierende Bande mit der Bande des Standards verglichen. Die Reaktionsbedingungen und die Primersequenzen wurden ebenfalls von Prof. Dr. Wöfl, IMB Jena, übernommen und finden sich in Tabelle 6. Es wurden jeweils 25 Zyklen durchgeführt, jeweils beginnend mit einer 40-sekündigen Denaturierung bei 94°C, einer 40-sekündigen Annealing-Phase bei und einer Elongationsphase bei 72°C. Diejenige Menge an cDNA, die eine dem Standard entsprechend intensive Bande erbrachte, wurde für die weiteren Experimente verwendet. Der Intensitätsvergleich erfolgte densitometrisch.

6.2.3.2 Primerdesign

Es wurden Oligonukleotidsequenzen als Primer gewählt, welche die zu untersuchenden Isoformen spezifisch erkennen können. Zur Ermittlung der jeweiligen Sequenzen wurde eine Recherche über die online Datenbank- und Softwaredienste des National Center for Biology Information (NCBI) durchgeführt.

Bei der Wahl der Primersequenzen wurde versucht, folgenden Kriterien zu erfüllen: (1) spezifisch für die zu amplifizierende Region sein. (2) Die Annealing-Temperatur sollte zwischen 55°C und 60°C liegen. (3) Die Primer sollten möglichst keine Palindrome enthalten, um Sekundärstrukturen zu vermeiden. (4) Das 5'-Ende eines Primers sollte mit einem G oder einem C enden (GC-clamp), um hier eine besonders starke Bindung an die Matrize zu erreichen. (5) Die Primerpaare sollten in ihrer Annealing-Temperatur um nicht mehr als 2 °C auseinanderliegen und (6) keine komplementären 5'-Enden besitzen, um die Bildung von Primerdimeren während der PCR zu minimieren. Die einzelnen Primersequenzen und die Größe des amplifizierten Fragments sind in Tabelle 7 aufgelistet.

6.2.3.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Da die verschiedenen Primer bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen ihre optimale Effizienz entwickeln konnten, wurden verschiedene Versuchsreihen zur Bestimmung der jeweils optimalen Bedingungen für jedes Primerpaar durchgeführt. Als Matrize dienten jeweils gleiche Mengen der Positivkontrollen der jeweiligen Kanalisoformen (Gehirngewebe für die Isoformen Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3, Na_v1.6 und Na_x,

sowie Muskelgewebe für die Isoform Na_v1.4) sowie ein 1:10 verdünnter Ansatz. Die Reaktionsprotokolle wurden systematisch hinsichtlich Annealingtemperatur und Magnesiumchloridkonzentrationen variiert. Die Reaktionsansätze enthielten 1,5 mmol, 2,5 mmol oder 3,5 mmol MgCl₂. Ausgehend von der optimalen Annealingtemperatur (nach Angaben des Herstellers, MWG-Biotech AG, Ebersberg) wurden je Ansatz zusätzlich zu dieser Temperatur PCR-Experimente mit um 2 °C höheren und 2 °C niedrigeren Temperaturen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und hinsichtlich Intensität, Reinheit und Größe der resultierenden Banden bewertet. Diejenigen Reaktionsbedingungen kamen für die weiteren Experimente zur Anwendung, die (1) ein Produkt der erwarteten Größe amplifizierten, (2) nur eine Bande amplifizierten und (3) bezogen auf die Kriterien (1) und (2) die densitometrisch gemessen signalintensivste Bande aufwiesen. Die so ermittelten Reaktionsbedingungen zeigt Tabelle 7.

6.2.3.4 Isoform-spezifische PCR

Jeder Reaktionsansatz enthielt jeweils 30 pmol des Sense- und Antisense-Primers, 5 µl 10x-PCR-Puffer, jeweils 100 pmol der Desoxynukleotide (dTTP, dCTP, dGTP und dATP), 2,5 U Taq-Polymerase und die je Primerpaar entsprechende Mengen Magnesiumchlorid. Als Matrize wurden die in den Äquilibrierungsexperimenten festgelegten Volumina cDNA eingesetzt. Zum Nachweis des Auftretens von Produkthemmungseffekten wurden zusätzlich Ansätze mit 1:10-verdünnter cDNA untersucht. Als Negativkontrolle wurde destilliertes Wasser als Template verwendet. Die Ansätze wurden mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Desoxynukleotide und Polymerase wurden als „Hot Start Mix“ nach der initialen Denaturierungsphase zur Steigerung der Spezifität zugegeben. Jede Probe wurde mit 30 µl ‚Chill-Out‘ Wachs bedeckt, um ein Verdunsten während der Reaktion und damit eine Änderung der Konzentrationen im Reaktionsansatz zu verhindern. Die Zyklenanzahl betrug 35. Tabelle 11 zeigt die zeitlichen Abläufe. Alle PCR-Experimente wurden pro kanalspezifischem Primer fünf Mal wiederholt.

Tabelle 11: PCR-Protokoll

Temperatur (°C)		Dauer (Sekunden)
98 (Hotstart)		600
72 (Zugabe von Polymerase und dNTP)		60
35 Zyk- len	94 (Denaturierung)	40
	* (Annealing)	40
	72 (Elongation)	*
72 (Komplettierung)		600
4 (Kühlung)		

* primerspezifisch, s. Tabelle 7

6.2.3.5 Elektrophorese

Jeweils 10 µl der Reaktionsansätze wurden im Anschluss an die PCR Experimente elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt und mittels Ethidium-Bromid-Färbung sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mittels einer Gel-Kamera und anschließender densitometrischer Messung der Banden.

Die Herstellung der Gele erfolgte durch Lösung von Agarose in 0,5-fach konzentriertem TBE-Puffer, so dass eine 2-%ige Agaroselösung resultierte. Nach vollständiger Lösung wurden zur Färbung der DNA-Banden 3 µl Ethidium-Bromid zu 100 ml Elektrophoresegel gegeben. Die Elektrophoresekammer wurde mit 0,5-fach konzentriertem TBE-Puffer aufgefüllt. 10 µl der Reaktionsansätze wurden mit 2 µl Ladepuffer gemischt und in die 1 cm breiten Geltaschen appliziert. Zusätzlich wurde pro Gel je eine Tasche mit der jeweiligen Positivkontrolle und Negativkontrolle bestückt. Als Größen- und Mengenmarker wurden 10 µl pUC19 DNA/*MspI* (*HpaII*) Marker appliziert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 Volt über 45 Minuten durchgeführt. Die Gele wurden auf einem UV-Leuchttisch bei einer Wellenlänge von 312 nm dokumentiert. Dazu diente eine Polaroid DS-34 Gel Kamera mit Dunkelgelb-Filter auf einem H6-EL Tubus (GH10) mit 0,8-facher Vergrößerung. Die Belichtungszeit betrug ¼ Sekunden, die Blende f/16. Als Film wurde ein Polaroid Type 667 Film (ISO 3000) mit einer Entwicklungszeit von 30 Sekunden verwendet. Kamera und Leuchttisch wurden abgedunkelt, um den Einfluss von Streulicht zu minimieren.

6.2.4 Sequenzierung der PCR-Produkte

Um die korrekte Sequenz der amplifizierten PCR-Produkte zu überprüfen, wurde eine DNA-Sequenzierungsanalyse durchgeführt.

6.2.4.1 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Banden der jeweiligen PCR-Produkte wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten. Die Aufreinigung der DNA mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) folgte den Empfehlungen des Herstellers. Die DNA lag am Ende der Aufreinigung in 10 µl H₂O gelöst vor.

6.2.4.2 Klonierung

Zur Klonierung wurde das TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen) verwendet. Für die primäre Topoisomerase-Reaktion wurde nach Herstellerangaben 1 µl der aufgereinigten DNA eingesetzt. Die Transformation in die zum Kit gehörigen kompetenten Zellen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. 100 µl der transformierten Bakterien wurden auf LB/IPTG/X-Gal Agar Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2.4.3 Plasmidpräparation

Je 4 ml LB Flüssigmedium wurden mit einer Kolonie angeimpft; es wurden drei Kolonien pro Platte verwendet. Die Kulturen wurden im Schüttelinkubator bei 37°C über Nacht angezogen. 2ml jeder Kultur wurden mit dem Plasmid Miniprep Kit nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die Plasmid-DNA lag am Ende in 50 µl H₂O vor. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch in einer 1:20 Verdünnung mit dem Gene QuantII-Spektrophotometer bestimmt.

6.2.4.4 Sequenzierung

Die so klonierten Fragmente wurden mit Hilfe des „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ sequenziert. Als Sequenzierprimer diente IRD800-M13_rev. Reaktionsansatz und -bedingungen folgten den Empfehlungen des Herstellers. 1 µl der Sequenzreaktionen wurden im Polyacrylamid-Gel auf einem DNA-Sequencer (LI-COR Long ReadIR 4200) aufgetrennt und gescannt. Die Sequenzen wurden mit der Base ImageIR™ Version 3.0 Software ermittelt und mit den erwarteten Sequenzen verglichen.

6.3 Auswertung

6.3.1 Densiometrische Messungen

Nach Abfotografieren der Gele wurden die Sofortbilder auf einem CanoScan LiDE 20 Scanner als 8-bit-Grauwerte-Bild mit einer Auflösung von 400 dpi gescannt. Die Bilddaten wurden anschließend mit der Software ImageJ, Version 1.22, ausgewertet. Danach erfolgte zunächst eine Kalibrierung der Messfunktion. Gemessen wurden dazu der mittlere Grauwert des Gels im Bereich der Negativkontrolle auf Höhe der Größe der jeweiligen Banden, und der mittlere Grauwert der 242bp-Bande des mit aufgetragenen Markers puc19/Hpall. Diese Bande war deutlich von den anderen Banden getrennt und zeigte in den Elektrophoresegele eine sehr starke Signalintensität. Mittels des Kalibrierungswerkzeugs wurde der Negativkontrolle der Wert 0 (Null) und der Marker-Bande der Wert 100 zugewiesen. Als Kalibrierungsfunktion wurde „straight line“ definiert. Nach Abschluss der Kalibrierung erfolgte eine wiederholte Messung der Null- und 100-Werte um die korrekte Kalibrierung zu verifizieren.

Gemessen wurde der mittlere Grauwert jeder einzelnen Bande auf jedem Gel, wobei dieselbe Fläche wie bei der Kalibrierung vermessen werden musste. Durch die Kalibrierung wurden bei signalintensiven Banden hohe und bei signalschwachen Banden niedrige Werte gemessen. Zum Ausgleich von zufälligen Fehlern wurden die Mittelwerte aus den mehrfachen PCR-Wiederholungen einer Gewebeprobe je Isoform ermittelt.

Wir nahmen eine Einteilung der Messwerte in vier Kategorien vor. Mittelwerte von 1 bis 15 wurden als *schwach* [(+)], Mittelwerte zwischen 15 und 70 als *mäßig* [+] und als *stark* [++] bei einem Messwert größer als 70 bewertet. War keine Bande messbar, wurde die Stärke als *negativ* bewertet. Für quantitative Aussagen wurde nur zwischen *positiv*, d.h. ein Signal beliebiger Stärke war nachweisbar, und *negativ*, d.h. kein Signal war nachweisbar, unterschieden.

6.3.2 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der SPSS-Software für Windows Version 12.0, Release 12.0.0 (Statistical Package for Social Science®, Inc. Chicago, IL, USA).

Zur Untersuchung auf einen Einfluss der Tumorentität auf das Messergebnis wurden die Grauwerte der einzelnen Tumorgruppen gemittelt. Getestet wurde dann auf Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte einer Isoform in verschiedenen Tumorentitäten. Zur Überprüfung der Annahme eines auf den Tumorentitäten beruhenden Unterschieds der Mittelwerte wurde zunächst mit dem parameterfreien Kruskal-Wallis-Test getestet. Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,05$ angenommen. Stellte sich ein signifikanter Unterschied dar, wurden die Tumorgruppen paarweise untereinander mit dem U-Test nach Mann-Whitney verglichen. Die Signifikanz wurde wiederum auf dem 5%-Niveau gesichert.

Der Vergleich zwischen Tumoren und nicht-neoplastischem Kontrollgewebe (Probe GG), sowie zwischen den nicht-neoplastischen Gewebeproben (GG, E, T) untereinander, erfolgte deskriptiv, da jeweils nur eine Probe von den nicht-neoplastischen Gewebeproben untersucht werden konnte.

Die qualitativen Daten (Prozentwert der positiven Signale) wurden zum einen zwischen den Gruppen der benignen Tumoren (WHO Grade I und II) und malignen Tumoren (WHO Grade III und IV) mittels Fishers Exaktem Test, zum anderen innerhalb der jeweiligen Gruppen zwischen den verschiedenen Isoformen mittels des McNemar-Tests verglichen. Signifikanz wurde wiederum auf dem 5%-Niveau gesichert.

7 Ergebnisse

Untersucht wurden 17 Tumorgewebeproben aus neurochirurgisch gewonnenem Frischmaterial, eine Probe aus der Infiltrationszone eines der untersuchten Glioblastome, sowie drei Gewebeproben nicht-neoplastischer Herkunft. Ziel war der Nachweis von cDNA der ZNS-prävalenten Natriumkanalisoformen $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ und $Nav1.6$, sowie der Isoform Na_x und der Muskelisoform $Na_v1.4$.

7.1 RNA-Isolierung und Äquilibrierungsexperimente

7.1.1 RNA-Isolierung

Aus dem zur Verfügung stehenden tiefgefrorenen Frischmaterialien konnten mittels Cäsiumchloridgradientenzentrifugation unterschiedliche Mengen an Gesamt-RNA gewonnen werden. Die gemessenen Konzentrationen schwankten je nach Probe zwischen 32 ng/ μ l und 424 ng/ μ l, entsprechend einer Gesamtmenge zwischen 6,4 μ g und 84 μ g total-RNA. Die Gesamt-RNA-Ausbeute korrelierte mit der Menge des zur Verfügung stehenden Frischmaterials.

7.1.1.1 Äquilibrierung an einem GAPDH-Standard

Zur Standardisierung wurden PCR-Experimenten mit GAPDH-spezifischen Primerpaaren durchgeführt. Als Standard, an welchem die einzusetzenden Volumina gemessen wurden, war das Signal einer Bande aus 1 μ l Kontrollgewebe (nicht-neoplastisches Gehirngewebe, Probe GG) definiert worden. Der mittlere Grauwert (mGw) dieser Bande lag nach üblicher Kalibrierung bei 12,2 (\pm 2,1). Die Äquilibrierung der Tumorgewebeproben erforderte wiederholte Ansätze mit verschiedenen Verdünnungsschritten, bis eine dem Standard entsprechende Bande erzielt wurde. Die schließlich eingesetzten Volumina schwankten je nach Tumorprobe zwischen 1 μ l und 0,04 μ l pro PCR-Reaktion. Abbildung 4 zeigt beispielhaft zwei Verdünnungsreihen zweier Tumorproben zusammen mit dem Standard und der Negativkontrolle (Wasser). Abbildung 5 zeigt Elektrophoresegele der GAPDH-spezifischen PCR.

