

Effekte des Angiogenesefaktors VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) an Glioma- und Mikrogliazellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Frauke Forstreuter

Kiel

2001

Referent: Prof.Dr.rer.nat. R. Mentlein

Koreferent: Prof. Dr. Wünnenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 08. 02. 02

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

1	EINLEITUNG.....	1
2	ZIELSETZUNG.....	8
3	MATERIAL UND METHODEN	9
3.1	MATERIAL.....	9
3.1.1	<i>Antikörper</i>	9
3.1.2	<i>Biochemikalien</i>	11
3.1.3	<i>Peptide.....</i>	12
3.1.4	<i>Enzyme</i>	13
3.1.5	<i>Gebrauchsfertige Kits.....</i>	13
3.1.6	<i>Geräte.....</i>	13
3.1.7	<i>Verbrauchsmaterial.....</i>	14
3.1.8	<i>Medien, Lösungen, Puffer</i>	15
3.1.8.1	Medien	15
3.1.8.2	Lösungen und Puffer: :.....	15
3.1.9	<i>Oligonukleotide</i>	21
3.1.10	<i>Zellmaterial</i>	23
3.1.10.1	Primärkulturen.....	23
3.1.10.2	Zelllinien.....	23
3.1.10.3	Solide humane Tumoren.....	24
3.2	METHODEN.....	25
3.2.1	<i>Zellkultur</i>	25
3.2.1.1	Kultivierung von Zelllinien.....	25
3.2.1.2	Subkultivierung der Zelllinien.....	25
3.2.1.3	Kultivierung der soliden human Gliome	26
3.2.2	<i>Immunhistochemische Methoden</i>	27
3.2.2.1	Nachweis des „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP).....	27
3.2.2.2	Nachweis von CD 68.....	28
3.2.2.3	Nachweis von VEGF	28
3.2.2.4	Nachweis VEGF- Rezeptoren.....	29

3.2.3	<i>Isolierung von Proteinen verschiedener Zellfraktionen</i>	30
3.2.3.1	Isolierung von Zellmembranen.....	30
3.2.3.2	Isolierung von Zellhomogenaten.....	31
3.2.3.3	Isolierung von Kernproteinen.....	31
3.2.4	<i>Proteinbestimmung</i>	32
3.2.5	<i>Western Blot</i>	32
3.2.5.1	Prinzip der Methode des Western Blottings	32
3.2.5.2	Stimulation und Lyse der Zellen.....	33
3.2.5.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	35
3.2.5.4	„Semi-Dry-Blotting“	37
3.2.5.5	Detektion der Proteinbanden	37
3.2.6	<i>Durchführung der Proliferationsversuche</i>	39
3.2.6.1	Aussaat und Stimulation der Zellen.....	40
3.2.6.2	Aufarbeitung der Stimulationsansätze.....	40
3.2.7	<i>VEGF-Sandwich-ELISA</i>	41
3.2.7.1	Beschichten der Mikrotiterplatte	41
3.2.7.2	Durchführung des ELISAs	41
3.2.8	<i>Der Chemotaxis-Assay</i>	42
3.2.8.1	Durchführung des Experiments.....	42
3.2.8.2	Detektion und Quantifizierung der gewanderten Zellen.....	43
3.2.9	<i>RNA-Isolierung</i>	44
3.2.9.1	Isolierung von RNA aus Zellen.....	44
3.2.9.1.1	Durchführung der RNA-Isolation mit der „Single-Step“- Methode.....	44
3.2.9.1.2	Isolierung mit Hilfe des „RNeasy“-RNA-Isolierungskits.....	46
3.2.9.2	Isolierung von RNA aus Gewebe.....	47
3.2.10	<i>Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA</i>	48
3.2.11	<i>RNA-Elektrophorese</i>	48
3.2.12	<i>Reverse Transkription (RT)</i>	50
3.2.13	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	50
3.2.14	<i>DNA-Gelelektrophorese</i>	52
3.2.15	<i>Isolierung und und Aufreinigung einzelner PCR-Fragmente</i>	53

3.2.15.1	Isolierung von Fragmenten aus dem PCR-Ansatz	54
3.2.15.2	Isolierung von Fragmenten aus einem Agarose-Gel.....	54
3.2.16	<i>Northern Blot</i>	55
3.2.16.1	„Blotting“ bzw. Übertragung der RNA auf eine Nylonmembran.....	56
3.2.16.2	Markierung der Sonde.....	56
3.2.16.3	Hybridisierung der Membran und Detektion der spezifischen Banden.....	57
3.2.17	<i>Electrophoretic Mobility Gel Shift Assay (EMSA)</i>	58
3.2.17.1	Die Methode.....	58
3.2.17.2	Präparation der Proteine	58
3.2.17.3	Markierung der Sonde.....	59
3.2.17.4	Herstellung des Polyacrylamidgeles	60
3.2.17.5	Der Gel-Shift.....	60
4	ERGEBNISSE	62
4.1	VEGF AN GLIOMEN.....	62
4.1.1	<i>Zellkultur</i>	62
4.1.1.1	Kultur und Subkultivierung der Zelllinien U343 und U118.....	62
4.1.1.2	Kultivierung von soliden humanen Tumoren.....	63
4.1.1.3	Immunhistochemische Überprüfung der Reinheit der Zellen.....	63
4.1.1.3.1	Nachweis von GFAP	63
4.1.2	<i>Nachweis des VEGF an Gliomen</i>	65
4.1.2.1	Immunhistochemischer Nachweis	65
4.1.2.2	Detektion der exprimierten Splice-Varianten mittels RT-PCR.....	66
4.1.3	<i>Regulierung der VEGF-Expression in Gliomazellen</i>	68
4.1.3.1	Northen Blot.....	69
4.1.4	<i>VEGF-Rezeptoren in Gliomazellen</i>	71
4.1.4.1	RT-PCR.....	71
4.1.4.2	Immunhistochemischer Nachweis der VEGF-Rezeptoren.....	73
4.2	EFFEKTE VON VEGF AUF GLIOMAZELLEN.....	74
4.2.1.1	VEGFR-Agonisten haben keinen Einfluss auf die Zellproliferation.....	75
4.2.1.2	VEGFR-Agonisten haben geringen Einfluss auf die VEGF-Sekretion.....	76