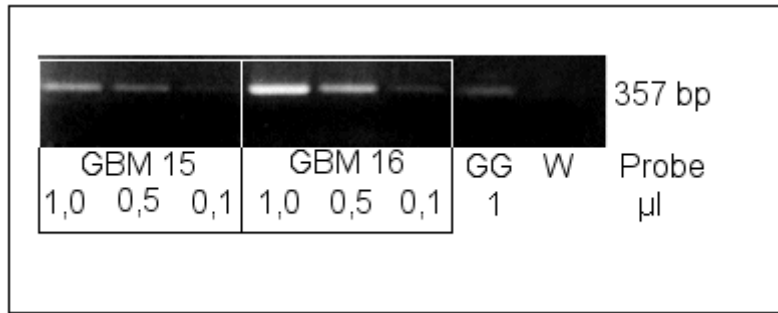


Abbildung 4: GAPDH-spezifische PCR; GBM 15, GBM 16: Glioblastome, Tumoren 15 und 16; GG: Gesundes Gehirngewebe; W: Wasser; Angabe der eingesetzten Volumina in µl; 357 bp Größe in Basenpaaren

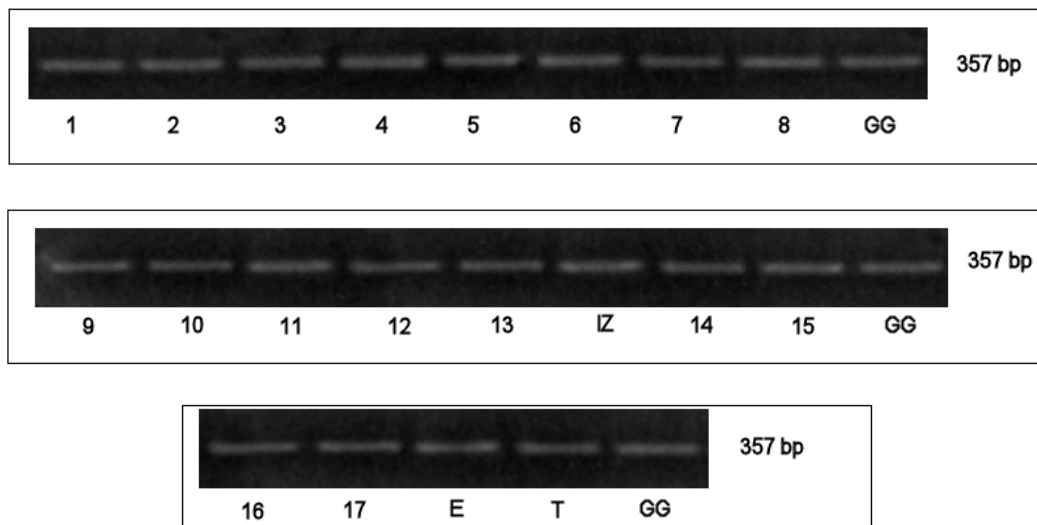


Abbildung 5: Elektrophoresegele GAPDH; 1-17 Tumoren 1-17; GG Gesundes Gehirngewebe; E Epilepsie; T Trauma; 357 bp Größe in Basenpaaren

7.2 PCR-Experimente

7.2.1 Spannungssensitive Natriumkanäle in nicht-neoplastischen Gewebeproben

Drei nicht-neoplastische Gewebeproben stammten von einem 65-jährigen Patienten (Biopsiematerial, tumorfrei, Probe GG), einem Kind mit chronischer Temporallappenepilepsie (Probe E) und einem Erwachsenen mit Schädel-Hirn-Trauma und intrakranieller Blutung (Probe T). Die Tumorfreiheit dieser Proben war histopathologisch anhand von repräsentativen Schnitten gesichert worden. Sowohl in der Probe E als auch in der Probe T fanden sich astroglotische Veränderungen; diese fehlten in der Probe GG. Die Zusammensetzung aller drei Proben bestand aus zerebralem Kortex und Marklager, jedoch nicht zu gleichen Teilen. Die Probe E enthielt den größten, die Probe GG den geringsten Anteil an Kortex.

In allen nicht-neoplastischen Gewebeproben ließ sich cDNA von allen ZNS-Isoformen (Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3 und Nav1.6), sowie von der atypischen Isoform Na_x amplifizieren. Nicht nachweisbar war cDNA für Na_v1.4.

Da es sich jeweils um nur eine Probe pro Gewebeart handelte, wurden keine statistischen Tests auf signifikante Unterschiede durchgeführt.

Die gemessenen mittleren Grauwerte unterschieden sich je nach Isoform. Die Probe GG zeigte im Vergleich mit E und T geringere Werte für Na_v1.1, Na_v1.3, Nav1.6 und Na_x (s. Tabelle 8 und 9). Für Na_v1.2 ergaben sich zwar bei allen drei Proben hohe Werte, jedoch zeigte Probe E einen deutlich niedrigeren Wert als die anderen beiden Proben. Besonders auffällig waren die im Vergleich mit GG sehr hohen Werte für Na_v1.3 und Nav1.6 in den Proben E und T.

Tabelle 8: Mittlere Grauwerte in den nicht-neoplastischen Gewebeproben

Probe	Na _v 1.1	Na _v 1.2	Na _v 1.3	Na _v 1.4	Nav1.6	Na _x
GG (n=1)	42 ±15	101 ±18	7 ±3	0	8 ±2	8 ±4
E (n=1)	61 ±12	58 ±8	75 ±12	0	35 ±7	27 ±12
T (n=1)	105 ±28	96 ±6	99 ±12	0	63 ±14	36 ±8

GG Gesundes Gehirngewebe (25 Einzelmessungen); E Epilepsie (5 Einzelmessungen); T Trauma (5 Einzelmessungen); Na_v1.1 – Na_x Isoformen der spannungssensitiven Natriumkanäle

7.2.1.1 Infiltrationszone eines Glioblastoms

In der vorliegenden Studie konnten die Isoformen in einer Probe aus der Infiltrationszone (Probe IZ) eines der untersuchten Glioblastome (Tumor 13) nachgewiesen werden. Die Probe zeigte histopathologisch eine geringe Infiltration durch Glioblastomzellen und Zeichen einer astrogliotischen Reaktion. Verglichen mit der zugehörigen Tumorprobe fanden sich Unterschiede. Die Probe IZ zeigte für alle Isoformen einen höheren Messwert als die Tumorprobe; ausgenommen war Isoform Na_v1.3, für die gleich hohe Werte gemessen wurden. Verglichen mit der Probe GG ergab sich eine große Ähnlichkeit der Werte, abgesehen von Na_v1.3, für die in GG ein niedrigerer Wert gemessen worden war (Abbildung 6).

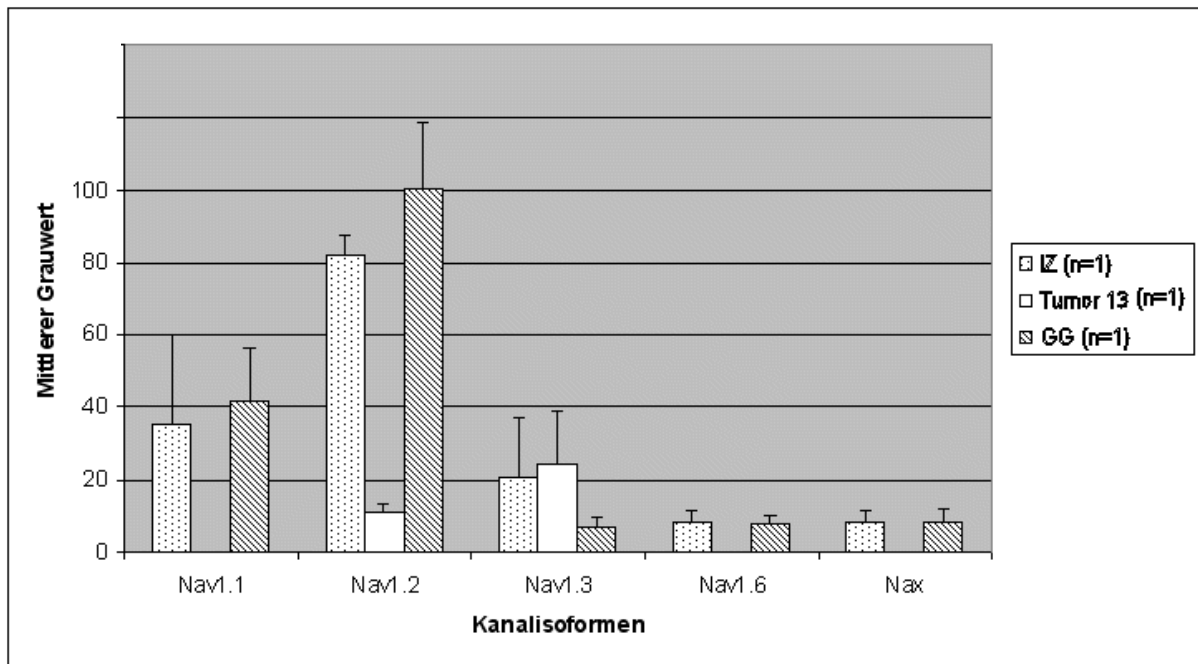


Abbildung 6: Vergleich der mittleren Grauwerte (mGw) zwischen Infiltrationszone (IZ, je 5 Einzelmessungen), zugehörigem Glioblastom (Tumor 13, je 5 Einzelmessungen) und gesundem Gehirngewebe (GG, je 25 Einzelmessungen); Nav1.1 – Navx Isoformen der spannungssensitiven Natriumkanäle

7.2.2 Spannungssensitive Natriumkanäle in Gliomen

Tumoren von drei pilozytischen Astrozytomen, vier diffusen Astrozytomen, fünf Oligoastrozytomen (eines WHO Grad II, vier anaplastische WHO Grad III) und fünf Glioblastomen wurden untersucht. Tabelle 9 stellt die aus den Einzelmessungen gemittelten Werte der beobachteten Signale je Tumor dar.

Tabelle 9: Übersicht über die mittleren Signalstärken der verschiedenen Isoformen in den untersuchten Tumoren

Tumor	Histologie/ WHO Grad	Nav1.1	Nav1.2	Nav1.3	Nav1.4	Nav1.6	Navx
1	PA I	+	++	++	-	(+)	(+)
2	PA I	+	++	+	-	+	(+)
3	PA I	+	++	+	-	+	+
4	DA II	++	+	+	-	(+)	+
5	DA II	+	+	+	-	-	(+)
6	DA II	+	++	(+)	-	-	(+)
7	DA II	++	+	(+)	-	-	(+)
8	OA II	++	++	++	-	(+)	-
9	aOA III	+	++	+	-	-	-

10	aOA III	+	++	-	-	-	+
11	aOA III	(+)	++	+	-	-	-
12	aOA III	(+)	++	-	-	-	-
13	GBM IV	-	(+)	+	-	-	-
14	GBM IV	+	(+)	+	-	-	-
15	GBM IV	+	(+)	(+)	-	-	-
16	GBM IV	-	+	(+)	-	-	-
17	GBM IV	-	(+)	-	-	-	-

PA pilozytische Astrozytome; DA diffuse Astrozytome; OA Oligoastrozytome; GBM Glioblastome; I-IV WHO Grad I-IV; Nav1.1 – Nax Isoformen der spannungssensitiven Natriumkanäle; ++ stark (mGw ≥ 70); + mäßig (mGw ≥ 15); (+) schwach (mGw < 15); - negativ (mGw=0)

7.2.2.1 Na_v1.1

Na_v1.1 konnte in 14 von 17 Tumoren nachgewiesen werden. Die meisten Tumoren (58%) zeigten ein mäßiges oder starkes (17%) Signal. Alle pilozytischen Astrozytome, diffusen Astrozytome und Oligoastrozytome zeigten ein Signal, aber nur 2 von 5 der Glioblastome (Tumoren 15 und 16). Diese beiden en stammten von jeweils 39-jährigen männlichen Patienten (mittleres Alter in der Glioblastom-Gruppe 60,6 Jahre). Ein besonders hoher Einzelwert (mGw=76 \pm 16) in der Gruppe der Oligoastrozytome (Tumor 8, 59-jähriger männlicher Patient) stammte aus dem einzigen WHO Grad II Oligoastrozytom der Studie. (Abbildung 7 und 8).

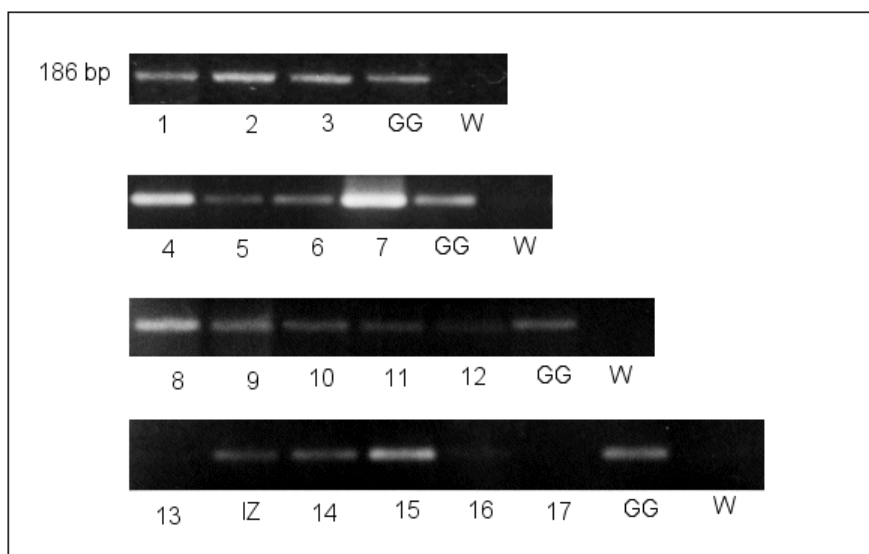


Abbildung 7: Elektrophoresegele Na_v1.1; 1-17 Tumoren 1-17; GG Gesundes Gehirngewebe; W Wasser; 186 bp Fragmentgröße in Basenpaaren

Die Mittelwerte der Messwerte zeigten nach Tumorentität gruppiert signifikante Unterschiede (H-Test, $p=0,037$). Die stärksten Signale fanden sich bei den diffusen Astrozytomen ($mGw=60 \pm 31$) und pilozytischen Astrozytomen ($mGw=52 \pm 12$). Oligoastrozytome ($mGw=30 \pm 26$) und Glioblastome ($mGw=11 \pm 17$) zeigten dagegen deutlich geringere Signalstärken (Abbildung 8). Die größte Heterogenität zeigte sich in der Gruppe der Oligoastrozytome. Der Unterschied zwischen den Tumorentitäten ließ sich im U-Test statistisch signifikant für den Unterschied zwischen PA und GBM ($p=0,022$), DA und GBM ($p=0,046$) und DA und OA ($p=0,05$) sichern.

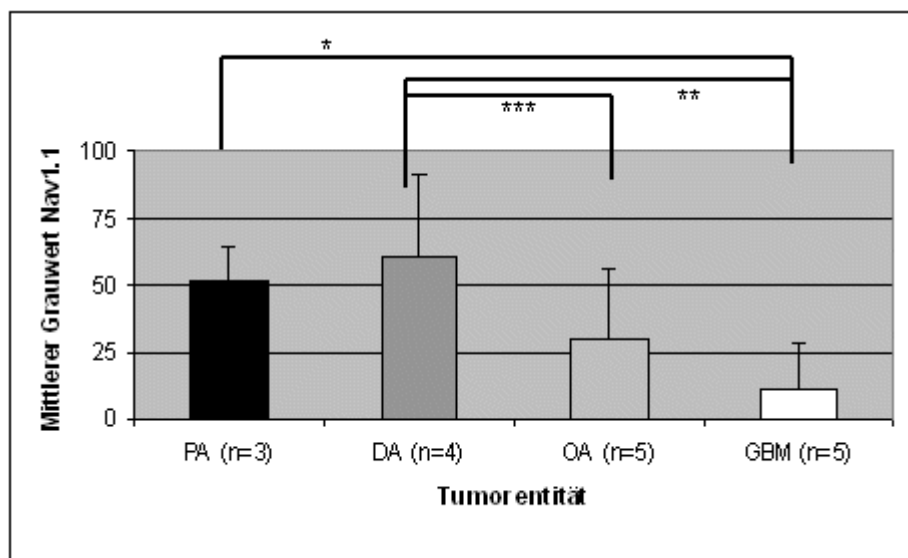


Abbildung 8: Mittlerer Grauwert für Nav1.1 nach Tumorentität, * $p=0,022$; ** $p=0,046$; * $p=0,05$; PA pilozytische Astrozytome; DA diffuse Astrozytome; OA Oligoastrozytome; GBM Glioblastome**

7.2.2.2 Nav1.2

In allen Gewebeproben ließ sich cDNA mit Nav1.2-spezifischen Primern amplifizieren. 53% der Tumoren zeigten starke Signale, 23,5% zeigten mäßige und ebenso viele zeigten ein schwaches Signal. Alle schwachen Proben waren Glioblastome (Abbildung 9 und Tabelle 9).