4.2.2	<i>Einfluss von VEGF auf intrazelluläre Signalkaskaden</i>	77
4.2.2.1	Überprüfung der Rezeptorphosphorylierung	77
4.2.2.2	Überprüfung der Aktivierung von MAP-Kinasen.....	79
4.2.2.3	Überprüfung der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.....	80
4.3	VEGF-REZEPTOREN UND -EFFEKTE AN MIKROGLIA-ZELLEN.....	82
4.3.1	<i>Zellkultur</i>	82
4.3.1.1	Kultur von Ratten-Mikroglia-Zellen.....	82
4.3.1.2	Kultur der murinen Mikroglia-Zelllinie BV-2	82
4.3.2	<i>Nachweis von VEGF-Rezeptoren mittels RT-PCR</i>	83
4.3.2.1	RNA-Isolierung.....	83
4.3.2.2	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit anschließender DNA-Elektrophorese.....	85
4.3.2.2.1	Nachweis des VEGFR-1 an Ratten-Mikrogliazellen.....	85
4.3.2.2.2	Nachweis des VEGFR-1 an BV-2-Zellen.....	86
4.3.3	<i>Nachweis von VEGF-Rezeptoren auf Proteinebene</i>	87
4.3.4	<i>Untersuchungen zur Funktionalität des VEGFR-1 an Mikrogliazellen</i>	88
4.3.4.1	Einfluss von VEGF auf die Proliferation von Mikroglia-Zellen.....	88
4.3.4.2	Einfluss von VEGF auf die Migration von Mikroglia-Zellen.....	89
4.3.4.3	Einfluss von VEGF auf die Signaltransduktion in Mikrogliazellen.....	90
4.3.4.3.1	VEGF hat keinen Effekt auf die Phosphorylierung der MAPKinasen ERK1/2 und p38	91
4.3.4.3.2	VEGF hat inhibierenden Einfluss auf die Kinase „Akt“.....	92
5	DISKUSSION	94
5.1	GLIOMAZELLEN	95
5.1.1	<i>Zellkultur</i>	95
5.1.2	<i>VEGF-Splicevarianten und –Regulation in Gliomazellen</i>	97
5.1.3	<i>Nachweis der VEGF-Rezeptoren</i>	99
5.1.4	<i>Autokrine Effekte des VEGF</i>	101
5.1.5	<i>VEGF-Signaltransduktion</i>	103
5.2	MIKROGLIAZELLEN	108

5.2.1	<i>Nachweis der VEGF-Rezeptoren.....</i>	109
5.2.2	<i>Funktionelle Effekte des VEGF auf Mikrogliazellen.....</i>	110
5.2.3	<i>Signaltransduktion</i>	112
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	117
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	119
8	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	132
9	DANKSAGUNG.....	134
10	LEBENS LAUF	135
11	ERKLÄRUNG.....	136

1 Einleitung

Gliome sind die am häufigsten vorkommenden Tumoren des Zentralen Nervensystems. Pathologisch werden sie als Tumoren definiert, die sowohl histologische, immunhistologische als auch ultrastrukturelle Anzeichen für eine gliale Differenzierung aufweisen. Gliome sind sehr aggressiv, stark invasiv und neurologisch destruktiv. Nach der Klassifizierung der World Health Organisation (WHO) werden sie anhand ihres Differenzierungsgrades und entsprechend ihrer Malignität in vier Grade eingeteilt (Kleihues und Cavane, 2000). Gliome der Grade

I-III, sogenannte Astrozytome, sind teilweise therapierbar. So sind Grad I Astrozytome noch biologisch benigne, können chirurgisch vollständig entfernt und damit geheilt werden. Astrozytome Grad II hingegen sind niedrig-maligne und müssen nach chirurgischer Entfernung mit Strahlen- und Chemotherapie behandelt werden. Das anaplastische Astrozytom (Grad III) ist maligne und führt trotz Behandlung innerhalb weniger Jahre zum Tode des Patienten. Das aggressivste aller Gliome ist das Glioblastoma multiforme (Grad IV). Es ist resistent gegen Chemotherapie und die betroffenen Patienten haben eine mittlere Überlebensrate von nur 9-12 Monaten. Die Morbidität ist damit eine der höchsten aller Tumorerkrankungen.

Unabhängig vom Tumorgrad gibt es bis heute kein cytotoxisches Mittel, das vollständige Heilung bewirken kann. Die Standard-Therapie mit Chemotherapeutika aus der Gruppe der „Harnstoff-Lost-Verbindungen“, kombiniert mit Operation und Radiotherapie verlängert lediglich die durchschnittliche Überlebensrate (Shapiro et al. 1989), und das auch meist nur bei den Tumoren der mittleren Malignitätsgrade. Während die tumorbiologische Forschung in den letzten Jahren erfolgreiche Therapien für z.B. Brust oder Lungenkrebs entwickeln konnten, wirken dieselben Therapien bei den Gliomen nicht.

Ein neuer Ansatz für die Therapie von Tumoren ist die Inhibierung ihrer Neoangiogenese. Algire et al. entdeckten 1945, dass das Wachstum von Tumor-Explantaten abhängig von der Entwicklung einer schnellen vaskulären Versorgung ist, denn ohne ständige Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen ginge der Tumor zugrunde. Ab einem Gewebedurchmesser von 2 mm kann ein Tumor aber nicht mehr durch reine Diffusion versorgt werden, deshalb

sprießen in einem Prozess, den man als „Neoangiogenese“ bezeichnet, Kapillaren in den Tumor ein, um so die nutritive Versorgung zu gewährleisten

Als Angiogenese bezeichnet man ganz allgemein den Vorgang, bei dem neue Blutgefäße aus bereits bestehenden hervorgehen. Dies bedarf eines recht komplexen Zusammenspiels verschiedener Faktoren, wobei die sogenannten Angiogenesefaktoren eine entscheidende Rolle spielen. Judah Folkman identifizierte 1970 einen Faktor aus Tumorgewebe, den er verantwortlich für dessen Angiogenese hielt (Folkman et al., 1971), und er postulierte im selben Jahr, dass die Inhibierung dieser Angiogenese eine mögliche Therapie für solide Tumoren bedeuten könnte (Folkman 1971). Seitdem gab es eine rasante Entwicklung auf dem Gebiet der Angiogeneseforschung. Ziel war es, Faktoren zu finden, die diesen Prozess blockieren könnten.

Bis heute haben sich dabei zwei Gebiete als besonders interessant herausgestellt. Das erste untersucht Angiopoietine und ihre Tie2-Rezeptoren (Übersicht: Loughna und Sato, 2001). Das zweite große Gebiet umfasst den Angiogenesefaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) und seine Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2. Wie sich später herausstellte, war letzterer auch der Faktor, den Folkman 1971 charakterisiert hatte.

Das VEGF wurde erstmals 1983 von Senger et al. als „vascular permeability factor“ (VPF) beschrieben. Die Klonierung und Expression des Genes durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen (Leung et al. 1989; Keck et al. 1989) identifizierte es als endothelzellspezifischen Angiogenesefaktor.

Inzwischen sind viele weitere Mitglieder der VEGF-Familie identifiziert worden, wie z.B. VEGF-B, -C und -D oder der Placenta-Wachstumsfaktor PlGF (Übersicht: Ferrara und Davis-Smyth 1997), aber im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das als erstes entdeckte VEGF-A.

VEGF-A ist ein dimeres Glycopeptid von ca. 45 kDa Größe, deren Monomere über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Abb. 1). Von humanem VEGF sind fünf verschiedene Spliceformen bekannt, die nach Länge ihrer resultierenden Aminosäureketten bezeichnet werden. Diese Splicevarianten haben eine unterschiedliche biologische Bedeutung. So sind die kürzeren Formen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ weitgehend frei diffusibel und haben ein hohes angiogenetisches Potential. Besonders VEGF₁₂₁ kann unter günstigen Umständen über weite Distanzen wirken. Anders hingegen binden die

größeren Splicevarianten (z. B. VEGF₁₈₉) an Heparansulfatreste, sind entsprechend weniger diffusibel und haben ein niedrigeres angiogenetisches Potential.