Generell fanden wir bei allen untersuchten Tumorentitäten ein homogenes Signalverhalten; die pilozytischen Astrozytome ($mGw=92 \pm 16$) und Oligoastrozytome ($mGw=94 \pm 14$) zeigten höhere Werte als die diffusen Astrozytome ($mGw=74 \pm 31$) und Glioblastome ($mGw=20 \pm 20$). Auffällig ist der deutliche Unterschied zwischen den Glioblastomen und allen anderen Tumorentitäten. Die beobachteten Unterschiede ließen sich statistisch sichern ($p<0,01$). Der paarweise Vergleich zeigte signi-

signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der Glioblastome und allen anderen Tumorentitäten (s. Abbildung 10)



Abbildung 9: Elektrophoresegele Na_v1.2; 1-17 Tumoren 1-17; GG Gesundes Gehirngewebe; W Wasser; 96 bp Fragmentgröße in Basenpaaren

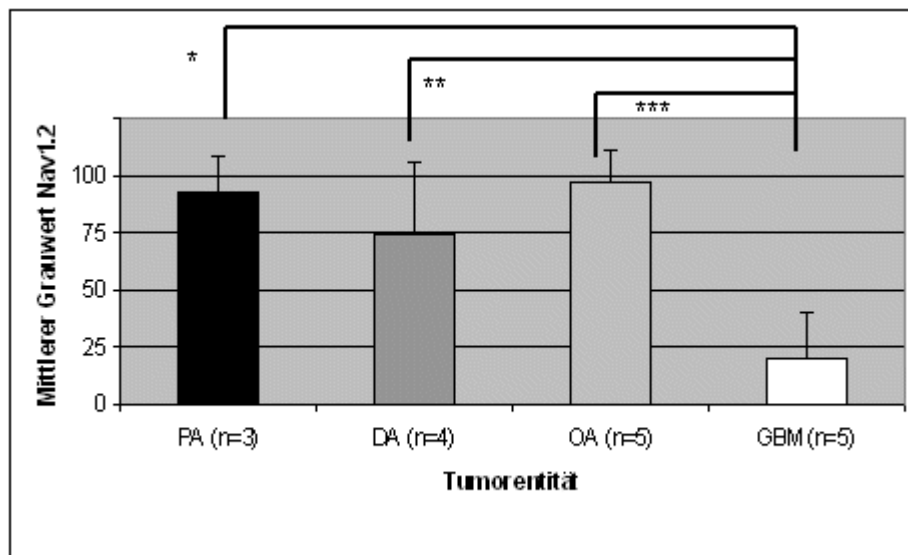


Abbildung 10: Mittlerer Grauwert Na_v1.2 nach Tumorentität, * p=0,025; ** p=0,01; *** p<0,01; PA pilozytische Astrozytome; DA diffuse Astrozytome; OA Oligoastrozytome; GBM Glioblastome

7.2.2.3 Na_v1.3

In 82% aller Tumoren konnte Na_v1.3 cDNA nachgewiesen werden. Die Messwerte variierten von stark bis negativ. Zwei Oligoastrozytome und ein Glioblastom zeigten kein Signal für Na_v1.3. 47% der Signale konnten als mäßig klassifiziert werden, 29% wurden als schwache Signale eingestuft. Nur ein Tumor zeigte ein starkes Signal. Dabei handelte es sich um das Grad II Oligoastrozytom (Tumor 8). Die Mittelwerte

der Signale für die einzelnen Tumorentitäten waren mit Ausnahme der pilozytischen Astrozytome etwa gleich. Es konnte kein signifikanter Einfluss der Tumorentität im Kruskal-Wallis-Test nachgewiesen werden ($p=0,11$). Tendenziell zeigten die pilozytischen Astrozytome den höchsten (mGw= 56 ± 24), die Glioblastome den niedrigsten Wert (mGw= 12 ± 11). Diffuse Astrozytome und Oligoastrozytome lagen mit mittleren Grauwerten von 21 (± 21) bzw. 20 (± 27) dazwischen (Abbildungen 11 und 12, Tabelle 9).

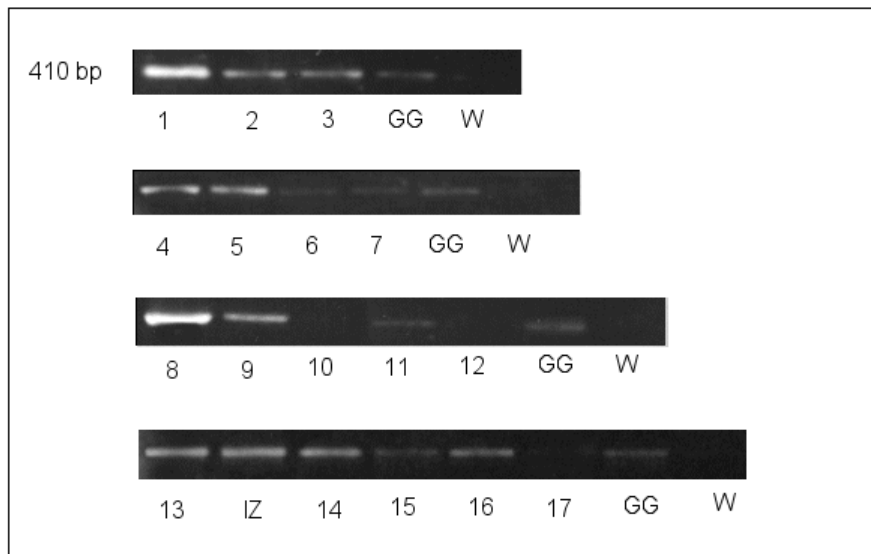


Abbildung 11: Elektrophoresegele Nav1.3; 1-17 Tumoren 1-17; GG Gesundes Gehirngewebe; W Wasser; 410 bp Fragmentgröße in Basenpaaren

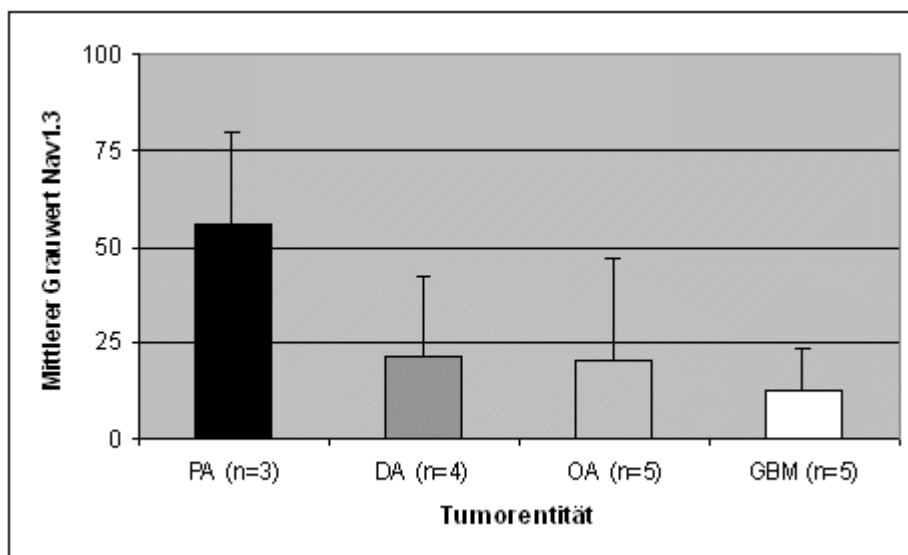


Abbildung 12: Mittlerer Grauwert $Na_v1.3$ nach Tumorentität; nicht signifikant; PA pilozytische Astrozytome; DA diffuse Astrozytome; OA Oligoastrozytome; GBM Glioblastome

7.2.2.4 Na_v1.4

In keiner der Tumorgewebeproben konnte cDNA von Na_v1.4-mRNA amplifiziert werden.

7.2.2.5 Na_v1.6

In 29% aller Gewebeproben ließ sich cDNA von Nav1.6-mRNA amplifizieren. 60% davon zeigten mäßige Signale (sämtliche pilozytischen Astrozytome), die übrigen zeigten schwache Signale. Außerdem zeigte nur ein diffuses Astrozytoms (Tumor 4, 38-jährig, männlich) und das einzige untersuchte Grad II Oligoastrozytom (Tumor 8, 59-jährig, männlich) ein schwaches Signal dieser Isoform. (Abbildung 13 und 14).

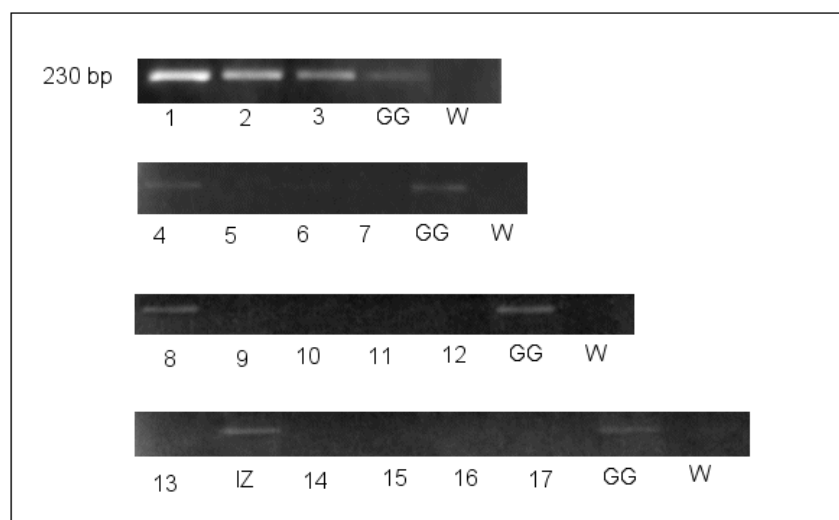


Abbildung 13: Elektrophoresegele Na_v1.6; 1-17 Tumoren 1-17; GG Gesundes Gehirngewebe; W Wasser; 230 bp Fragmentgröße in Basenpaaren

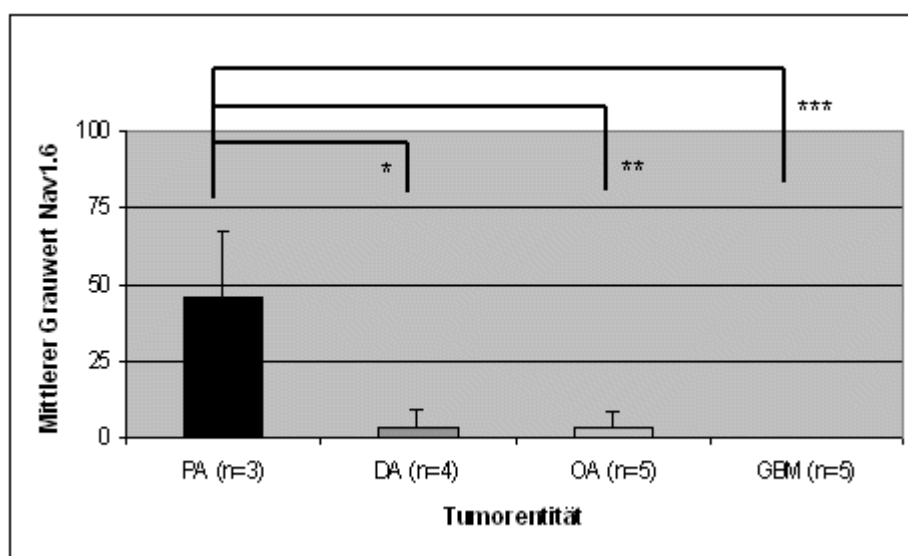


Abbildung 14: Mittlerer Grauwert Na_v1.6 nach Tumorentität; * p=0,03; ** p=0,02; *** p=0,01; PA pilozytische Astrozytome; DA diffuse Astrozytome; OA Oligoastrozytome; GBM Glioblastome

Der Mittelwert der pilozytischen Astrozytome lag bei 45 (± 22). Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Tumorentitäten ($p=0,01$), der auf signifikanten Unterschieden zwischen den pilozytischen Astrozytome und allen anderen Entitäten beruhte (s. Abbildung 14).

7.2.2.6 Na_x

Diese Isoform war in 47% der Tumorproben nachweisbar, darunter in allen niedriggradigen Tumoren (pilozytischen Astrozytomen und diffusen Astrozytomen).

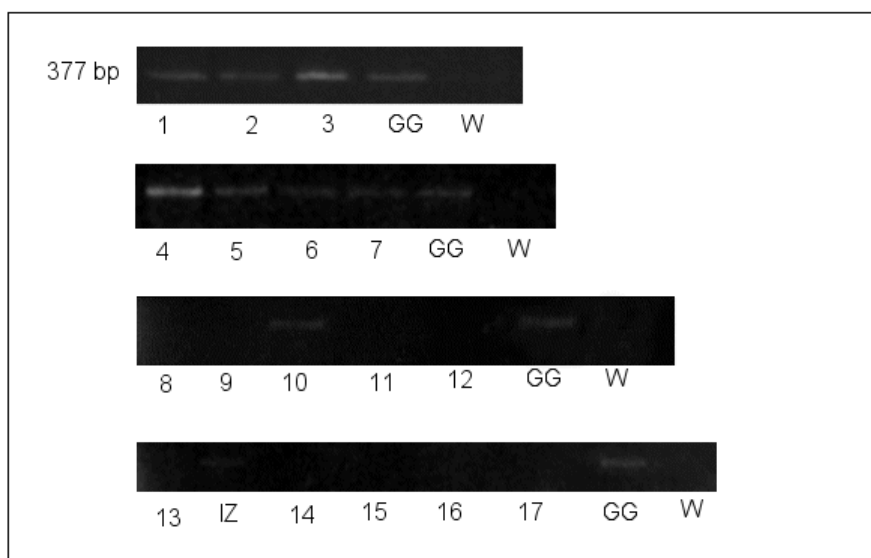


Abbildung 15: Elektrophoresegele Na_x; 1-17 Tumoren 1-17; GG Gesundes Gehirngewebe; W Wasser; 377 bp Fragmentgröße in Basenpaaren

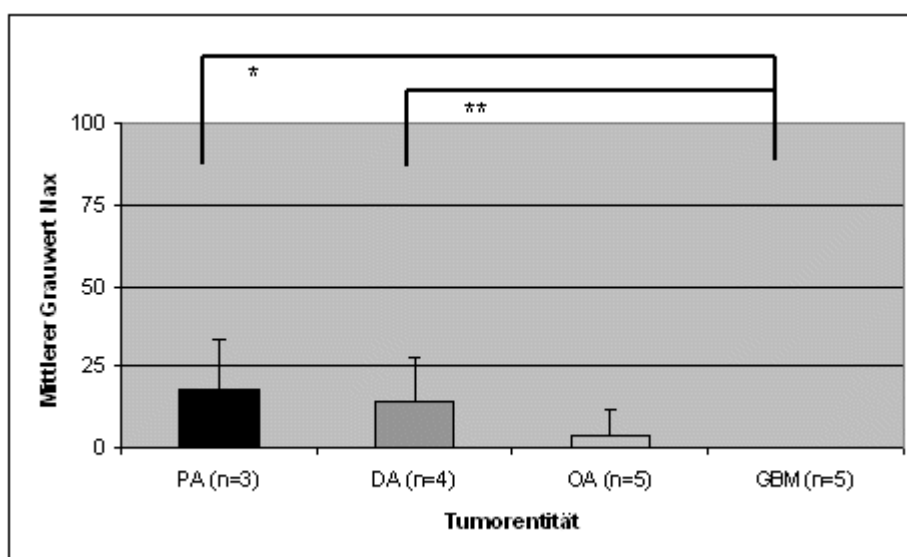


Abbildung 16: Mittlerer Grauwert Na_x nach Tumorentität, * $p=0,01$; ** $p<0,01$; PA pilozytische Astrozytome; DA diffuse Astrozytome; OA Oligoastrozytome; GBM Glioblastome

Zusätzlich zeigte ein anaplastisches Oligoastrozytom (Tumor 10, 10-jährig, männlich) ein mäßiges Signal für Na_x . In den niedriggradigen Tumoren fanden sich 5 schwache und 2 mäßige Signale (Abbildung 15 und Tabelle 9). Die Mittelwerte der pilozytischen und diffusen Astrozytome waren ähnlich hoch (18 ± 15 , bzw. 14 ± 14). Im H-Test zeigte sich wie bei $Na_v1.6$ ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte ($p=0,01$; s. Abbildung 16).

7.2.3 Vergleich Oligoastrozytom WHO II / anaplastische Oligoastrozytome WHO Grad III

Ein Vergleich der anaplastischen Oligoastrozytome ($n=4$) mit der Probe eines Grad II Oligoastrozytoms zeigte Unterschiede zwischen beiden Malignitätsgraden auf (s. Abbildung 17). $Na_v1.1$, $Na_v1.3$ und $Na_v1.6$ wurden deutlich stärker in dem Grad II Tumor als in den Grad III Tumoren nachweisbar. Da es sich jedoch um eine Einzelbeobachtung handelte, kann von einer Signifikanz nicht ausgegangen werden. Eine Überprüfung an größeren Fallzahlen wäre notwendig.

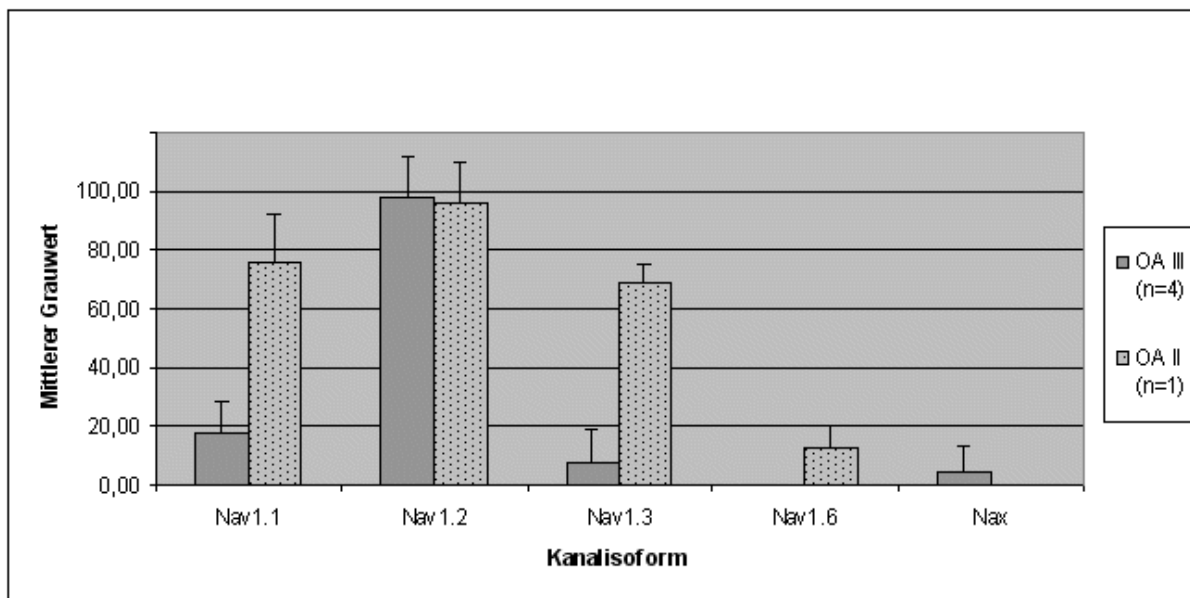


Abbildung 17: Oligoastrozytom WHO Grad II und anaplastische Oligoastrozytome WHO Grad III im Vergleich; OA III anaplastische Oligoastrozytome WHO Grad III; OA II Oligoastrozytom WHO Grad II; Nav1.1 – Navx Isoformen der spannungssensitiven Natriumkanäle

7.2.4 Qualitative Vergleiche

Ein rein qualitativer Vergleich der Tumorentitäten hinsichtlich der in den Tumoren nachweisbaren cDNA für die verschiedenen Isoformen verdeutlicht Unterschiede

zwischen den benignen Tumorentitäten der pilozytischen und diffusen Astrozytome und den malignen Tumoren, insbesondere den Glioblastomen. Wir ordneten das einzige WHO Grad II Oligoastrozytom zu diesem Zweck mit in die Gruppe der benignen Tumoren ein. Bewertet wurde, ob ein beliebiger Stärke Signal nachweisbar war („positiv“) oder nicht („negativ“). In der Gruppe der benignen Tumoren waren $Na_v1.1$, $Na_v1.2$ und $Na_v1.3$ in allen Tumoren nachweisbar. Die geringste Häufigkeit fand sich für $Na_v1.6$ (62,5% der Tumoren zeigten ein positives Signal). Na_x war in 87,5% der Tumoren nachzuweisen. In den malignen Tumoren ließ sich nur $Na_v1.2$ in allen Tumoren nachweisen, womit $Na_v1.2$ die in einzige Isoform ist, die wir in allen Gewebeproben nachweisen konnten. Dagegen waren nur jeweils 66,7% der Proben positiv für $Na_v1.1$ und $Na_v1.3$. $Na_v1.6$ war in keinem der malignen Tumoren nachweisbar. Ein Tumor zeigte ein positives Ergebnis für Na_x . Damit sind wie bei den benignen Tumoren $Na_v1.6$ und Na_x weniger häufig nachweisbar gewesen als die Isoformen $Na_v1.1$, $Na_v1.2$ und $Na_v1.3$ (Abbildung 18). Statistisch sichern ließ sich der Unterschied zwischen benignen und malignen Tumoren für die unterschiedliche Häufigkeit positiver Signale für $Na_v1.6$ ($p=0,009$) und Na_x ($p=0,003$) mittels des Chi-Quadrat-Tests (Fishers Exakter Test).

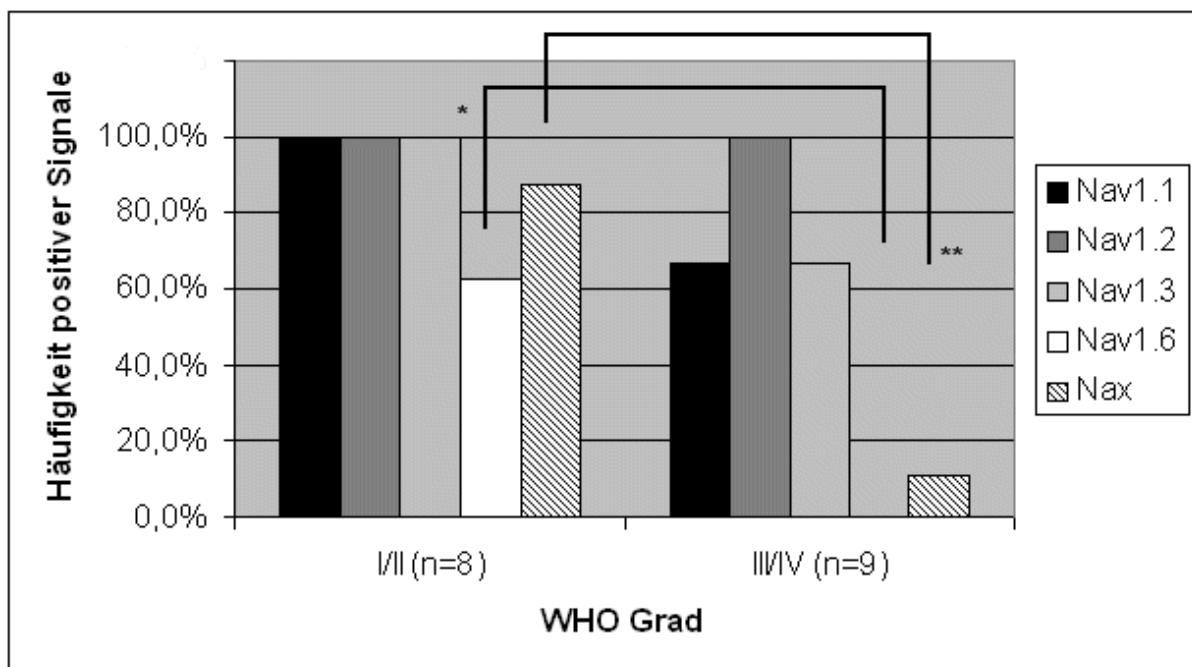


Abbildung 18: Häufigkeit positiver Signale der verschiedenen Isoformen nach WHO Graden unterteilt; Fishers Exakter Test: * $p=0,009$; ** $p=0,003$; I/II WHO Grad I und II; III/IV WHO Grad III und IV; Nav1.1 – Navx Isoformen der spannungssensitiven Natriumkanäle

Innerhalb der Gruppen der benignen und malignen Tumoren ließen sich die Unterschiede in der Häufigkeit positiver Signale für die unterschiedlichen Häufigkeiten zwischen $Na_v1.6$ auf der einen, sowie $Na_v1.1$, $Na_v1.2$ und $Na_v1.3$ auf der anderen Seite, bzw. für den Unterschied zwischen $Na_v1.2$ und Na_x mittels des McNemar-Tests sichern (Abbildung 19).

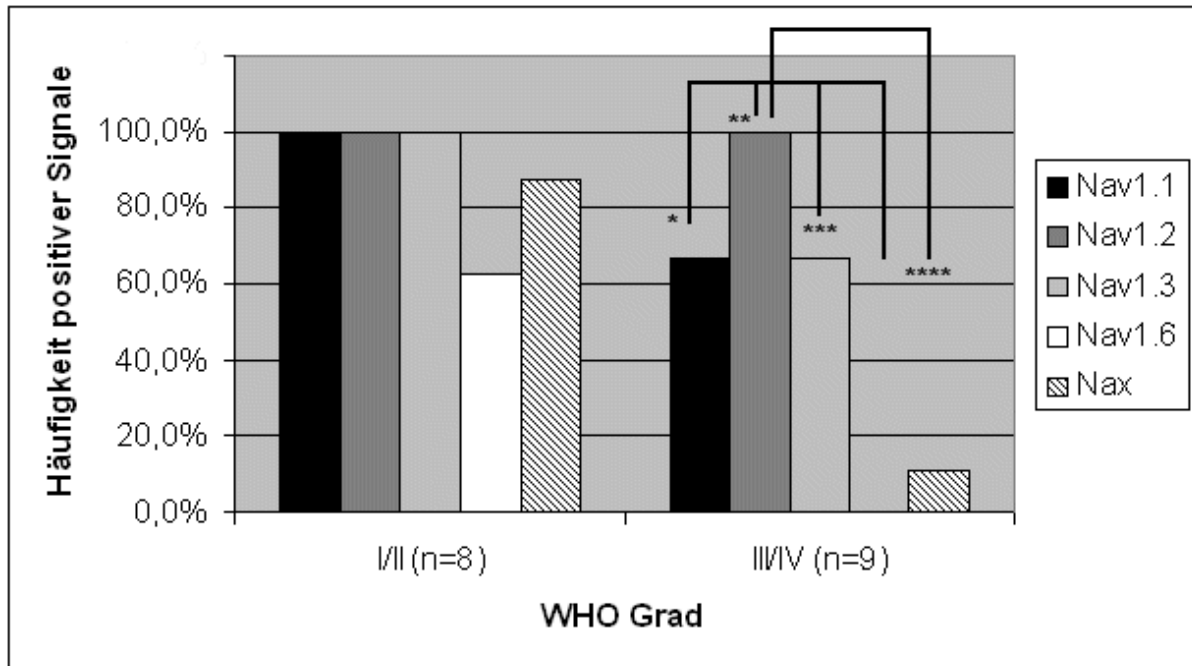


Abbildung 19: Häufigkeit positiver Signale der verschiedenen Isoformen nach WHO Graden unterteilt; McNemar-Test: * $p=0,031$; ** $p=0,004$; *** $p=0,031$; **** $p=0,008$; I/II WHO Grad I und II; III/IV WHO Grad III und IV; Nav1.1 – Navx Isoformen der spannungssensitiven Natriumkanäle

7.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigte die korrekte Basenfolge der amplifizierten Sequenzen.

8 Diskussion

Die Identität der spannungssensitiven Natriumkanäle, welche in Gliomen elektrophysiologisch nachgewiesen wurden (Labrakakis et al. 1997; Patt et al. 1996), ist molekularbiologisch bisher nicht untersucht worden. Unsere Studie zeigt, dass die in neuronalen Zellen exprimierten Kanalisofomen auch in Gliomen nachweisbar sind. Dabei konnten wir feststellen, dass die Stärke und Häufigkeit positiver Signale von der Histologie und dem Malignitätsgrad der Tumoren beeinflusst wird. Wir konnten die elektrophysiologischen Befunde, nämlich dass höhergradige Tumoren eine geringere Anzahl von spannungssensitiven Natriumkanälen aufweisen als niedriggradigere (Patt et al. 1996; Labrakakis et al. 1997), auf molekularer Ebene bestätigen.

Die Funktion von spannungssensitiven Natriumkanälen in nicht-neoplastischen Gliazellen ist Gegenstand der aktuellen Forschung; es existieren hierzu verschiedene Erklärungsmodelle (Sontheimer *et al.* 1996). Welche Rolle spannungssensitive Natriumkanäle in Gliomen spielen, ist bisher nicht bekannt. Möglicherweise sind sie, wie in anderen neoplastischen Geweben bereits nachgewiesen, in Proliferation- und Migrationsprozesse eingebunden. Darüber hinaus könnten sie für spezifische Eigenschaften bestimmter Tumoren verantwortlich sein, wie beispielsweise für Tumor-assoziierte Epilepsien.

8.1 Material und Methoden

8.1.1 Tumormaterial und gewonnene mRNA

Die Kontrollgewebe waren geeignet, als Positivkontrolle für die jeweilige Isoformen zu dienen. Einschränkend muss festgehalten werden, dass nur eine größere Anzahl von nicht-neoplastischen Proben wünschenswert gewesen wäre.

Der Anteil an neoplastischen Zellen innerhalb der untersuchten Gewebeproben wurde anhand von repräsentativen Paraffinschnitten beurteilt, welche dem Gewebestück, das für die RNA-Aufarbeitung verwandt wurde, unmittelbar benachbart war. Der Mindestanteil an neoplastischen Zellen von 80% gewährleistete, dass die ermittelten Signale zum überwiegenden Anteil von neoplastischen Zellen herrührten. Eine Mikrodisektion der Gewebeproben konnte leider nicht vorgenommen werden; diese

hätte den Vorteil gehabt, die Verunreinigungen mit nicht-neoplastischen Zellen zu verringern. Hinsichtlich des Einflusses von Zellen, die weder dem ZNS noch dem Tumor entstammen — beispielsweise Leukozyten—, gehen wir davon aus, dass deren Anteil an den ermittelten Signalen vernachlässigbar gering war. Allerdings ist eine Expression von spannungssensitiven Natriumkanälen — beispielsweise in natürlichen Killerzellen — bekannt (Mandler *et al.* 1990).

Jede der untersuchten Gewebeproben wurde nach der Resektion in Flüssigstickstoff tief gefroren und bei -70°C bis zur RNA-Isolierung aufbewahrt. Eine Beeinflussung der mRNA im Sinne einer Degradierung durch Einfrieren/Auftauen dürfte, sofern aufgetreten, in allen Proben gleichmäßigen Einfluss auf die Ergebnisse genommen haben. Durch die Sequenzierung unserer PCR-Produkte, welche die Korrektheit der amplifizierten Sequenzen erbrachte, kann davon ausgegangen werden, dass die gewonnene mRNA/cDNA soweit intakt war, dass sie für unsere Untersuchungen zu verwenden war. Die Beschränkung auf relativ kleine mRNA-Fragmente bzw. kurze Sequenzen für die Amplifikation war vorteilhaft, da bei einer Fragmentierung mit geringeren negativen Auswirkungen auf die Amplifizierbarkeit gerechnet werden kann.

8.1.2 RT-PCR

Durch Verwendung von Oligo-(dT)₁₅-Primern für die Reverse Transkription konnte sichergestellt werden, dass die erhaltene cDNA von mRNA mit intaktem Poly-A-Ende amplifiziert wurde. Dadurch wurde vermieden, die bei der Cäsiumchlorid-Extraktion mit gewonnenen anderen Bestandteile der Gesamt-RNA, beispielsweise rRNA, als Matrize für die PCR-Untersuchung mit zu synthetisieren.

8.1.3 GAPDH-Äquilibrierung

Als Standard zur Abstimmung der einzusetzenden cDNA-Menge verwendeten wir GAPDH-spezifische Primerpaare. Die Standardisierung über das Haushaltsgen GAPDH im Rahmen von RT-PCR-Experimenten ist etabliert (Guan *et al.* 2002; Horikoshi und Sakakibara 2000; Knerr *et al.* 2001; Van der *et al.* 2003). Inoue *et al.* (2002) konnten zeigen, dass GAPDH-mRNA in gleichem Maße wie die übrige RNA degradiert. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass durch Veränderungen der Expression dieses Enzyms (Hochregulierung, Herabregulierung) im Rahmen von beispielsweise neoplastischen oder chronisch-entzündlichen Prozessen dieser Standard verfälscht würde (Jesnowski *et al.* 2002). Wir gehen jedoch davon aus, dass dies für

Gliome vernachlässigbar; in den oben erwähnten Arbeiten (GAPDH im Rahmen von RT-PCR-Experimenten etabliert) werden keine Probleme bei der Verwendung von GAPDH berichtet. Die große Spannweite der einzusetzenden Volumina an cDNA für die PCR-Experimente kann auch durch die unterschiedlichen Anteile von mRNA an der Gesamt-RNA in den Gewebeprobeen erklärt werden. Möglicherweise spielen hierbei auch unterschiedlich hohe Syntheseaktivitäten innerhalb der Tumoren eine Rolle.