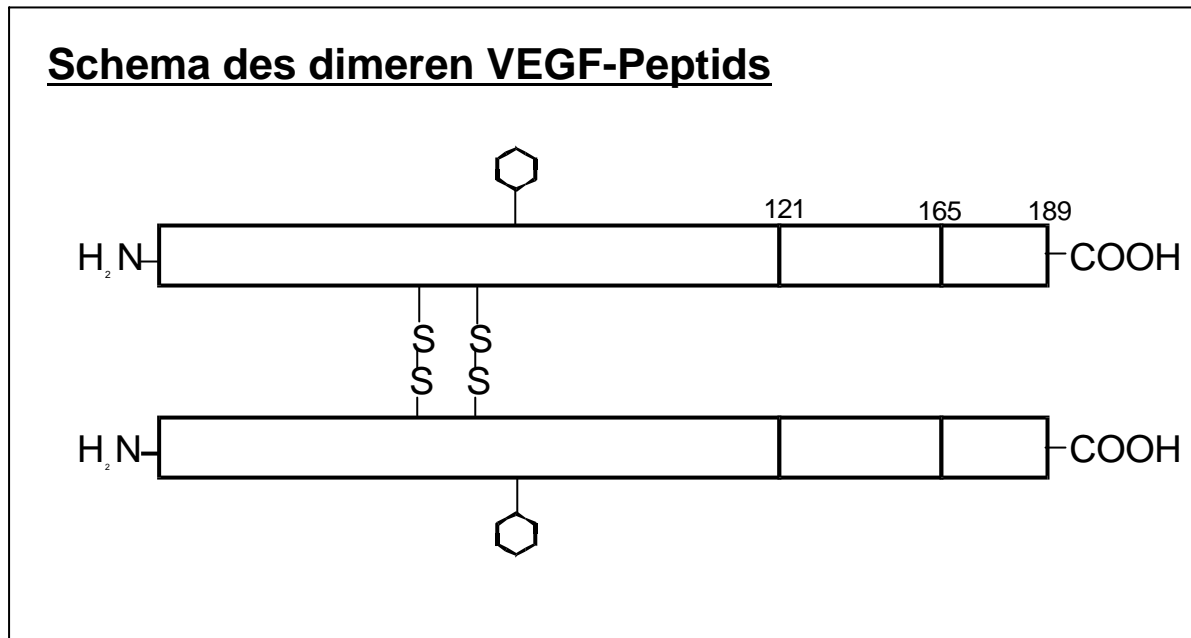


Abbildung 1: Struktur des VEGF. Es besteht aus zwei über Disulfidbrücken verknüpften Peptidketten. Gezeigt sind die unterschiedlich langen Aminosäureketten () der Splicevarianten und die Glykosylierungsstellen ().

In den meisten gesunden Organsystemen spielt VEGF nur in der Embryonalentwicklung bei der Gefäßbildung eine Rolle. Physiologisch tritt es im ausgewachsenen Organismus nur sehr selten in Erscheinung. Zu diesen seltenen Ausnahmen zählen die Prozesse der Wundheilung und regelmäßig wiederkehrende Gefäßbildungen im Rahmen des weiblichen Zyklus (Phillips et al., 1990; Ravindranath et al., 1992; Cullinan-Bove et al., 1993). Bei pathologischen Prozessen hingegen wird VEGF häufig wieder re-exprimiert, wie z.B. bei Entzündungsprozessen (z. B. Rheumatoide Arthritis, Arthrose: Koch et al., 1994), unter Hypoxie (z. B. beim Herzinfarkt: Isner und Losordo, 1999) oder von bestimmten Tumoren. Insbesondere Glioblastome gehören zu den Tumoren, die permanent VEGF bilden, wobei die Expression durch Hypoxie oder den Einfluss von Wachstumsfaktoren oder Cytokinen noch gesteigert wird. Nicht-maligne Gliazellen bilden dagegen im adulten Gehirn kein VEGF.

Gemessen an anderen Angiogenesefaktoren wirkt VEGF relativ spezifisch auf Endothelzellen (Ferrara und Smyth, 1997), indem es deren Proliferation anregt und die Permeabilität erhöht. Darüberhinaus ist ein chemotaktischer Einfluss von VEGF auf verschiedene monozytäre Zellen, wie z. B. Makrophagen und Chondroklasten in der Wachstumsfuge beschrieben worden (Gerber et al., 1999).

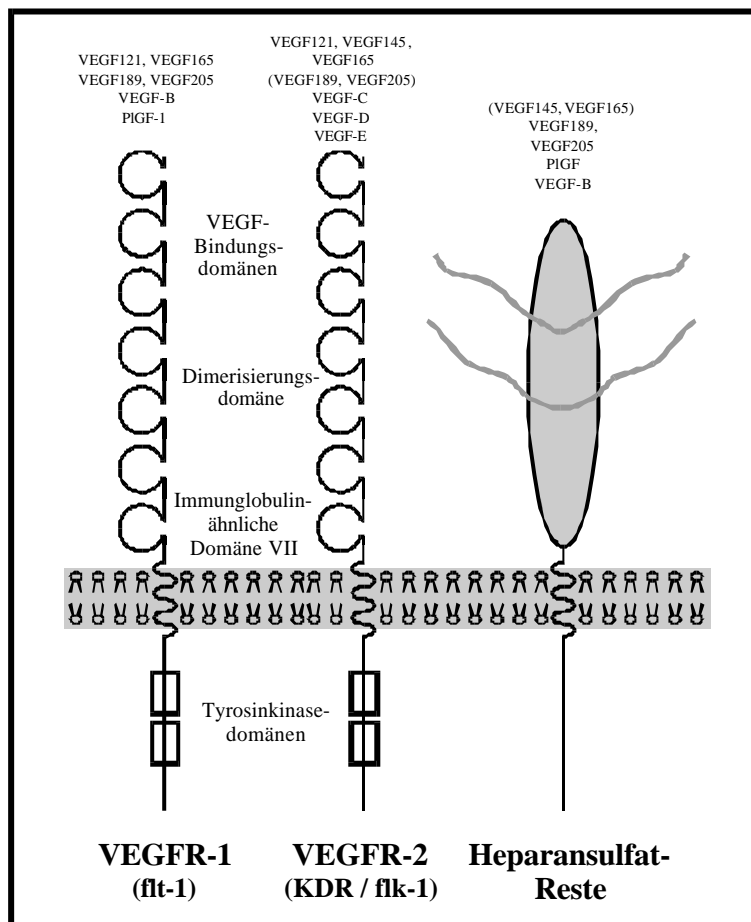


Abbildung 2: Schematische Darstellung der VEGF-Rezeptoren mit ihren potentiellen Liganden.

PlGF (Placenta Growth Factor) wirkt negativ-regulierend durch Bildung von Heterodimeren mit VEGF. VEGF-B ist wichtig bei der Herzentwicklung; VEGF-C und -D sind wichtig für die Lymphgefäßbildung; VEGF-E ist viral und hat hohes angiogenetisches Potential.