8.1.4 PCR-Experimente

Mittels der PCR ist es möglich, eine nahezu unbegrenzte Anzahl von Kopien ausgehend von einem einzelnen DNA-Strang zu synthetisieren. Die Vervielfältigung des Materials findet dabei in bestimmten Grenzen exponentiell statt. Eine geringe Menge Matrize kann nach einer entsprechenden Anzahl von Zyklen eine große Menge PCR-Produkt erzeugen, was sich als kräftige Bande niederschlägt. Es handelt sich also um eine sehr sensible Methode. Daraus lässt sich für die in den Proben nicht nachweisbaren Isoformen schließen, dass wenn überhaupt, dann nur extrem geringe Mengen an cDNA in ihnen enthalten waren. Ein negatives Ergebnis bei der Auswertung der Gele kann daher auf ein Fehlen von cDNA schließen lassen, die durch die spezifischen Primer hätte amplifiziert werden sollen. Positive Signale sind dagegen *nicht* direkt quantifizierbar. Es kann bei hohen Zykluszahlen zu einem Abfallen der Zunahme des PCR-Produkts kommen. Durch Ansetzen von zehnfachen Verdünnungen der eingesetzten cDNA-Menge und die Beurteilung der resultierenden Banden sollte versucht werden, falsch-niedrige Signale zu identifizieren. Es zeigte sich, dass die verdünnten Reaktionsansätze zumindest gleichstarke Signale ergaben. In keinem Fall ließen sich mit den eingesetzten Mengen in den höherkonzentrierten Ansätzen schwächere Signale nachweisen, die auf das Auftreten einer Produkthemmung hingedeutet hätten. Abbildung 20 zeigt beispielhaft ein Elektrophoresegel von $\text{Na}_v1.1$ mit den nebeneinander aufgetragenen PCR-Produkten des unverdünnten und 1:10 verdünnten Reaktionsansatzes.

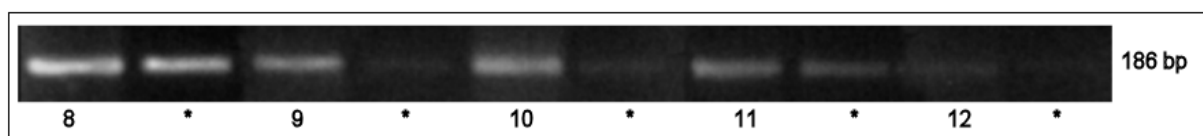


Abbildung 20: Elektrophoresegel $\text{Na}_v1.1$ mit 1:10 verdünnten Ansätzen; 8-12 Tumoren 8-12; * 1:10 Verdünnung; 186 bp Fragmentgröße in Basenpaaren

Mittels einer Zyklenvariation hätten weitergehende Aussagen über die Mengen der amplifizierten PCR-Produkte getroffen werden können. Mittels unserer Experimente müssen wir uns daher auf die gewählten Kategorien *schwach*, *mäßig* und *stark*, bzw. auf ein Beschreiben von *stärker* und *schwächer* beschränken.

Es ist weiterhin nicht möglich, mit der verwendeten Methode die Stärke der Signale *verschiedener* Isoformen direkt quantitativ miteinander zu vergleichen. Zu diesem Zweck hätten weitergehende Standardisierungen der Primer durchgeführt werden müssen. So ergaben sich in unseren nicht-neoplastischen Gewebeproben für die Isoform Nav1.2 in absoluten Grauwerten gemessen kräftige Signale, obwohl im adulten Gehirn Nav1.6 die dominante Isoform ist (Schaller *et al.* 1995), deren Signalstärke jedoch nur schwach war. Wahrscheinlich spielt in gerade diesem Fall (Nav1.2) auch die Größe des zu amplifizierenden Fragments eine Rolle, da es ein relativ kleines Fragment (96 bp) ist und eine Amplifizierung daher relativ besser möglich gewesen sein könnte. Daher ist eine vergleichende Aussage über die Stärke der Signale der verschiedenen Isoformen nur qualitativ (positiv / negativ) möglich gewesen.

8.1.5 Elektrophorese und densitometrische Auswertung

Die Auftrennung der PCR-Produkte und die anschließende Dokumentation und densitometrische Auswertung der Gele erfolgte nach einem standardisierten Vorgehen, ähnlich dem von Horikoshi und Sakakibara (2000) beschriebenen. Durch die mehrfache Wiederholung jeder PCR und Elektrophorese sollte versucht werden, die Einflüsse der verschiedenen Faktoren in diesen Schritten durch Mittelwertbildung zu nivellieren. Eine mögliche Fehlerquelle lag insbesondere in der unterschiedlichen Beschaffenheit der Elektrophoresegele (Ethidiumbromid-Verteilung, Lufteinschlüsse, Geldicke, Agarosekonzentration). Da stets identische Bedingungen für das Gießen der Gele hinsichtlich Volumen und Elektrophoresekammer gewählt wurden, konnten diese Einflüsse minimiert werden. Durch das Abdunkeln der Kameraeinrichtung wurden die Bedingungen für die Dokumentation der Gele konstant gehalten. Durch den stets identisch aufgetragenen Marker pUC19/Hpall war auf allen Gelen eine standardisierte Bande vorhanden, an dem sich die Messung der Grauwerte der Banden orientieren konnte.

Weitergehende Untersuchungen mit anderen Techniken, beispielsweise immunhistochemische Untersuchungen mit gegen die Kanalproteine gerichteten Antikörpern, wären wünschenswert. Der Nachweis von mRNA für Kanalproteine über cDNA ist

nicht gleichbedeutend mit dem Nachweis von funktionellen Kanälen, da posttranslationelle Modifikationen, RNase-Aktivität u.a. nicht berücksichtigt werden können. Leider standen uns für diese Studie keine Antikörper in ausreichender Qualität zur Verfügung.

8.2 Spannungssensitive Natriumkanäle in nicht-neoplastischen Gewebeproben

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene nicht-neoplastische Gewebeproben untersucht. Die Signalstärken der Natriumkanal-Isoformen in diesen nicht-neoplastischen Geweben (Biopsiematerial, traumatisiertes Frontalhirn, temporaler Epilepsiefokus, tumorfreies Randmaterial eines Glioblastoms) decken sich mit Daten aus der Literatur (Goldin 2001). Sie enthielten alle im ZNS vorkommenden Isoformen. Die Isoform der Skelettmuskulatur $Na_v1.4$ war wie erwartet nicht detektierbar. Da alle Proben sowohl graue als auch weiße Substanz in unterschiedlichem Maße enthielten, mussten wir davon ausgehen, dass die gewonnene mRNA bzw. cDNA von Neuronen und verschiedenen Arten von Gliazellen stammte. Untersuchungen von Bordey und Sontheimer (Bordey und Sontheimer 2000) zeigten jedoch, dass es elektrophysiologisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Hirnregionen gibt. Bezogen auf Astrozyten fanden die Autoren im Großen und Ganzen eine in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften homogene Kanalausstattung. Andererseits gibt es Hinweise auf eine vorherrschende Kanalexpression in bestimmten Zelltypen, welche für die Zelle von funktioneller Bedeutung sein kann. Dies trifft möglicherweise für die Ausstattung mit $Na_v1.6$ zu, wie es beispielsweise für die zerebellären Purkinjezellen gezeigt werden konnte (Malhotra et al. 2000; Raman et al. 1997).

Die Isoformen waren in den Gewebeproben unterschiedlich stark nachweisbar. Zum einen konnte die unterschiedliche Herkunft der Proben dafür ursächlich sein, zum anderen war das Verhältnis von glialen und neuronalen Zellen in den Proben nicht identisch. Zu erwarten wäre, dass Proben mit einem hohen Anteil an Neuronen aufgrund der höheren Dichte an spannungssensitiven Natriumkanälen (Sontheimer *et al.* 1996; Verkhratsky und Steinhauser 2000) in Nervenzellen stärkere Signale ergeben, als Proben mit einem Hauptbestandteil aus glialen Zellen. Entsprechend zeigten die Proben mit größeren Kortex-Anteilen (E und T) generell stärkere Signale als die Proben, die größere Anteile an weißer Substanz enthielten (GG und IZ).

Die starken Signale von Na_v1.3 in den Proben E, T und IZ deckt sich mit Befunden aus der Literatur, in der eine Hochregulation für diese Isoform beschrieben wurde. Zu Faktoren, die zu einer Überexpression dieses Kanals führen, zählen Hypoxie (Zhang *et al.* 2001) und Verletzungen von neuronalem Gewebe (Coward *et al.* 2001; Hains *et al.* 2003). Beide Zustände sind *in vivo* häufig von einer Astroglieose begleitet. Im Tierexperiment gelang der Nachweis, dass Astrozyten bei Gliose ihre Natriumkanaleigenschaften (TTX-Resistenz) ändern (MacFarlane und Sontheimer 1998). Dies deutet darauf hin, dass eine Gliose das Natriumkanalprofil moduliert. Passend dazu wiesen alle drei oben genannten Proben mit hochreguliertem Na_v1.3 histologisch Zeichen einer Astroglieose auf. Na_v1.3 könnte möglicherweise ein „Gliose-Marker“ sein.

Bemerkenswert waren die Ergebnisse bezüglich Na_x. Diese Isoform ist bisher nicht funktionell exprimiert worden. Ihre Funktion ist bisher noch nicht vollständig verstanden; möglicherweise spielt sie eine Rolle in der Regulierung des Elektrolythaushalts, da sie durch Natriumionenkonzentrations-Änderungen aktiviert wird (Ogata und Ohishi 2002). In allen unseren nicht-neoplastischen Gewebeproben fanden wir Signale für Na_x. Mit Blick auf die obigen Anmerkungen zur Astroglieose könnte es sich möglicherweise hierbei tatsächlich um eine auch in Astrozyten vorkommende Isoform handeln. In den Proben E und T fanden sich höhere Werte als in den Proben GG und IZ, was wiederum auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Proben zurückzuführen sein kann.

8.2.1 Gewebeprobe aus dem Randbereich eines Glioblastoms

Die Gewebeprobe IZ stammte aus der Umgebung eines Glioblastoms (Tumor 13, 78-jährig, weiblich). Im Rahmen der Operation wurde auch Gewebe entfernt, welches histologisch nur eine mäßige Tumorzellinfiltration und eine Astroglieose aufwies. Es ist bekannt, dass Glioblastome diffus infiltrierend wachsen und selbst in mehreren Zentimetern Abstand vom Resektionsrand noch Tumorzellen gefunden werden können. Die Probe IZ wies ein vom zugehörigen Tumor verschiedenes Kanalprofil auf. Diese Unterschiede weisen darauf hin, dass in der Infiltrationszone eines Tumors unter Umständen Zellen mit einer Kanalausstattung vorherrschen, die von der des Tumors verschieden ist. So ist auch bekannt, dass innerhalb eines Glioms durch mitotische Teilungen verschiedene Subpopulationen der ursprünglichen Tumorzelle entstehen (Loeper *et al.* 2001).

Mit Ausnahme von Na_v1.3, das gleich stark nachweisbar war (siehe unten), zeigte sie eine höhere Signalstärke aller anderen Isoformen. Dagegen war das Kanalprofil von IZ ähnlich dem der gesunden Probe GG: Die Isoformen Na_v1.1, Na_v1.6 und Na_x zeigten vergleichbar starke Signale, Na_v1.3 war jedoch in IZ stärker nachweisbar. Letzteres könnte auch hier in Zusammenhang mit der Astrogliose stehen, die im Randbereich eines Glioms üblich ist, und die sich auch in dieser Probe nachweisen ließ. Dies wäre ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass Na_v1.3 ein „Gliose-Marker“ sein könnte.

Andererseits könnte man aus dem vergleichbaren Signalverhalten von IZ und der Probe GG ableiten, dass sich die vorhandenen Milieuveränderungen durch die Tumornähe nicht in dem Maße ausgewirkt haben, als dass sie zu tumorcharakteristischen Signalstärkenänderungen geführt hätten.

Zusammenfassend können unsere Untersuchungsergebnisse an nicht-neoplastischen Geweben Hinweise auf eine Zelltyp- und Pathologie-assoziierte Expression von spannungssensitiven Natriumkanälen geben. Das Vorhandensein von mRNA/cDNA für spannungssensitive Natriumkanäle vom ZNS-Typ, also die Isoformen Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3 und Na_v1.6 in allen nicht-neoplastischen Gehirnproben, deckt sich mit der neuro-glialen Herkunft dieser Proben. Der Anteil der glialen Zellen an der Expression dieser Isoformen liegt vermutlich unter dem der Neuronen, in denen wesentlich mehr Kanäle vorhanden sind (Verkhratsky und Steinhauser 2000). Auf den möglichen Zusammenhang von Astrogliose und Na_v1.3 wurde oben bereits hingewiesen. Die Rolle von Na_v1.6 wird erst in Zusammenschau mit den Daten aus den neoplastischen Gewebeproben deutlich (siehe unten): die Nachweisbarkeit von Na_v1.6-cDNA scheint besonders mit der Differenzierung der Tumoren zu korrelieren. Vorsicht ist aufgrund der zum einen geringen Probenzahl und vielmehr noch der Heterogenität der Gruppe der nicht-neoplastischen Gewebeproben hinsichtlich der Aussagekraft geboten. Eine Aussage, in wie weit die Stärke der Signale in den nicht-neoplastischen Gewebeproben Neuronen oder Gliazellen zuzuschreiben ist, muss *in-situ*-Hybridisierung vorbehalten bleiben. Ebenso müsste die genauere zelluläre Herkunft der Signale für Na_x untersucht werden. Unsere Ergebnisse aus den nicht-neoplastischen Gewebeproben lassen erwarten, dass Na_x eine relativ weite Verbreitung in neuronalen und glialen Zellen haben könnte.

8.3 Spannungssensitive Natriumkanäle in Gliomen

8.3.1 Isoformen sind in unterschiedlichem Maße in den verschiedenen Tumorentitäten nachweisbar

Unsere Untersuchungen zeigen, dass es zwischen den verschiedenen Tumorentitäten Unterschiede hinsichtlich des Nachweises von mRNA für spannungssensitive Natriumkanäle gibt. Dass solche Kanäle funktionell in Hirntumoren exprimiert werden, ist in zahlreichen Arbeiten insbesondere auf elektrophysiologischem Gebiet bereits gezeigt worden (Bordey und Sontheimer 1998; Labrakakis et al. 1997; Patt et al. 1996; Ullrich et al. 1998). Molekularbiologische Untersuchungen zur Identität dieser Kanäle fehlen bisher. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Vielzahl von unterschiedlichen Isoformen an diesen elektrophysiologischen Befunden beteiligt gewesen sein können.

Die Ausstattung der Tumoren mit spannungssensitiven Natriumkanälen zeigte zum Teil signifikante Unterschiede. Isoformen konnten in verschiedenen Tumorentitäten unterschiedlich stark nachgewiesen werden. Darüber hinaus variierte auch das Repertoire an Isoformen mit der Tumorentität. Die Zugehörigkeit einer Probe zu einer Tumorentität beeinflusst sowohl die Stärke des Signals einer einzelnen Isoform, als auch die Anzahl an verschiedenen Isoformen, die nachweisbar waren. Tendenziell zeigten höhergradige Tumoren eine geringere Anzahl verschiedener Kanalisformen. Die nachweisbaren Isoformen waren schwächer als in den niedriggradigen, gut differenzierten Tumoren. Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden bei Kaliumkanälen in humanen Gliomen (Preussat *et al.* 2003).

8.3.1.1 Benigne Tumoren vom WHO Grad I und II

Gut differenzierte, benigne Tumoren, wie die pilozytischen und diffusen Astrozytome, zeigten in elektrophysiologischen Untersuchungen von Bordey und Sontheimer (1998) und Kraft et al. (1998) AP-generierende Zellen mit TTX-sensitiven, spannungssensitiven Natriumkanälen. In Oligodendrogliomen konnten von Patt et al. (1996) zahlreiche zur Aktionspotenzialgenerierung fähige Tumorzellen nachgewiesen werden. Auch auf molekularbiologischer Ebene konnten wir starke Signale für zahlreiche verschiedene Isoformen nachweisen. Bordey und Sontheimer (1998) hatten für pilozytische Astrozytome eine Steigerung der Kanaldichte um das drei- bis fünffache im Vergleich zu nicht-neoplastischen Astrozyten gezeigt. Dies deckt sich mit un-

seren Ergebnissen. Wir fanden bei pilozytischen und diffusen Astrozytomen im Vergleich zu den malignen Tumoren signifikant höhere Werte für $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.6$ (nur PA vs. GBM) und Na_x . Signifikant häufiger als in den malignen Tumoren gelang der Nachweis von $Na_v1.6$ und Na_x . Insbesondere der nahezu exklusive Nachweis von $Na_v1.6$ könnte darauf hinweisen, dass es sich bei pilozytischen Astrozytomzellen um relativ gut differenzierte Zellen handelt, die in ihrer Kanalausstattung dem „nicht-neoplastischen“ Gehirngewebe noch ähnlich sind. $Na_v1.6$ ist die dominierende Isoform im adulten ZNS, wo sie $Na_v1.2$ in den Axonen ersetzt und für die Generierung des Aktionspotentials an den Ranvier'schen Schnürringen verantwortlich ist (Caldwell *et al.* 2000; Goldin 2001; Kaplan *et al.* 2001). Wir interpretieren daher den Nachweis von $Na_v1.6$ als mögliches Zeichen für einen hohen Differenzierungsgrad der Tumorzellen, bzw. das Fehlen von $Na_v1.6$ als Hinweis auf eine Entdifferenzierung des Gewebes, wie es bei den höhergradigen Tumoren der Fall ist.