Für die Vermittlung der Effekte des VEGF sind im wesentlichen zwei der insgesamt vier bekannten VEGF-Rezeptoren (VEGFR) verantwortlich: der VEGFR-1 und der VEGFR-2, denn nur diese beiden Rezeptoren binden alle Splicevarianten des VEGF-A. (siehe Abbildung 2) Der VEGFR-3 (synonym: flt-4) hingegen bindet ausschließlich die Isoformen VEGF-C und VEGF-D, und der Rezeptor Neuropilin-1 (NP-1) bindet VEGF-B, den Placenta-Wachstumsfaktor PlGF und lediglich die VEGF-A-Splicevariante VEGF165. Bei

Untersuchungen der Effekte des VEGF-A stehen daher die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 im Mittelpunkt des Interesses. Für beide Rezeptoren existieren synonyme Bezeichnungen. So heißt der VEGFR-1 auch flt-1 („fms-like tyrosine kinase“), der VEGFR-2 auch KDR („kinase insert domain containing receptor“), und sein murines homolog heißt flk-1 („fetal liver kinase“) (de Vries et al, 1992, Terman et al., 1992). Beide Rezeptoren gehören zu der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Sie sind aus sieben immunoglobulinartigen extrazelluläre Domänen, einer Transmembranregion und einer intrazellulären Tyrosinkinase-sequenz, die durch Kinase-Insert-Domänen unterbrochen wird, aufgebaut (s. Abb. 2). Der VEGFR-1 hat mit einem Kd-Wert von etwa 10-20 pM (de Vries et al, 1992), eine etwas höhere Affinität zum VEGF₁₆₅ als der VEGFR-2 (75-125 pM) (Terman et al., 1992).

Die Bindung eines VEGF-Dimers an einen Rezeptor führt zur Dimerisierung zweier Rezeptoren, die sich dabei im intrazellulären Bereich gegenseitig an Tyrosinresten phosphorylieren („Autophosphorylierung“). Die Phosphorylierungen dienen intrazellulären, SH2-Domänen-tragenden Signalproteinen als Bindungsstellen, welche nun die durch die Ligandenbindung induzierte Signalkaskade einleiten. Über weitere Phosphorylierungen können Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die dann das Signal in eine Zellantwort umschreiben (Näheres s. Diskussion). Als Folge wird die Expression bestimmter Gene, die Proliferation der Zellen oder / und ihre Chemotaxis induziert.

Der Ablauf einer solchen Signalkaskade ist dabei nicht einheitlich, sondern variiert bei verschiedenen Zelltypen und ist meist weit verzweigt.

Die Expression der VEGF-Rezeptoren wird durch VEGF, verschiedene andere Cytokine und Hypoxie recht unterschiedlich reguliert.

VEGFR-1 und VEGFR-2 werden vorwiegend in Endothelzellen exprimiert, aber einige wenige andere Zellen exprimieren einen oder sogar beide Rezeptoren. So findet man an Monozyten/ Makrophagen den VEGFR-1 (Barleon et al., 1996), an hämatopoietischen Zellen den VEGFR-2 (Kato et al., 1995) und -wie neuerdings beschrieben- an einigen wenigen Tumor-Zellen, wie z. B. Melanoma-Zellen, den VEGFR-1 und/ oder -2 (Gitay-Goren et al., 1993) exprimiert.

In Glioblastomen waren VEGF-Rezeptoren nur auf Endothelzellen beschrieben worden (Plate et al., 1992). Da VEGF in hohen Konzentrationen in diesen Tumoren gebildet wird

(ursprünglich als „glioma-derived vascular endothelial cell mitogen“ bezeichnet), könnten noch andere Zielzellen im Tumor durch VEGF beeinflusst werden. Dazu gehören die Gliomazellen selbst und Mikroglia-Zellen/ Monozyten, die bis zu 50% aller Zellen im Tumor ausmachen können (Paulus et al., 1992; Rogegndorf et al., 1996; Rossi et al., 1987) (Abb. 4).

Mikrogliazellen sind eine Art differenzierter Makrophagen im Gehirn und repräsentieren die immunkompetente Zellpopulation des ZNS (Ling 1981). Sie befinden sich meist im ruhenden Zustand und werden unter pathologischen Bedingungen durch verschiedene Einflüsse aktiviert (siehe z. B. Wollmer et al., 2001), und somit zur Phagozytose, Antigen-Präsentation und Lymphozyten-Aktivierung angeregt (Banati et al., 1993).

Offenbar sezernieren Glioblastome Faktoren, die chemotaktisch auf Monozyten oder Mikrogliazellen wirken. So konnte gezeigt werden, dass Gliomazellen MCP-1 (Leung et al., 1997), HGF/SF (Hepatocyte growth factor/ Scatter factor; Koochekpur et al., 1997) oder GM-CSF (Frei et al., 1992) sezernieren, die chemotaktisch (MCP-1) oder proliferativ auf Mikroglia/ Makrophagen wirken

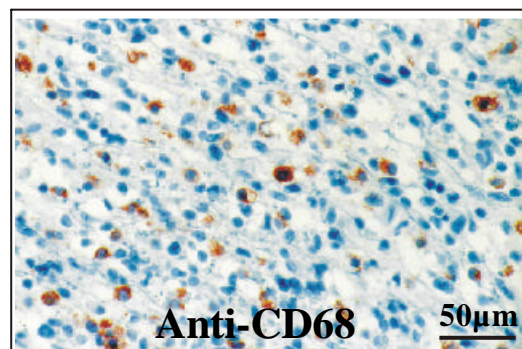


Abb.4: Immunhistochemische Färbung eines Glioblastomes (WHO-Grad IV) mit einem Antikörper gegen den Monozyten/ Makrophagen-Marker CD 68. Die deutliche Braunfärbung einzelner Zellen zeigt eine hohe Infiltrationsrate von Mikrogliazellen in diesem Tumor. Vergrößerung: x200.

Die Rolle der Mikrogliazellen in dem Tumorgewebe ist bis heute nicht geklärt. Es scheint eher unwahrscheinlich, dass Tumorzellen einen Vorteil davon haben, Immun-Effektorzellen wie die Mikroglia anzulocken. Man könnte ihr Vorhandensein also eher als Versuch des ZNS verstehen, die neoplastischen Zellen zu vernichten. In diesem Fall müsste dann die inflammatorische Funktion der Mikrogliazellen inaktiviert sein, denn sie üben keinerlei

inhibierenden oder zerstörerischen Einfluss auf die Tumorzellen aus. Im Gegenteil locken die Tumorzellen die Mikrogliazellen sogar an, und sie scheinen sie beim Wachstum zu unterstützen.

Zusammengefasst kann man zwei mögliche Erklärungen für das Vorhandensein der Mikrogliazellen in Tumorgewebe formulieren: Entweder sie sind die Reaktion des ZNS auf die Tumordinvasion und werden aber durch lokale Sekretion von immunsuppressiven Faktoren durch den Tumor inaktiviert, oder aber sie werden durch die Gliome angelockt, die sich die Eigenschaft der Mikrogliazellen zu Nutze machen wollen, mitogene, angiogene und immunsuppressive Faktoren zu sezernieren. Beide Möglichkeiten werden in der Literatur diskutiert und sind Gegenstand der aktuellen Forschung auf dem Gebiet.

2 Zielsetzung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Rolle des Wachstumsfaktors VEGF und seiner Rezeptoren in glialem Tumorgewebe. Er wird dort von neoplastischen Gliomazellen, nicht aber von gesunden Gliazellen sezerniert und unterstützt so das Wachstum des Tumors.

Nachdem bekannt ist, dass und wie er auf seine eigentlichen Zielzellen, die Endothelzellen, wirkt, soll untersucht werden, ob er auch einen Effekt auf seine produzierenden Zellen, die Gliomazellen selbst hat. Die Untersuchungen sollen der Einfachheit halber an etablierten Zelllinien durchgeführt werden.

Dazu muss zunächst überprüft werden, ob und welche Rezeptoren des VEGF von den Gliomazellen exprimiert werden, ob sie –wie die nativen Tumoren- auch VEGF sezernieren und ob die entsprechenden Splicevarianten eine Aktivierung der Rezeptoren ermöglichen. Anschließend werden makroskopische Effekte des VEGF, wie z. B. Proliferation, auf die Gliomazellen untersucht. Schließlich soll geprüft werden, ob intrazelluläre Signalkaskaden durch das VEGF beeinflusst werden.

Zusätzlich interessierte uns, ob auch die den Tumor umgebenden Mikrogliazellen, deren Rolle in der Tumorgenese noch nicht geklärt ist, durch VEGF beeinflusst werden. Dazu wird zunächst geprüft, ob Rezeptoren für das VEGF an den Zellen vorhanden sind. Dann sollen Proliferations- und Chemotaxis-Assays zeigen, ob Applikation des Wachstumsfaktors *in vitro* eine Reaktion der Zellen nach sich zieht. Schließlich wird untersucht werden, ob die Bindung des VEGF an seine Rezeptoren und eine nachfolgende Reaktion intrazellulär nachvollzogen werden kann. Dazu sollen verschiedene Stationen intrazellulärer Signalkaskaden auf eine mögliche Aktivierung hin untersucht werden.

Ich hoffe, durch diese Untersuchungen zum einen den Kenntnisstand über die Wirkungsweise des VEGF in pathologischen Systemen zu erweitern und zum anderen, einen Beitrag zum Wissen über die Interaktionen zwischen Mikrogliazellen und Gliomazellen leisten zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

GFAP	Maus monoklonal, Dako M761 1: 100 in Aqua dest.
Ki-M6 (α-CD68)	Maus monoklonal, Dianova/BMA T 1005 1: 100 in Aqua dest.
VEGF	Maus monoklonal IgG _{2a} ; Santa Cruz Biotechnology, CA USA sc-7269; 1: 40 in TBS
VEGFR-1 (Flt-1)	Kaninchen polyklonal; Santa Cruz Biotechnology, CA USA sc-316; 1: 80 in TBS
VEGFR-2 (KDR)	Maus monoklonal IgG _{2a} ; Santa Cruz Biotechnology, CA USA sc-6251; 1: 80 in TBS
p-ERK	Maus monoklonal IgG _{2b} ; Santa Cruz Biotechnology, CA USA sc-7383; 1: 250 in 5% BSA
ERK2	Maus monoklonal IgG _{2b} ; Santa Cruz Biotechnology, CA USA sc-1647; 1: 250 in 5% BSA
p-p38	Kaninchen polyklonal; Cell Signaling Technology / NEB; Beverly, MA USA;

	#9211; 1:200 in 5% BSA
p-Tyr	Maus monoklonal IgG _{2b} ; Santa Cruz Biotechnology, CA USA sc-1647; 1: 250 in 5% BSA
p-Akt (Ser)	Kaninchen polyklonal; Cell Signaling Technology / NEB; Beverly, MA USA; #9271; 1:400 in 5% BSA
Akt	Kaninchen polyklonal; Cell Signaling Technology / NEB; Beverly, MA USA; #9272; 1:400 in 5% BSA
ELISA- Fangantikörper (capture antibody)	R&D Systems AF-293-NA, 80ng/ well, 1:250 in PBS (0,4µg/ ml)
ELISA-Detektionsantikörper (detection antibody)	R&D Systems BAF-293 40ng/ well
biotinylierter Kaninchen anti-Maus IgG sekundär Antikörper	DAKO A/S, Denmark, 1: 200 Verdünnung in TBS
HRP-konjugierter Kaninchen anti-Maus IgG sekundär Antikörper	DAKO A/S, Denmark, 1:30 000-Verdünnung in TBST
HRP-konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG sekundär Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, CA USA sc-2042; 1: 20 000 Verdünnung in TBST,

Tabelle 1: Primär- und Sekundär-Antikörper

3.1.2 Biochemikalien

Aceton	Merck 100013
Acrylamid/ Bisacrylamid	Serva #10687.01
Agarose	Eurogentec
Ammonumperoxodisulfat	Merck101201
Amphotericin	Sigma A 2942
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad 5000006
Borsäure	Merck 165
Bromphenolblau	Fluka 18030
Casein = TBS Blotto A	Santa Cruz
Chloroform	Merck 2445
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth
DMEM	Gibco
DMSO f. d. Zellkultur	Sigma
DMSO	Fluka
DNA-Längenstandard, 100bp-ladder	Gibco #15628 050
dNTP, Set Ultrapure	Amersham Pharmacia
DTT	Sigma D-0632
EDTA	Roth #8040.1
Ethanol, p. a.	Merck
Ethidiumbromid	Fluka
FKS	Gibco #700170
Glutamin	Gibco #2105 1024
Glycin	Roth
Glycerin	Merck
Guanidinisothiocyanat	Fluka #50981
HCl	Roth
HEPES	Biomol
Hydroluma-Szintillationsflüssigkeit	Wallac
Interleukin-3	Biomol
Isoamylalkohol, p. a.	Merck

Kaisers Glyceringelatine	Merck
2-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Roth
[Methyl 1', 2'- ³ H] Thymidin (130 Ci/mmol)	Amersham
MgCl ₂	Merck
Mineralöl	Sigma M 3516
MOPS	Roth
Natriumacetat	Merck
Na ₃ -Citrat (Tri-Natriumcitrat-2-Hydrat)	Roth
Natriumchlorid NaCl	Roth
NaOH (Natronlauge)	Roth
[γ- ³² P]dATP (10mCi/ml)	Amersham AA0068
[α- ³² P]dCTP (10mCi/ml)	Amersham AA0005
PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)	Gibco #14190-094
Penicillin/ Streptomycin	Gibco
Rinderserumalbumin (BSA)	Amersham RPN 412
Rinderserumalbumin (BSA), fettsäurefrei	Sigma
SDS	Biomol
TEMED	Roth
Tetramethylbenzidin	Sigma
Trichloressigsäure	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma 7-9®, T-1378
Triton X-100	Sigma T-6878
Trypsin	Gibco #27250042
Tween 20	Roth #91271
Xylencyanol FF	Fluka #95600

3.1.3 Peptide

VEGF, human, rek. (rekombinant)	Pepro Tech (TEBU)
VEGF, murin	Biomol
Somatostatin (SS), synthetisch	Bachem
EGF (Epidermal Growth Factor), human, rek.	Pepro Tech (TEBU)

TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), human, rek.	Pepro Tech (TEBU)
bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), human, rek.	Pepro Tech (TEBU)
IL-3 (Interleukin 3), murin, rek.	Biomol
PIGF (Placenta Growth Factor), human, rek.	Strathmann Biotech AG
VEGF-D, rek.	R&D Systems

3.1.4 Enzyme

RNase freie DNase I (10U / μ l)	Promega
SuperScript [™] Reverse Transkriptase (200 U / μ l)	Gibco BRL 18053-017
T4 PolynucleotidKinase (10.000U/ml)	New England Biolabs
Thermus Aquaticus DNA (Taq) Polymerase (5 U/ μ l)	Promega
Streptavidinperoxidase (ELISA)	Zymed, San Francisco, USA