Als Hinweis auf eine Art Zwischenstellung, die die diffusen Astrozytome zwischen den pilozytischen und den höhergradigen Tumoren einnehmen könnten, könnte das Fehlen von $Na_v1.6$ bei gleichzeitig noch nachweisbarem Na_x sein. Möglicherweise ist Na_x tatsächlich auch ein Marker für eine astrozytäre Differenzierung, wie ursprünglich von Gautron *et al.* (1992) postuliert.

Zusammenfassend legen die signifikant häufiger positiven Signale für $Na_v1.6$ und Na_x in den benignen Tumoren (s. Abbildung 18) nahe, dass diese beiden Isoformen möglicherweise Marker für eine höhere, bzw. astrozytäre Differenzierung sind.

8.3.1.2 Maligne Tumoren vom WHO Grad III und IV

Ein anderes Bild zeichnen die höhergradigen, malignen Gliome. In unserer Untersuchung fanden sich hier eine geringere Stärke an Signalen, sowie eine verminderte Spannbreite an nachweisbaren Isoformen. Anaplastische Oligoastrozytome und Glioblastome unterschieden sich signifikant nur für die Messwerte von $Na_v1.2$. Die Herkunft der nachgewiesenen Signale in den Oligoastrozytomen kann verschieden sein. Als Mischgliome bestehen sie aus zwei verschiedenen Zellarten, die einerseits astrozytären, andererseits wahrscheinlich oligodendroglialem Ursprung sind. Reife Oligodendroglia exprimiert keine spannungssensitiven Natriumkanäle (Verkhratsky und Steinhauser 2000). Dagegen ist es bei einer pluripotenten Vorläuferzelle (O2A-Progenitor-Zelle) bekannt, dass sie zum einen spannungssensitiven Natriumkanäle exprimieren, zum anderen sich in Astrozyten und Oligodendroglia differenzieren kann. Die Befunde von Patt *et al.* (1996) zeigen jedoch, dass auch Oligodendroglia

om-Zellen wiederum in der Lage sind, spannungssensitive Natriumkanäle zu synthetisieren. Dies könnte auf ein Zurückfallen auf eine weniger differenzierte Entwicklungsstufe der Oligodendrogliomzellen hinweisen, da sie wiederum ein Verhalten einer weniger differenzierten Zellart (nämlich der O2A-Progenitor-Zelle) aufweisen. Es scheint möglich zu sein, dass Entdifferenzierung bei Oligodendrogliomen mit einem Anstieg der spannungssensitiven Natriumkanäle, und bei rein astrozytären Tumoren mit einem Abfallen der spannungssensitiven Natriumkanäle einhergeht. In unserem Fall scheint jedoch auch eine Verminderung der spannungssensitiven Natriumkanäle mit der Malignisierung einherzugehen, was möglicherweise auf die Mischnatur der Tumoren zurückzuführen ist. Bei Tumor 8 handelte es sich nämlich um einen WHO-Grad-II-Tumor, alle anderen Gewebeproben waren WHO-Grad III. In unseren Untersuchungen stellte sich diese Gewebeprobe auch in ihrem Profil als verschieden von den anderen Gewebeproben dar. Die Signale der Isoformen $Na_v1.1$ und $Na_v1.3$ waren deutlich stärker als in den übrigen Gewebeproben dieser Gruppe, $Na_v1.6$ ist ausschließlich in dieser Probe nachweisbar, was möglicherweise wie oben beschrieben in Zusammenhang mit einer besseren Differenzierung der astrozytären Tumorzellen steht. Einschränkend ist zu sagen, dass es sich nur um eine Einzelbeobachtung handelt, die an größeren Fallzahlen überprüft werden müsste. Die Glioblastome als bösartigste Tumorentität zeigten die geringste Anzahl an unterschiedlichen Isoformen. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den in der Literatur bekannten Daten. So konnte gezeigt werden, dass Glioblastomzellen sowohl in lebenden Schnitten von Tumorgewebe als auch *in vitro* zu Beginn der Kultivierung spannungssensitive Natriumkanäle funktionell exprimieren (Labrakakis *et al.* 1997). Dabei konnten Kanaldichten gefunden werden, die es den Zellen ermöglichten, unter bestimmten Bedingungen Aktionspotentiale zu generieren. Im Vergleich mit den oben genannten Untersuchungen an Oligodendrogliomen (Patt *et al.* 1996) fand sich in den Glioblastomzellen jedoch eine niedrigere Dichte von spannungssensitiven Natriumkanälen. Auch eine Studie, die sich vorrangig mit der Elektrophysiologie von Chlorid-Kanälen in Glioblastomen befasste (Ullrich *et al.* 1998), konnte neben einem Anstieg der Chloridströme eine Abnahme der Natriumströme mit zunehmendem Malignitätsgrad feststellen, was – vorausgesetzt, die nachgewiesenen Signalstärken korrelierten mit funktionell aktiven Kanälen - auch mit unseren Untersuchungen in Übereinstimmung wäre.

Es ist darüber hinaus bekannt, dass es zumindest zwei molekulargenetisch voneinander zu unterscheidende Subtypen von Glioblastomen gibt. Zum einen handelt es sich um die so genannten „primären“ *de novo* entstandenen Glioblastome bei älteren Patienten, und zum anderen die „sekundären“ durch Malignisierung aus niedriggradigeren Astrozytomen hervorgegangenen Glioblastome, die bei jüngeren Patienten auftreten, und bei denen es sich wahrscheinlich um zwei unterschiedliche Krankheitsbilder handelt (Kleihues und Ohgaki 1999). Unbekannt ist, ob und in wie weit sich diese beiden Subtypen in ihrer Ausstattung mit spannungssensitiven Natriumkanälen unterscheiden. Möglicherweise sind die teilweise heterogen ausfallenden Messwerte für eine Isoform innerhalb der Glioblastome Ausdruck der Zugehörigkeit zu verschiedenen Subtypen. Allerdings gehören die beiden für $\text{Na}_v1.1$ -positive Tumoren (14 und 15) nicht zu einem solchen Subtyp des sekundären Glioblastoms, wie die vorhandenen klinischen Angaben belegen.

8.4 Die Rolle von spannungssensitiven Natriumkanälen in Gliomen

Eine Vielzahl von Ionenkanälen ist in Gliomen bisher nachgewiesen und auf ihre Funktion hin untersucht worden. Dazu zählen beispielsweise spannungssensitive Kaliumkanäle (Bordey und Sontheimer 1998; Brismar und Collins 1989; Labrakakis et al. 1997), Chloridkanäle (Basrai et al. 2002; Olsen et al. 2003; Ullrich et al. 1998) und kalziumabhängige Kaliumkanäle (Basrai et al. 2002). Diese Kanäle wurden mit Tumorphänomenen wie Proliferation und Migration in Verbindung gebracht. Es stellt sich die Frage, welche Funktion die spannungssensitiven Natriumkanäle in Gliomen haben. Bekanntermaßen sind sie in Neuronen für die elektrische Informationsverarbeitung zuständig. Wie bereits beschrieben, existieren verschiedene Thesen über die Rolle dieser Proteine in nicht-neoplastischen glialen Zellen (Sontheimer et al. 1996). Die (patho-)physiologische Bedeutung der spannungssensitiven Natriumkanäle in Gliomen ist bisher enigmatisch geblieben. Möglicherweise spielen auch sie eine Rolle in den oben genannten Prozessen, die im Rahmen der Tumorgenese eine Bedeutung haben. Darüber hinaus könnten sie auch für tumorbegleitende Phänomene wie beispielsweise symptomatische Epilepsien verantwortlich sein. Schließlich ist es denkbar, dass die Expression von spannungssensitiven Natriumkanälen in Gliomen gewisse Markerfunktionen haben könnte, deren Signifikanz noch unklar ist. Im Folgenden sollen nun die genannten Prozesse im Einzelnen näher beleuchtet und auf unsere Ergebnisse bezogen werden.

8.4.1 Proliferation

Möglicherweise beeinflussen spannungssensitive Natriumkanäle den Prozess der Proliferation auf verschiedenen Ebenen. Es existieren verschiedene Hypothesen zum Zusammenwirken von Ionenkanälen und der Beeinflussung von mitotischer Aktivität. Bekannt ist, dass proliferierende Zellen stärker depolarisiert sind als ruhende Zellen (Cone, Jr. 1970). Über den Mechanismus der Depolarisation ist eine Änderung der intrazellulären Natriumionenkonzentration im Sinne einer Erhöhung möglich. MacFarlane und Sontheimer (2000) konnten in Untersuchungen über die Beeinflussung des Zellzyklus durch Ionenkanäle an Astrozyten zeigen, dass eine Blockade der spannungssensitiven Natriumkanäle in S-Phase-Zellen mittels TTX zu keiner Beeinflussung des Zellzyklus führte. Dies könnte bedeuten, dass die in unseren Untersuchungen nachgewiesenen Natriumkanäle, von Na_x abgesehen, bei welchem die TTX-Sensitivität noch unklar ist, wahrscheinlich keine herausragende Rolle für die Regulation der Proliferation spielen. Insbesondere bei den malignen, rasch wachsenden Tumoren mit hoher Proliferation hätten wir sonst eine Steigerung der Dichte von spannungssensitiven Natriumkanälen erwartet. Wie oben beschrieben verfügen Gliazellen über effiziente andere Transportwege für Natriumionen neben den spannungssensitiven Natriumkanälen. Dagegen zeigte eine Blockade der Na^+/K^+ -ATPase durch Ouabain und damit dem Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration eine Proliferationsinduktion *in vitro* bei Astrozyten (Murata *et al.* 1996) und oligodendrozytären Vorläuferzellen (Knutson *et al.* 1997). Dass eine solche Erhöhung nicht zwangsläufig zur Proliferation führt, zeigen Untersuchungen, in denen Lymphozyten in ihrer Proliferation durch den selben Mechanismus gehemmt werden konnten (Pieri *et al.* 1992; Pires *et al.* 1997). Wahrscheinlich wird durch einen geringen Natriumionenfluss auch eine Änderung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration über die Wirkung eines Natrium/Kalziumaustauschers vermittelt. Kalziumionen können als potente Protagonisten Second-Messenger-Kaskaden in der Zelle anstoßen, die schließlich auch zur Proliferation führen können. Murata *et al.* (1996) konnten allerdings in den oben genannten Untersuchungen auch in kalziumfreier Lösung eine Proliferation nachweisen, so dass die Wirkung unter Umständen auch direkt durch Natriumionen ausgelöst werden kann.

8.4.2 Invasion und Motilität

Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Ausstattung mit spannungssensitiven Natriumkanälen und der Fähigkeit zur Invasion und Motilität von Tumorzellen (Mummery *et al.* 1982). Die Bedeutung von spannungssensitiven Natriumkanälen für Zellproliferations- und Migrationsvorgänge ist insbesondere in eingehenden Untersuchungen an Prostatakarzinomen (Abdul und Hoosein 2002b; Fraser *et al.* 1999; Fraser *et al.* 2000; Fraser *et al.* 2003; Grimes *et al.* 1995; Grimes und Djamgoz 1998; Laniado *et al.* 1997; Mycielska *et al.* 2003; Smith *et al.* 1998b) und Mammakarzinomzellen (Roger *et al.* 2003) bearbeitet worden. So konnte gezeigt werden, dass in zwei verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien der Ratte unterschiedliche Ausstattungen mit spannungssensitiven Natriumkanälen vorliegen. Klinisch unterschieden sich die untersuchten Zelllinien Mat-LyLu und AT-2 in ihrer Metastasierungsrate. Mat-LyLu Zellen exprimierten spannungssensitive Natriumkanäle, deren Blockade durch TTX eine signifikante Reduzierung der Invasionsfähigkeit bewirkte (Grimes *et al.* 1995). Gleiches konnte auch an menschlichen Prostatakarzinomzelllinien gezeigt werden (Abdul und Hoosein 2002a; Laniado *et al.* 1997). Diss *et al.* (1998) konnten auch die von uns in keiner einzigen Tumor- oder nicht-neoplastischen Probe nachweisbaren Isoform $Na_v1.4$ in Prostatakarzinomzellen nachweisen. Auch eine Beeinflussung der Zellmorphologie in Richtung metastasierender Zellen durch Natriumkanalaktivität, d.h. durch Änderung der intrazellulären Natriumkonzentration konnte an Prostatakarzinomzellen nachgewiesen werden (Fraser *et al.* 1999). In den genannten Untersuchungen zeigte TTX jedoch keine Beeinflussung der Proliferation der Zelllinien Mat-LyLu bzw. AT-2. Dagegen fanden Abdul und Hoosein (2002) eine Wachstumsstimulation in den von ihnen untersuchten menschlichen Zellen. Neuere Untersuchungen von Diss *et al.* (2001) legen den Schluss nahe, dass $Na_v1.7$, eine TTX-sensitive Isoform aus Schwann-Zellen, die für diese Phänomene entscheidende Isoform ist. Ein Nachweis von $Na_v1.7$ in humanen Gliomen steht noch aus. Darüber hinaus waren auch alle von uns untersuchten Isoformen mit Ausnahme von Na_x in den Prostatakarzinomzelllinien nachweisbar, und zwar in den metastasierenden Zellen in höherer Konzentration als in den wenig metastasierenden Zellen (Diss *et al.* 2001). Man könnte spekulieren, dass zumindest in den untersuchten Zellen die spannungssensitiven Natriumkanäle für die *Invasivität* mitverantwortlich sind, für die *Proliferation* der Zellen an sich aber eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen.

Im Gegensatz dazu fanden wir bei den humanen Gliomen eine *Reduzierung* der spannungssensitiven Natriumkanäle in den höhergradigen und somit invasiveren Tumoren. Wahrscheinlich spielen auch hier andere Faktoren bei der Bestimmung der Invasivität die entscheidendere Rolle. Bekannt ist beispielsweise, dass spannungssensitiven Chloridkanälen eine Rolle bei der Motilität von Gliomzellen zukommt, indem sie den Zellen eine Verformung durch Volumenänderung ermöglichen (Sontheimer 2004).

Möglicherweise kommt für den Metastasierungsprozess den β -Untereinheiten der Kanäle eine Bedeutung zu. So konnte nachgewiesen werden, dass die β -Untereinheiten der Kanäle auch eine Rolle bei der Zell-Adhäsion spielen (Isom 2001; Malhotra et al. 2000; Srinivasan et al. 1998). Da diese Untereinheiten mit den α -Untereinheiten assoziiert sind, fällt möglicherweise ihre adhäsive Funktion mit dem Fehlen der α -Untereinheiten in höhergradigen Tumoren weg. Die Expression dieser β -Untereinheiten in Gliomen müsste weiter untersucht werden.

8.4.3 Tumor-assoziierte Epilepsie

Es ist bekannt, dass Patienten mit Hirntumoren symptomatische Epilepsien entwickeln können, obwohl die Ursache hierfür nicht vollständig bekannt ist. Insbesondere niedriggradige Gliome sind mit diesem Phänomen assoziiert. Verschiedene Arbeiten haben sich mit der Ursache dieser Epilepsien auseinandergesetzt, wobei das Hauptaugenmerk auf den den Tumor umgebenden Zellen gelegen war (vgl. Patt *et al.* 2000). Möglicherweise kommen jedoch auch Tumorzellen selbst als Auslöser für Epilepsien in Frage. Wie beschrieben, konnten in verschiedenen Tumoren elektrophysiologisch Zellen untersucht werden, die zur Generierung von Aktionspotentialen in der Lage waren (Bordey und Sontheimer 1998; Labrakakis et al. 1997; Labrakakis et al. 1998; Patt et al. 1996; Ullrich et al. 1998). In unseren Untersuchungen fanden wir gerade bei niedriggradigen Tumoren eine höhere Signalstärke der typischerweise im ZNS vorkommenden Isoformen im Vergleich mit den malignen Tumorentitäten. Allein dies könnte möglicherweise im Zusammenhang mit einer gesteigerten Exzitabilität innerhalb der Tumoren stehen. Andererseits zeigt der Vergleich zwischen dem gesunden Kontrollgewebe (GG) und den Messwerten der Tumoren, dass die Signalstärken für $\text{Na}_v1.1$ und $\text{Na}_v1.2$ nur gering von denen der Kontrolle abweichen. Es konnte verschiedentlich gezeigt werden, dass Mutationen in beiden Genen (SCN1A und SCN2A) für verschiedene, nicht tu-

mor-assoziierte Epilepsien verantwortlich sind (u. a. Escayg *et al.* 2000; Kearney *et al.* 2001). Unsere Primer waren nicht dafür geeignet, diese Mutationen nachzuweisen. Darüber hinaus standen detaillierte klinische Daten über etwaige Epilepsien bei den operierten Patienten zur Auswertung leider nicht zur Verfügung. Dennoch ist es denkbar, dass mutierte Isoformen der spannungssensitiven Natriumkanäle generell dazu in der Lage sind, Epilepsien zu verursachen. Ob diese Mutationen allerdings *Folge* der Tumorgenese sind, ist fraglich. So wird von manchen Autoren im Hinblick auf die wahrscheinlich in vivo herrschende Inaktivierbarkeit der Kanäle aufgrund des anliegenden Ruhepotentials der Tumorzellen bezweifelt, dass die spannungssensitiven Natriumkanäle eine solche Bedeutung spielen können (Bordey und Sontheimer 1998).