3.1.5 Gebrauchsfertige Kits

EMSA-kit "Promega Set"	Promega, E33000
Nucleotrap® extraction kit	Macherey-Nagel, #740584
"QIAquick" PCR Purification Kit	Qiagen, #28104
„RNAesy MiniKit“	Qiagen, #74104
Megaprime DNA labelling systems	Amersham RPN1606
Universal Immunostaining Kit	Immunotech, France, #0599

3.1.6 Geräte

Analysenwaagen R 160 P / L 610	Sartorius
Autoradiographiekassetten:	
1. ohne Screen	Amersham
2. mit Screen	MBI Fermentas
Begasungsbrutschrank B 5060 EC / CO ₂	Heraeus
Betazähler 6000 LI	Beckmann
Eismaschine AF-10	Scotsman
DNA /RNA-Elektrophorese-Kammer	Biorad
Heißluft-Sterilisator UT 5050 EK	Heraeus

Hochdruckdampf-Sterilisator	Schütt
Horizontal-Elektrophorese-Kammer („wide mini subcell)	BioRad
Hybridisierungsöfen	Biometra
Kühlzentrifuge	Eppendorf
Magnetrührer (heizbar)	Ikamag
Mikroprozessor pH-Meter 762	Knick
Mikrowellengerät h-2500	BioRad
Semi-Dry-Blotter	BioRad
Schütteltisch	GEhardt
Schüttler	Eppendorf
Sterile Werkbank	Heraeus
Thermocycler	Biometra, Göttingen
	Perkin Elmer
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge 15	Heraeus
UV-Illuminator mit Kamera, Bildschirm und Drucker	INTAS, Göttingen
UV/VIS-Zerstrahl- Spektrometer U-2000	Hitachi
Vertikal-Elektrophoresekammer	BioRad
Vortex-Mixer VF-2	Janke und Kunkel
Wasserbäder	Mgw Lauda M3
	Köttermann

3.1.7 Verbrauchsmaterial

Filme:

1. Chemilumineszenzfilme: „Hyperfilm ECL“ Amersham RPN3103H
2. Autoradiographie- Filme: „Hyperfilm MP“ Amersham RPN2115H

Mikrotiterplatten (ELISA) Costar 3590 96-well Platten

Nylonmembran „Hybond N“ Amersham Pharmacia

PVDF-Membran Amersham Pharmacia

Zellkultur-Flaschen Sarstedt (75 cm²)

Sarstedt / Nunc (25 cm²)

3.1.8 Medien, Lösungen, Puffer

3.1.8.1 *Medien*

Standard-Nährmedium (DMEM + 10% FKS):

515 ml DMEM

60ml (10%) FKS (durch 30min bei 56°C im Wasserbad inaktiviert und sterilfiltriert)

6 ml (1%) Penicillin / Streptomycin

16 ml (3%) Glutamin-Lösung (200mM)

Mikroglia-Stimulationsmedium (DMEM + 0,5% FKS)

Wie Standard-Nährmedium, nur mit 0,5% statt 10% FKS

Stimulationsmedium (DMEM ohne FKS, +1% BSA)

Wie Standard-Nährmedium, nur ohne FKS, bei Proliferationstesten +1% FKS

1% BSA

DMSO-Medium (zum Einfrieren von Zellen):

5ml DMSO

50ml Standard-Nährmedium

500µl Penicillin/ Streptomycin (Pen/ Strep)

250µl Glucoselösung (50%)

3.1.8.2 *Lösungen und Puffer: :*

Zellkultur:

Trypsin-Lösung:

10 ml PBS

1 mg Trypsin

14,8 mg EDTA

Dissoziationslösung:

10ml DMEM

24mg HEPES

20mg Trypsin (1:250 der käuflichen Stammlösung)

2mg EDTA

DNase-Lösung:

5mg DNase in 5ml Aqua bidest., steril filtriert

Immunhistochemie:

TBS (Tris-buffered Saline):

100ml 0,2M Tris, pH 1,3

900ml 0,85% NaCl-Lösung

Citratpuffer:

0,01M Natriumcitrat –Lösung, pH 6,0

Proteinisolierung:

Lysispuffer (Zellmembranen):

5mM HEPES

2mM Vanadat (Natriummetavanadat)

pH 7,4

Aufnahmepuffer (Zellmembranen):

20mM HEPES

140mM NaCl

2mM Vanadat

pH 7,4

Triton-Lysispuffer:

50mM Tris-HCl, pH 7,8

100mM NaCl

2mM EDTA

1% TritonX-100

2mM Vanadat

Hemmstoffe je nach Anwendung (siehe Tabelle xx, S.xx)

Kernprotein-Puffer A:

10mM HEPES, pH 7,9

10mM KCl

0,2mM EDTA

1mM Dithiothreitol (DTT)*

0,5mM PMSF (Phenyl-Methan-Sulfonylfluorid)*

10µg/ml Aprotinin*

* Hemmstoffe erst kurz vor Gebrauch dem Puffer zusetzen

Kernprotein-Puffer B:

10mM HEPES, pH 7,9
0,4M NaCl
0,2mM EDTA
1mM Dithiothreitol (DTT)*
0,5mM PMSF (Phenyl-Methan-Sulfonylfluorid)*
10µg/ml Aprotinin*

Western Blot:

Elektrodenpuffer (Laufpuffer).

12,2 g Tris
57,6 g Glycin
4 g SDS (Sodiumdodecylsulfat)
auf 4 l mit dest. Wasser auff. (pH 8,2)

Gelpuffer I:

1,5M Tris HCl
0,4% SDS
pH 8,8

Gelpuffer II:

0,5M Tris HCl
0,4% SDS
pH 6,8

Probenpuffer:

0,23g SDS
1,25ml Gelpuffer II
1ml Glycerin
0,5ml 2-Mercapto-Ethanol
7,25ml Aqua dest.

Probenpuffer für geringe Proteinmengen($\cong 5x$):

1g SDS
6,3ml Gelpuffer II
5ml Glycerin
2,5ml 2-Mercapto-Ethanol

Lauffrontanzeiger:

Bromphenolblau, gesättigte Lösung

Transferpuffer:

25 mM Tris

192 mM Glycin;

10% Methanol

pH 9

TBST (Tris-buffered Saline Tween):

50mM Tris

150mM NaCl

1mM EDTA

0,1% Tween

pH 7,5

“Strip-Puffer”:

0,1M Glycin, pH 2,5

“Strip”-Waschpuffer:

0,1M Tris, pH 7,5

ELISA:

PBS-Waschpuffer:

0,05% Tween-20 in PBS, pH 7,4

Blockingreagenz:

1% BSA

5% Sucrose

0,05% NaN₃

Diluent:

0,1% BSA (fettsäurefrei)

0,05% Tween-20

20mM Tris (0,024g/ 10ml)

150mM NaCl (=,=88g/ 10ml)

pH 7,3

PCR:

dNTP-Lösung:

- 10µl dATP-Lösung 100mM (Endkonz 10mM)
- 10µl dTTP-Lösung 100mM (Endkonz 10mM)
- 10µl dGTP-Lösung 100mM (Endkonz 10mM)
- 10µl dCTP-Lösung 100mM (Endkonz 10mM)

RNA/ DNA- Gelelektrophorese:

TAE-Puffer (50x):

- 242g Tris-Base
- 57,1 ml Eisessig
- 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0
- ad 1l mit Aqua dest.

TAE-Puffer (1x):

- 1:50-Verdünnung von TAE-Puffer (50x) mit Aqua dest.
- Entspricht: 0,04M Tris-Acetat und 0.001M EDTA

Gel-Färbelösung:

- 500ml Wasser
- 25 µl Ethidiumbromid

5x RNA running buffer:

- 0,1M MOPS, pH 7,0
- 40mM Natriumacetat
- 5mM EDTA, pH 8,0

RNA-Agarose-Gel, 1%:

- 1g Agarose
 - 75 ml RNase-freies Aqua dest.
 - 20ml 5x-running-buffer
 - 5ml Formamid
- } zuerst zusammen aufkochen,
dann die übrigen Reagenzien dazu

5x RNA-Farbe:

- 50% Glycerin
- 1mM EDTA
- 10mM Natriumphosphat, pH 7,0
- 0,25% Bromphenolblau
- 0,25% Xylene cyanol

5x RNA-Probenpuffer:

- 50µl Formamid
- 10µl Formalin
- 20µl 5x RNA-Farbe
- 20µl 5x RNA running buffer

Northern Blot:

20x SSC-Puffer (pH 7,0):

- 3M NaCl
- 300mM Na₃ –Citrat

Hybridisierungspuffer:

„ExpressHyb“ Hybridisierungslösung der Firma Clontech (#8015-1)

Hybridisierungs-Waschpuffer 1:

- 2x SSC (aus 20x SSC)
- 0,1% SDS

Hybridisierungs-Waschpuffer 2:

- 0,1x SSC (aus 20x SSC)
- 0,1% SDS

EMSA:

10 x TBE:

- 108g Tris
- 55g Borsäure
- 6,72g EDTA
- auf 1l auffüllen

0,5 x TBE

1:20- Verdünnung des 10x TBE mit Aqua dest.

Lauffrontanzeiger:

- 250mM Tris-HCl, pH 7,5
- 0,2% Bromphenolblau
- 40% Glycerin

3.1.9 Oligonukleotide

Die für die RT-PCR verwendeten Oligo-(dT)₁₅ –Primer wurden von der Firma Promega, Mannheim, unter der Bestellnummer C1101 bezogen.

Alle übrigen Primer wurden zur Synthese bei der Firma MWG Biotech in Auftrag gegeben, nach Erhalt entsprechend der Angabe des Herstellers zu 100 pmol/ml in Aqua bidest. gelöst und aliquotiert. Vor Gebrauch wurden Arbeitsverdünnungen zu 10pmol/ ml hergestellt.

Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide:

Primer	Sequenz
Humane Primer	
hVEGF sense	5'-ATG GCA GAA GGA GGG CAG CAT- 3'
hVEGF antisense	5'-TTG GTG AGG TTT GAT CCG CAT CAT- 3'
hVEGFsplice sense	5'-CCA TGA ACT TTC TGC TGT CTT-3'
hVEGFsplice antisense	5'-TCG ATC GTT CTG TAT CAG TCT-3'
hβ-Aktin sense	5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG -3'
hβ-Aktin antisense	5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC - 3'
hVEGFR-1 sense	5'-GTA GCT GGC AAG CGG TCT TAC CGG CTC-3'
hVEGFR-1 antisense	5'-GGA TTT GTC TGC TGC CCA GTG GGT AGA GA-3'
hVEGFR-2 sense	5'-TAT AGA TGG TGT AAC CCG GA-3'
hVEGFR-2 antisense	5'-TTT GTC ACT GAG ACA GCT TGG-3'
hGAP DH sense	5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3'
hGAP DH antisense	5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'
hL7 sense	5'-AGA TGT ACA GAA CTG AAA TTC-3'
hL7 antisense	5'-ATT TAC CAA GAG ATC GAG CAA-3'
Murine Primer:	
mVEGFsplice sense	5'-GCG GGC TGC CTC GCA GTC-3'
mVEGFsplice antisense	5'-TCA CCG CCT TGG CTT GTC AC-3'
mβ-Aktin sense	5'-TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G-3'
mβ-Aktin antisense	5'-TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3'
mVEGFR-1 sense	5'-ACA TGG GAC AGT AGG AGA-3'
mVEGFR-1 antisense	5'-ACG GAG GTG TTG AAA GAC-3'
mVEGFR-2 sense	5'-GAC CTG GAC TGG CTT TGG-3'

mVEGFR-2 antisense	5'-TCT CTT TTC TGG ATA CCT-3'
Ratten-Primer:	
rVEGFsplice sense	5'-TGC ACC CAC GAC AGA AGG GGA-3'
rVEGFsplice antisense	5'-TCA CCG CCT TGG CTT GTC ACA-3'
rβ-Aktin sense	5'-ATC GTG GGC CGC CCT AGG CAC-3'
rβ-Aktin antisense	5'-CTC ATA GAT GGG CAC AGT GTG-3'
rVEGFR-1 sense	5'-CAA GGG ACT CTA CAC TTG TC-3'
rVEGFR-1 antisense	5'-CCG AAT AGC GAG CAG ATT TC-3'
rVEGFR-2 sense	5'-GCC AAT GAA GGG GAA CTG AAG AC-3'
rVEGFR-2 antisense	5'-TCT GAC TGC TGG TGA TGC TGT C-3'

Tabelle 2: Auflistung der Sequenzen der verwendeten Primerpaare.

3.1.10 Zellmaterial

3.1.10.1 Primärkulturen

Mikrogliazellen der Ratte: postnatale Primärkulturen aus Wistar-Ratten am Anatomischen Institut der Universität Kiel

Zellen solider Tumoren: Primärkulturen aus operativ entfernten Gehirntumoren, aus der Neurochirurgischen Klinik der Uni Kiel

3.1.10.2 Zelllinien

Die Mikroglia-Zelllinie BV-2 wurde mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. Ralph Lucius, Anatomisches Institut der CAU, überlassen, die Zelllinie U118 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen, die Zelllinie U343 ist eine freundliche Gabe des Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg.

Die verwendeten Zelllinien sind in folgender Tabelle charakterisiert:

Zelllinie	Ursprungsart	Ursprungsgewebe
-----------	--------------	-----------------

BV-2	Maus	Mikroglia
U 118 MG	Mensch	Glioblastom
U 343	Mensch	Glioblastom

Tabelle 3: Auflistung der in den Versuchsreihen verwendeten Zelllinien und humanen Tumoren

3.1.10.3 Solide humane Tumoren

Die für die unterschiedlichen Versuchsreihen verwendeten humanen Astrozytome und Glioblastome wurden von der Neurochirurgischen Klinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Dr. Heinz-Hermann Hugo, Prof. Dr. Hubertus M. Mehdorn zur Verfügung gestellt.

Name	Ursprungsart	Ursprungsgewebe	WHO-Grad
A 761	Mensch	Glioblastom	IV
A 764	Mensch	Glioblastom	IV
A 767	Mensch	Glioblastom	IV
A 776	Mensch	Glioblastom	IV
A 778	Mensch	Glioblastom	IV
A 780	Mensch	Glioblastom	IV
A 789	Mensch	Glioblastom	IV
A 790	Mensch	Glioblastom	IV

Tabelle 4: Verwendete kultivierte solide Tumoren

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 *Kultivierung von Zelllinien*

Es wurden die humanen Gliomazelllinien U343 und U118 sowie die murine Mikroglia-Zelllinie BV-2 in Kultur genommen.