Unsere Proben stellen eine Stichprobe aus den Tumorzellen jedes untersuchten Glioms darstellen. So ist bekannt, dass verschiedene Populationen innerhalb eines Glioms nebeneinander existieren (Loeper *et al.* 2001), die funktionell unterschiedlich aktiv sein könnten. Das heißt, dass möglicherweise nur eine bestimmte Tumorzellpopulation mit Exzitabilität assoziiert ist. Gleiches trifft auch für die Punkte Proliferation und Invasion zu. Die zur Invasion befähigten Tumorzellen bieten möglicherweise ein anderes Kanalprofil als ruhende Tumorzellen. Diese Unterschiede können bereits am unterschiedlichen Profil der Proben IZ und Tumor 13 beobachtet werden (s.o.). Es sind Untersuchungen an Zellen von genau definierten Anteilen innerhalb eines Tumors vonnöten, um hier größere Klarheit zu erlangen.

8.4.4 Subtypisierungen

Innerhalb der untersuchten Tumorgruppen traten einzelne Proben auf, die aus dem Bild der jeweiligen Gruppe heraus fielen. Aufgrund der geringen Stichprobenumfänge ist es gut möglich, dass es sich hierbei um statistische Ausreißer handelt. Andererseits ist es denkbar, dass es sich hierbei um einen Subtyp innerhalb der Gruppe handeln könnte, der z.B. einen andersartigen klinischen Verlauf nimmt. Beispiele hierfür sind zum Teil schon oben erwähnt worden (Tumoren 14 und 15, Glioblastome, 39-jährig im Vergleich zum mittleren Alter der Gruppe von 60,6; Tumor 8, WHO Grad II Oligoastrozytom). Ein weiteres Beispiel ist Tumor 10, anaplastisches Oligoastrozytom eines 10-jährigen Jungen, als einzige Probe eines malignen Tumors mit nachweisbarem Signal für Na_x . Obgleich eine Aussage über die Bedeutung dieser Beobachtungen aus o.g. Grund nicht möglich ist, wäre eine Untersuchung an größe-

ren Probenkontingenten sinnvoll, um eine mögliche Signifikanz dieser Befunde zu verifizieren.

9 Schlussfolgerungen

ZNS-Isoformen von spannungssensitiven Natriumkanälen ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.6$), sowie die atypische Isoform Na_x sind in Zellen verschiedener glialer Tumoren auf mRNA/cDNA-Ebene nachweisbar. Die Stärke der gemessenen Signale korreliert mit der Tumorentität. In Übereinstimmung mit elektrophysiologischen Untersuchungen finden sich in malignen Tumoren schwächere Signale als in benignen Tumoren.

Den Isoformen $Na_v1.6$ und Na_x scheint – bei eingeschränkter Aussagefähigkeit wegen des geringen Stichprobenumfangs – eine gewisse Markerfunktion zuzukommen: $Na_v1.6$ fand sich in allen Proben der gut differenzierten, benignen pilozytischen Astrozytome. Dagegen zeigten nur zwei WHO Grad II Proben ebenfalls diese Isoform, obwohl sie die im ZNS am häufigsten vorkommende ist. Ein Fehlen dieser Isoform spricht möglicherweise für das Vorliegen eines malignen, entdifferenzierten Tumors. Na_x ist eine atypische Isoform. Ihr Vorkommen in nahezu allen benignen astrozytären Tumoren lässt und vermuten, dass auch sie eine Markerfunktion erfüllen könnte. Die ursprüngliche Annahme, es handle sich um eine glia-spezifische Isoform, könnte durch den Nachweis in glialen, gut differenzierten Tumoren, untermauert werden. $Na_v1.3$ wird insbesondere nach Verletzungen verstärkt exprimiert. Unsere Ergebnisse legen darüber hinaus nahe, dass auch eine Astrogliose zur Heraufregulierung dieser Isoform führen kann, und $Na_v1.3$ somit als Gliose-Marker dienen könnte.

Ob spannungssensitive Natriumkanäle in Gliomen eine Rolle für Proliferation und Invasivität spielen, wie bei anderen Tumoren nachgewiesen, ist eher fraglich, da wahrscheinlich andere Faktoren diese Phänomene in überwiegendem Maße beeinflussen werden und im Gegensatz zu anderen Tumoren gerade in den höhergradigen Gliomen eine vergleichsweise geringere Dichte an Kanälen vorzuliegen scheint. Dagegen könnten die spannungssensitiven Natriumkanäle in den niedriggradigen Gliomen mit für die Entstehung von Tumor-assoziiertes Epilepsie verantwortlich sein.

Möglicherweise können durch ihr besonderes Kanalprofil gekennzeichnete Tumorproben zu Subtypen gehören, die eine besondere klinische Relevanz haben könnten. Hierzu wie auch zu den anderen Punkten sind weitere Untersuchungen – beispielsweise mittels *in-situ*-Hybridierung oder Immunhistochemie – erforderlich.

10 Literaturverzeichnis

- Abdul, M. und Hoosein, N. (2002a) Voltage-gated potassium ion channels in colon cancer. *Oncol Rep* **9**, 961-964.
- Abdul, M. und Hoosein, N. (2002b) Voltage-gated sodium ion channels in prostate cancer: expression and activity. *Anticancer Res* **22**, 1727-1730.
- Agnew, W. S., Moore, A. C., Levinson, S. R., und Raftery, M. A. (1980) Identification of a large molecular weight peptide associated with a tetrodotoxin binding protein from the electroplax of *Electrophorus electricus*. *Biochem Biophys Res Commun* **92**, 860-866.
- Akopian, A. N., Souslova, V., Sivilotti, L., und Wood, J. N. (1997) Structure and distribution of a broadly expressed atypical sodium channel. *FEBS Lett* **400**, 183-187.
- Basrai, D., Kraft, R., Bollensdorff, C., Liebmann, L., Benndorf, K., und Patt, S. (2002) BK channel blockers inhibit potassium-induced proliferation of human astrocytoma cells. *Neuroreport* **13**, 403-407.
- Beckh, S., Noda, M., Lubbert, H., und Numa, S. (1989) Differential regulation of three sodium channel messenger RNAs in the rat central nervous system during development. *EMBO J* **8**, 3611-3616.
- Bevan, S., Chiu, S. Y., Gray, P. T., und Ritchie, J. M. (1985) The presence of voltage-gated sodium, potassium and chloride channels in rat cultured astrocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **225**, 299-313.
- Binggeli, R. und Weinstein, R. C. (1986) Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *J Theor Biol* **123**, 377-401.
- Black, J. A., Yokoyama, S., Higashida, H., Ransom, B. R., und Waxman, S. G. (1994a) Sodium channel mRNAs I, II and III in the CNS: cell-specific expression. *Brain Res Mol Brain Res* **22**, 275-289.
- Black, J. A., Yokoyama, S., Waxman, S. G., Oh, Y., Zur, K. B., Sontheimer, H., Higashida, H., und Ransom, B. R. (1994b) Sodium channel mRNAs in cultured spinal cord astrocytes: in situ hybridization in identified cell types. *Brain Res Mol Brain Res* **23**, 235-245.
- Boiko, T., Rasband, M. N., Levinson, S. R., Caldwell, J. H., Mandel, G., Trimmer, J. S., und Matthews, G. (2001) Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon. *Neuron* **30**, 91-104.
- Bordey, A. und Sontheimer, H. (1998) Electrophysiological properties of human astrocytic tumor cells In situ: enigma of spiking glial cells. *J Neurophysiol* **79**, 2782-2793.
- Bordey, A. und Sontheimer, H. (2000) Ion channel expression by astrocytes in situ: comparison of different CNS regions. *Glia* **30**, 27-38.

- Brismar, T. und Collins, V. P. (1989) Potassium and sodium channels in human malignant glioma cells. *Brain Res* **480**, 259-267.
- Caldwell, J. H., Schaller, K. L., Lasher, R. S., Peles, E., und Levinson, S. R. (2000) Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of ranvier, dendrites, and synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5616-5620.
- Catterall, W. A. (1993) Structure and function of voltage-gated ion channels. *Trends Neurosci* **16**, 500-506.
- Catterall, W. A. (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **26**, 13-25.
- Chahine, M., Bennett, P. B., George, A. L., Jr., und Horn, R. (1994) Functional expression and properties of the human skeletal muscle sodium channel. *Pflugers Arch* **427**, 136-142.
- Chandy, K. G. (1991) Simplified gene nomenclature. *Nature* **352**, 26.
- Chao, T. I., Skachkov, S. N., Eberhardt, W., und Reichenbach, A. (1994) Na⁺ channels of Muller (glial) cells isolated from retinae of various mammalian species including man. *Glia* **10**, 173-185.
- Chiu, S. Y., Schrager, P., und Ritchie, J. M. (1984) Neuronal-type Na⁺ and K⁺ channels in rabbit cultured Schwann cells. *Nature* **311**, 156-157.
- Cone, C. D., Jr. (1970) Variation of the transmembrane potential level as a basic mechanism of mitosis control. *Oncology* **24**, 438-470.
- Coward, K., Aitken, A., Powell, A., Plumpton, C., Birch, R., Tate, S., Bountra, C., und Anand, P. (2001) Plasticity of TTX-sensitive sodium channels PN1 and brain III in injured human nerves. *Neuroreport* **12**, 495-500.
- Deerinck, T. J., Levinson, S. R., Bennett, G. V., und Ellisman, M. H. (1997) Clustering of voltage-sensitive sodium channels on axons is independent of direct Schwann cell contact in the dystrophic mouse. *J Neurosci* **17**, 5080-5088.
- Denac, H., Mevissen, M., und Scholtysik, G. (2000) Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **362**, 453-479.
- Dib-Hajj, S. D., Tyrrell, L., Cummins, T. R., Black, J. A., Wood, P. M., und Waxman, S. G. (1999) Two tetrodotoxin-resistant sodium channels in human dorsal root ganglion neurons. *FEBS Lett* **462**, 117-120.
- Diss, J. K., Archer, S. N., Hirano, J., Fraser, S. P., und Djamgoz, M. B. (2001) Expression profiles of voltage-gated Na⁽⁺⁾ channel alpha-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. *Prostate* **48**, 165-178.
- Diss, J. K., Stewart, D., Fraser, S. P., Black, J. A., Dib-Hajj, S., Waxman, S. G., Archer, S. N., und Djamgoz, M. B. (1998) Expression of skeletal muscle-type voltage-gated Na⁺ channel in rat and human prostate cancer cell lines. *FEBS Lett* **427**, 5-10.

- Djamgoz, M. B. A., Mycielska, M., Madeja, Z., Fraser, S. P., und Korohoda, W. (2001) Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltage-gated Na⁺ channel activity. *J Cell Sci* **114**, 2697-2705.
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R. W., und Catterall, W. A. (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**, 533-535.
- Escayg, A., MacDonald, B. T., Meisler, M. H., Baulac, S., Huberfeld, G., An-Gourfinkel, I., Brice, A., LeGuern, E., Moulard, B., Chaigne, D., Buresi, C., und Malafosse, A. (2000) Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet* **24**, 343-345.
- Felipe, A., Knittle, T. J., Doyle, K. L., und Tamkun, M. M. (1994) Primary structure and differential expression during development and pregnancy of a novel voltage-gated sodium channel in the mouse. *J Biol Chem* **269**, 30125-30131.
- Felts, P. A., Yokoyama, S., Dib-Hajj, S., Black, J. A., und Waxman, S. G. (1997) Sodium channel alpha-subunit mRNAs I, II, III, NaG, Na6 and hNE (PN1): different expression patterns in developing rat nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* **45**, 71-82.
- Fraser, S. P., Ding, Y., Liu, A., Foster, C. S., und Djamgoz, M. B. (1999) Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic MAT-LyLu rat prostate cancer cell line. *Cell Tissue Res* **295**, 505-512.
- Fraser, S. P., Grimes, J. A., und Djamgoz, M. B. (2000) Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines. *Prostate* **44**, 61-76.
- Fraser, S. P., Salvador, V., Manning, E. A., Mizal, J., Altun, S., Raza, M., Berridge, R. J., und Djamgoz, M. B. (2003) Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility. *J Cell Physiol* **195**, 479-487.
- Gautron, S., Dos, S. G., Pinto-Henrique, D., Koulakoff, A., Gros, F., und Berwald-Netter, Y. (1992) The glial voltage-gated sodium channel: cell- and tissue-specific mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7272-7276.
- Gellens, M. E., George, A. L., Jr., Chen, L. Q., Chahine, M., Horn, R., Barchi, R. L., und Kallen, R. G. (1992) Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 554-558.
- George, A. L., Jr., Knittle, T. J., und Tamkun, M. M. (1992a) Molecular cloning of an atypical voltage-gated sodium channel expressed in human heart and uterus: evidence for a distinct gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4893-4897.
- George, A. L., Jr., Komisarof, J., Kallen, R. G., und Barchi, R. L. (1992b) Primary structure of the adult human skeletal muscle voltage-dependent sodium channel. *Ann Neurol* **31**, 131-137.

- Goldin, A. L. (1999) Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels. *Ann N Y Acad Sci* **868**, 38-50.
- Goldin, A. L. (2001) Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* **63**, 871-894.
- Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., Kallen, R. G., Mandel, G., Meisler, M. H., Netter, Y. B., Noda, M., Tamkun, M. M., Waxman, S. G., Wood, J. N., und Catterall, W. A. (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **28**, 365-368.
- Gong, B., Rhodes, K. J., Bekele-Arcuri, Z., und Trimmer, J. S. (1999) Type I and type II Na(+) channel alpha-subunit polypeptides exhibit distinct spatial and temporal patterning, and association with auxiliary subunits in rat brain. *J Comp Neurol* **412**, 342-352.
- Gordon, D., Merrick, D., Auld, V., Dunn, R., Goldin, A. L., Davidson, N., und Catterall, W. A. (1987) Tissue-specific expression of the RI and RII sodium channel subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8682-8686.
- Grimes, J. A. und Djamgoz, M. B. (1998) Electrophysiological characterization of voltage-gated Na⁺ current expressed in the highly metastatic Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer. *J Cell Physiol* **175**, 50-58.
- Grimes, J. A., Fraser, S. P., Stephens, G. J., Downing, J. E., Laniado, M. E., Foster, C. S., Abel, P. D., und Djamgoz, M. B. (1995) Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett* **369**, 290-294.
- Guan, M., Su, B., und Lu, Y. (2002) Quantitative reverse transcription-PCR measurement of tissue factor mRNA in glioma. *Mol Biotechnol* **20**, 123-129.
- Hains, B. C., Klein, J. P., Saab, C. Y., Craner, M. J., Black, J. A., und Waxman, S. G. (2003) Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurosci* **23**, 8881-8892.
- Hiyama, T. Y., Watanabe, E., Ono, K., Inenaga, K., Tamkun, M. M., Yoshida, S., und Noda, M. (2002) Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat Neurosci* **5**, 511-512.
- Horikoshi, T. und Sakakibara, M. (2000) Quantification of relative mRNA expression in the rat brain using simple RT-PCR and ethidium bromide staining. *J Neurosci Methods* **99**, 45-51.
- Inoue, H., Kimura, A., und Tuji, T. (2002) Degradation profile of mRNA in a dead rat body: basic semi-quantification study. *Forensic Sci Int* **130**, 127-132.
- Isom, L. L. (2001) Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* **7**, 42-54.
- Isom, L. L., De Jongh, K. S., und Catterall, W. A. (1994) Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron* **12**, 1183-1194.

- Jacobson, A. (1987) Purification and fractionation of poly(A)⁺ RNA. *Methods Enzymol* **152**, 254-261.
- Jeong, S.-Y., Goto, J., and Kanazawa I. Cloning of cDNA for human voltage-gated sodium channel alpha subunit, SCN3A. 2001.
- Jesnowski, R., Backhaus, C., Ringel, J., und Lohr, M. (2002) Ribosomal highly basic 23-kDa protein as a reliable standard for gene expression analysis. *Pancreatology* **2**, 421-424.
- Kaplan, M. R., Cho, M. H., Ullian, E. M., Isom, L. L., Levinson, S. R., und Barres, B. A. (2001) Differential control of clustering of the sodium channels Na(v)1.2 and Na(v)1.6 at developing CNS nodes of Ranvier. *Neuron* **30**, 105-119.
- Kearney, J. A., Plummer, N. W., Smith, M. R., Kapur, J., Cummins, T. R., Waxman, S. G., Goldin, A. L., und Meisler, M. H. (2001) A gain-of-function mutation in the sodium channel gene *Scn2a* results in seizures and behavioral abnormalities. *Neuroscience* **102**, 307-317.
- Kleihues, P. and Cavenee, W. K. (2000) *Pathology and Genetics - Tumours of the Nervous System*. IARCPress: Lyon.
- Kleihues, P., Kiessling, M., and Wiestler, O. D. (1997) Tumoren des Nervensystems. In: *Pathologie*, pp. 300-315. Eds W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz. Urban und Schwarzenberg: München, Wien, Baltimore.
- Kleihues, P. und Ohgaki, H. (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncol* **1**, 44-51.
- Klugbauer, N., Lacinova, L., Flockerzi, V., und Hofmann, F. (1995) Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. *EMBO J* **14**, 1084-1090.
- Knerr, I., Schuster, S., Nomikos, P., Buchfelder, M., Dotsch, J., Schoof, E., Fahlbusch, R., und Rascher, W. (2001) Gene expression of adrenomedullin, leptin, their receptors and neuropeptide Y in hormone-secreting and non-functioning pituitary adenomas, meningiomas and malignant intracranial tumours in humans. *Neuropathol Appl Neurobiol* **27**, 215-222.
- Knutson, P., Ghiani, C. A., Zhou, J. M., Gallo, V., und McBain, C. J. (1997) K⁺ channel expression and cell proliferation are regulated by intracellular sodium and membrane depolarization in oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosci* **17**, 2669-2682.
- Kraft, R., Krause, P., Jung, S., Basrai, D., Liebmann, L., Bolz, J., und Patt, S. (2003) BK channel openers inhibit migration of human glioma cells. *Pflugers Arch* **446**, 248-255.
- Krzemien, D. M., Schaller, K. L., Levinson, S. R., und Caldwell, J. H. (2000) Immunolocalization of sodium channel isoform NaCh6 in the nervous system. *J Comp Neurol* **420**, 70-83.

- Labrakakis, C., Patt, S., Hartmann, J., und Kettenmann, H. (1998) Glutamate receptor activation can trigger electrical activity in human glioma cells. *Eur J Neurosci* **10**, 2153-2162.
- Labrakakis, C., Patt, S., Weydt, P., Cervos-Navarro, J., Meyer, R., und Kettenmann, H. (1997) Action potential-generating cells in human glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 243-254.
- Laniado, M. E., Lalani, E. N., Fraser, S. P., Grimes, J. A., Bhangal, G., Djamgoz, M. B., und Abel, P. D. (1997) Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *Am J Pathol* **150**, 1213-1221.
- Loeper, S., Romeike, B. F., Heckmann, N., Jung, V., Henn, W., Feiden, W., Zang, K. D., und Urbschat, S. (2001) Frequent mitotic errors in tumor cells of genetically micro-heterogeneous glioblastomas. *Cytogenet Cell Genet* **94**, 1-8.
- Lu, C. M., Han, J., Rado, T. A., und Brown, G. B. (1992) Differential expression of two sodium channel subtypes in human brain. *FEBS Lett* **303**, 53-58.
- MacDonald, R. J., Swift, G. H., Przybyla, A. E., und Chirgwin, J. M. (1987) Isolation of RNA using guanidinium salts. *Methods Enzymol* **152**, 219-227.
- MacFarlane, S. N. und Sontheimer, H. (2000) Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes. *Glia* **30**, 39-48.
- MacVicar, B. A. (1984) Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science* **226**, 1345-1347.
- Malhotra, J. D., Kazen-Gillespie, K., Hortsch, M., und Isom, L. L. (2000) Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *J Biol Chem* **275**, 11383-11388.
- Mandler, R. N., Seamer, L. C., Whitlinger, D., Lennon, M., Rosenberg, E., und Bankhurst, A. D. (1990) Human natural killer cells express Na⁺ channels. A pharmacologic flow cytometric study. *J Immunol* **144**, 2365-2370.
- Marban, E., Yamagishi, T., und Tomaselli, G. F. (1998) Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol* **508 (Pt 3)**, 647-657.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.
- Mummery, C. L., Boonstra, J., van der Saag, P. T., und de Laat, S. W. (1982) Modulations of Na⁺ transport during the cell cycle of neuroblastoma cells. *J Cell Physiol* **112**, 27-34.
- Murata, Y., Matsuda, T., Tamada, K., Hosoi, R., Asano, S., Takuma, K., Tanaka, K., und Baba, A. (1996) Ouabain-induced cell proliferation in cultured rat astrocytes. *Jpn J Pharmacol* **72**, 347-353.

- Mycielska, M. E., Fraser, S. P., Szatkowski, M., und Djamgoz, M. B. (2003) Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: II. Secretory membrane activity. *J Cell Physiol* **195**, 461-469.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., und . (1984) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**, 121-127.
- Ogata, K., Jeong, S. Y., Murakami, H., Hashida, H., Suzuki, T., Masuda, N., Hirai, M., Isahara, K., Uchiyama, Y., Goto, J., und Kanazawa, I. (2000) Cloning and expression study of the mouse tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel alpha subunit NaT/Scn11a. *Biochem Biophys Res Commun* **267**, 271-277.
- Ogata, N. und Ohishi, Y. (2002) Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *Jpn J Pharmacol* **88**, 365-377.
- Oh, Y., Black, J. A., und Waxman, S. G. (1994) The expression of rat brain voltage-sensitive Na⁺ channel mRNAs in astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* **23**, 57-65.
- Olsen, M. L., Schade, S., Lyons, S. A., Amaral, M. D., und Sontheimer, H. (2003) Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells. *J Neurosci* **23**, 5572-5582.
- Pancrazio, J. J., Viglione, M. P., Tabbara, I. A., und Kim, Y. I. (1989) Voltage-dependent ion channels in small-cell lung cancer cells. *Cancer Res* **49**, 5901-5906.
- Patt, S., Labrakakis, C., Bernstein, M., Weydt, P., Cervos-Navarro, J., Nisch, G., und Kettenmann, H. (1996) Neuron-like physiological properties of cells from human oligodendroglial tumors. *Neuroscience* **71**, 601-611.
- Patt, S., Steenbeck, J., Hochstetter, A., Kraft, R., Huonker, R., Haueisen, J., Haberland, N., Ebmeier, K., Hliscs, R., Fiehler, J., Nowak, H., und Kalff, R. (2000) Source localization and possible causes of interictal epileptic activity in tumor-associated epilepsy. *Neurobiol Dis* **7**, 260-269.
- Pieri, C., Recchioni, R., Moroni, F., Marcheselli, F., Falasca, M., Krasznai, Z., Gaspar, R., Matyus, L., und Damjanovich, S. (1992) A sodium channel opener inhibits stimulation of human peripheral blood mononuclear cells. *Mol Immunol* **29**, 517-524.
- Pires, V., Harab, R. C., Olej, B., und Rumjanek, V. M. (1997) Ouabain effects on activated lymphocytes: augmentation of CD25 expression on TPA-stimulated cells and of CD69 on PHA-and TPA-stimulated cells. *Int J Immunopharmacol* **19**, 143-148.
- Plummer, N. W., Galt, J., Jones, J. M., Burgess, D. L., Sprunger, L. K., Kohrman, D. C., und Meisler, M. H. (1998) Exon organization, coding sequence, physical mapping, and polymorphic intragenic markers for the human neuronal sodium channel gene SCN8A. *Genomics* **54**, 287-296.
- Plummer, N. W. und Meisler, M. H. (1999) Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics* **57**, 323-331.

- Potts, J. F., Regan, M. R., Rochelle, J. M., Seldin, M. F., und Agnew, W. S. (1993) A glial-specific voltage-sensitive Na channel gene maps close to clustered genes for neuronal isoforms on mouse chromosome 2. *Biochem Biophys Res Commun* **197**, 100-104.
- Preussat, K., Beetz, C., Schrey, M., Kraft, R., Wolfl, S., Kalff, R., und Patt, S. (2003) Expression of voltage-gated potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 in human gliomas. *Neurosci Lett* **346**, 33-36.
- Rabert, D. K., Koch, B. D., Ilnicka, M., Obernolte, R. A., Naylor, S. L., Herman, R. C., Eglen, R. M., Hunter, J. C., und Sangameswaran, L. (1998) A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel from human dorsal root ganglia, hPN3/SCN10A. *Pain* **78**, 107-114.
- Raman, I. M., Sprunger, L. K., Meisler, M. H., und Bean, B. P. (1997) Altered subthreshold sodium currents and disrupted firing patterns in Purkinje neurons of Scn8a mutant mice. *Neuron* **19**, 881-891.
- Roger, S., Besson, P., und Le Guennec, J. Y. (2003) Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* **1616**, 107-111.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Sangameswaran, L., Fish, L. M., Koch, B. D., Rabert, D. K., Delgado, S. G., Ilnicka, M., Jakeman, L. B., Novakovic, S., Wong, K., Sze, P., Tzoumaka, E., Stewart, G. R., Herman, R. C., Chan, H., Eglen, R. M., und Hunter, J. C. (1997) A novel tetrodotoxin-insensitive, voltage-gated sodium channel expressed in rat and human dorsal root ganglia. *J Biol Chem* **272**, 14805-14809.
- Schaller, K. L., Krzemien, D. M., Yarowsky, P. J., Krueger, B. K., und Caldwell, J. H. (1995) A novel, abundant sodium channel expressed in neurons and glia. *J Neurosci* **15**, 3231-3242.
- Smith, M. R., Smith, R. D., Plummer, N. W., Meisler, M. H., und Goldin, A. L. (1998a) Functional analysis of the mouse Scn8a sodium channel. *J Neurosci* **18**, 6093-6102.
- Smith, P., Rhodes, N. P., Shortland, A. P., Fraser, S. P., Djamgoz, M. B., Ke, Y., und Foster, C. S. (1998b) Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. *FEBS Lett* **423**, 19-24.
- Smith, R. D. und Goldin, A. L. (1998) Functional analysis of the rat I sodium channel in xenopus oocytes. *J Neurosci* **18**, 811-820.
- Sontheimer, H. (2004) Ion channels and amino Acid transporters support the growth and invasion of primary brain tumors. *Mol Neurobiol* **29**, 61-72.
- Sontheimer, H., Black, J. A., und Waxman, S. G. (1996) Voltage-gated Na⁺ channels in glia: properties and possible functions. *Trends Neurosci* **19**, 325-331.

Sontheimer, H., Fernandez-Marques, E., Ullrich, N., Pappas, C. A., and Waxman, S. G. (1994) Astrocyte Na⁺ channels are required for maintenance of Na⁺/K⁺-ATPase activity. *J Neurosci* **14**, 2464-2475.

Srinivasan, J., Schachner, M., and Catterall, W. A. (1998) Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15753-15757.

Suzuki, H., Beckh, S., Kubo, H., Yahagi, N., Ishida, H., Kayano, T., Noda, M., and Numa, S. (1988) Functional expression of cloned cDNA encoding sodium channel III. *FEBS Lett* **228**, 195-200.

Terlau, H., Heinemann, S. H., Stuhmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K., and Numa, S. (1991) Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* **293**, 93-96.

Ullrich, N., Bordey, A., Gillespie, G. Y., and Sontheimer, H. (1998) Expression of voltage-activated chloride currents in acute slices of human gliomas. *Neuroscience* **83**, 1161-1173.

Van der, G. E., Massie, A., De Klerck, B., Peeters, K., Winters, K., Gerets, H. H., Clerens, S., Vandesande, F., and Arckens, L. (2003) Molecular cloning and differential expression of the cat immediate early gene *c-fos*. *Brain Res Mol Brain Res* **111**, 198-210.

Vega-Saenz de Miera, EC., Rudy, B., Sugimori, M., and Llinas, R. (1997) Molecular characterization of the sodium channel subunits expressed in mammalian cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7059-7064.

Verkhatsky, A. and Steinhauser, C. (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* **32**, 380-412.

Wang, H., Zhang, Y., Cao, L., Han, H., Wang, J., Yang, B., Nattel, S., and Wang, Z. (2002) HERG K⁺ channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer Res* **62**, 4843-4848.

Watanabe, E., Fujikawa, A., Matsunaga, H., Yasoshima, Y., Sako, N., Yamamoto, T., Saegusa, C., and Noda, M. (2000) Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. *J Neurosci* **20**, 7743-7751.

Watanabe, E., Hiyama, T. Y., Kodama, R., and Noda, M. (2002) NaX sodium channel is expressed in non-myelinating Schwann cells and alveolar type II cells in mice. *Neurosci Lett* **330**, 109-113.

Westenbroek, R. E., Merrick, D. K., and Catterall, W. A. (1989) Differential subcellular localization of the RI and RII Na⁺ channel subtypes in central neurons. *Neuron* **3**, 695-704.

Whitaker, W. R., Faull, R. L., Waldvogel, H. J., Plumpton, C. J., Emson, P. C., and Clare, J. J. (2001) Comparative distribution of voltage-gated sodium channel proteins in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* **88**, 37-53.

Wu, L., Nishiyama, K., Hollyfield, J. G., und Wang, Q. (2002) Localization of Nav1.5 sodium channel protein in the mouse brain. *Neuroreport* **13**, 2547-2551.

Yellen, G., Jurman, M. E., Abramson, T., und MacKinnon, R. (1991) Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* **251**, 939-942.

Yu, F. H. und Catterall, W. A. (2003) Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* **4**, 207.

Zhang, J. H., Gibney, G. T., und Xia, Y. (2001) Effect of prolonged hypoxia on Na⁺ channel mRNA subtypes in the developing rat cortex. *Brain Res Mol Brain Res* **91**, 154-158.

Zhou, Q., Kwan, H. Y., Chan, H. C., Jiang, J. L., Tam, S. C., und Yao, X. (2003) Blockage of voltage-gated K⁺ channels inhibits adhesion and proliferation of hepatocarcinoma cells. *Int J Mol Med* **11**, 261-266.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Stephan Patt, Prof. Dr. Stefan Wöfl, Dr. Robert Kraft, Dr. Carolina Codina-Canet, Dipl.-Biol. Christian Beetz, Dr. Christel Herold-Mende.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Anhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Heidelberg, den 30.03.2004

Unterschrift des Verfassers

12 Lebenslauf

Name: Michael Schrey
Wohnort: Hans Thoma Platz 42
69121 Heidelberg
Geburtsdatum: 19.11.1975
Geburtsort: Bensheim
Nationalität: Deutsch
Familienstand: verheiratet mit Frau Ursula Marietta Leonhardt

Schulbildung

1982-1988 Grundschule Johannes-Maas Wiesbaden
1988-1995 Gymnasium Leibnizschule Wiesbaden
12.6.1995 Abitur

Studium

10/1995 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/1997 Ärztliche Vorprüfung
09/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/1999-04/2002 Laborarbeiten im Rahmen meiner Promotionsarbeit
04/2001-04/2002 Praktisches Jahr in Jena (Allgemeine- und Vizeralchirurgie, Neurochirurgie), Weimar (Sophien- und Hufeland Klinikum, Diabetologie), Galway / Irland (University College Hospital, Gastroenterologie)
04/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: Sehr Gut (1,16)

Beruflicher Werdegang

08/2002-02/2004 Arzt im Praktikum an der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Heidelberg
seit 03/2004 Assistenzarzt an der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Heidelberg

13 Danksagung

Für die ausgezeichnete Betreuung zu jeder Zeit und das interessante Thema möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. S. Patt, herzlich bedanken.

Herr Professor Dr. S. Wöfl, Frau Dr. C. Codina Canet, Herr Dipl.-Biol. Christian Beetz und Frau Dr. C. Herold-Mende waren stets mit Unterstützung, Ratschlägen und Hinweisen, insbesondere zur Methodik, zur Stelle, wofür ich ihnen sehr verbunden bin.

Frau Renate Klupsch danke ich für die Hilfe bei der täglichen Laborroutine.

Für den gegenseitig motivierenden Austausch danke ich Frau Katja Preussat.

Meiner Frau und meiner Familie, und insbesondere Herrn Dr. jur. Forek, danke ich für die Ermunterungen und motivierenden Worte, mit der sie zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.