Zunächst wurden die Zellen, die in Einfriermedium („DMSO-Medium“, siehe Abschnitt 3.1.7.1) bei 80 K gelagert werden, im Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und in Zentrifugenröhrchen mit 6ml Standard-Nährmedium überführt. Das in dem Einfriermedium enthaltene DMSO wirkt toxisch auf die Zellen und musste deshalb schnell entfernt werden. Dazu wurden die Zellen bei 400 x g und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert und der DMSO-haltige Überstand abgezogen. Die Zellen wurden nun vorsichtig in 5ml Standard-Nährmedium resuspendiert und in zusätzlichen 15ml Medium in einer 75cm²-Kulturflasche angezogen. Nach einem Tag wurde das Medium erneut gewechselt, um letzte Reste des DMSO zu entfernen.

Die angezüchteten Zellen wuchsen adhärent als Monolayer. Nach einigen Tagen - abhängig von der Anzahl der ausgesäten Zellen und von der Zellart - war das Monolayer zu einem konfluenten Zellrasen angewachsen, und die Zellen mussten subkultiviert werden.

3.2.1.2 *Subkultivierung der Zelllinien*

Waren die Zellen in der Zellkulturflasche so dicht gewachsen, dass sie einen konfluenten Monolayer bildeten, mussten sie subkultiviert werden. Dazu wurde das Nährmedium abgezogen und die Zellen einmal mit FKS-freiem DMEM-Medium gespült. Danach ließ man 5 ml Trypsin-Lösung für 15 Sekunden auf die Zellen einwirken, entfernte das Trypsin wieder und inkubierte die Zellen für 5 min bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen durch kräftiges Schlagen auf den Boden der Zellkulturflasche und anschließendes mehrmaliges Spülen mit 5 ml Nährmedium vollständig gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Probenröhrchen überführt und zur Zellzählung eingesetzt.

Dazu wurde ein Aliquot von 30µl mit demselben Volumen Trypanblau-Lösung versetzt und 1 min inkubiert. Danach wurde in einer Neubauerkammer die Zellzahl bestimmt.

Da die verschiedenen Zelllinien ein anderes Wachstumsverhalten zeigten, wurden unterschiedliche Mengen zur Weiterkultivierung ausgesät: Die jeweiligen Bedingungen der Zelltypen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Zelllinie	In 75cm ² große Flaschen ausgesäte Menge	konfluent nach	kultiviert bis
U 343	5 / 2 Mio	3 / 7 Tagen	ca. 20. SK
U 118	4 / 1,5 Mio	3 / 7 Tagen	ca. 20. SK
BV-2	2 / 0,5 Mio	2 / 6 Tagen	keine Grenze

Tabelle 5: Wachstumsverhalten der verwendeten Zelllinien

3.2.1.3 Kultivierung der soliden human Gliome

Alle in der Tabelle 4 aufgeführten soliden humanen Tumoren wurden zur Kultivierung bereitgestellt.

Zu Beginn der Kultivierung mussten die Glioblastome einem Aufarbeitungsprozess unterzogen werden. Hierzu wurde zunächst das Transportmedium abgegossen, anschließend das Material dreimal in kaltem PBS gespült und in ein neues steriles Kulturschälchen überführt. Nach einer makroskopischen Präparation zur Entfernung von Bindegewebe, Gefäßen, etc. wurde das Material in ca. 1mm³ kleine Stücke zerschnitten. Je nach Menge des verarbeiteten Zellmaterials erfolgte dann eine 15 minütige Inkubation mit 5ml Dissoziationslösung (10ml DMEM/ HEPES, Trypsin, EDTA) plus 50µl DNase-Lösung bei 37°C. Nach mehrmaligem Aufziehen des Materials mit einer Pasteurpipette ließ man die separierten Zellen absetzen, verwarf den Kulturüberstand und überführte die Suspension in eine 75cm², mit DMEM beschickte Kulturflasche. Die Kultivierung der adhärenz als Monolayer wachsenden Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und Wasserdampfsättigung.

3.2.2 Immunhistochemische Methoden

Mit Hilfe der Immunhistochemie lassen sich spezifische Antigene, wie z. B. Proteine, in Zellen nachweisen. Die Herstellung des für den immunhistochemischen Nachweis benötigten Antikörpers erfolgt, indem man ein gereinigtes Protein in eine andere Spezies injiziert und anschließend die gegen das Protein gebildeten Antikörper aus dessen Blut gewinnt. Diese werden mit den zu untersuchenden Zellen inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe werden gewöhnlich durch einen Zweitantikörper (gerichtet gegen den Fc-Teil der Immunglobuline des Spendertieres) sichtbar gemacht, an den ein fluoreszierender Stoff oder ein Enzym gekoppelt ist, das in einer Folgereaktion ein farbiges Produkt bildet (Leonhardt, 1985)

3.2.2.1 Nachweis des „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP)

Das „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) ist ein für Gliazellen spezifisches Skelettprotein (Raff et al., 1979), das hier in den kultivierten Zellen nachgewiesen wurde, um die Reinheit der Kulturen zu überprüfen. Der Antigen-Antikörperkomplex wird durch Anlagerung eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper über eine Farbreaktion sichtbar gemacht.

Zur Inkubation mit dem anti-GFAP-Serum musste das zu untersuchende Zellmaterial zunächst auf Deckgläschen angezogen werden. Hierzu wurden die Deckgläschen mit 0,02%iger Poly-D-Lysin-Lösung beschichtet, um die Anheftung der negativ geladenen Zellmembranen an das Glas durch die positiven Ladungen des basischen Polymers zu erleichtern (Lindl und Bauer, 1994). Nach Ablösen des Zellmaterials im Zuge einer konventionellen Subkultivierung wurden ca. 100.000 Zellen auf ein in einer Petrischale liegendes, mit 2-3 Tropfen Nährmedium versehenes Deckglas gegeben. Nach ca. 2 h ließ sich die Schale vorsichtig mit 2 ml Medium auffüllen.

Nach einigen Tagen konnte das Nährmedium abgegossen, das Zellmaterial mit Tris- NaCl gespült und durch Zugabe von -20°C kaltem Aceton für 10 min bei 4°C fixiert werden. Nach gründlichem Spülen mit Tris-NaCl-Puffer wurde auf jedes Deckglas 100 μl anti-GFAP- Lösung gegeben und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Zellmaterial wurde dann zweimal für 5 min mit TBS-Lösung gewaschen und anschließend mit dem Zweitantikörper eines Immunfärbekits (Universal immunostainig Kit“, Immunotech,

Frankreich) inkubiert. Dabei wurde genau nach Herstellerangaben verfahren. Die Färbreaktion erfolgte mittels eines Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Streptavidin-Komplexes. Die Zellkerne wurden schließlich mit Hämalaun-Färbelösung 5 min gegengefärbt, die Zellen in PBS/ Glycerin (9:1) eingebettet und mit Hilfe eines konventionellen Lichtmikroskops ausgewertet.

3.2.2.2 Nachweis von CD 68

Um kontaminierende Mikrogliazellen und Makrophagen in den verwendeten Zellkulturen zu identifizieren, wurde eine immunhistochemische Färbereaktion mit dem gegen humanes CD68 gerichteten monoklonalem Antikörper Ki-M6 durchgeführt. CD 68 gehört zu einer Familie von sauren, stark glykosylierten lysosomalen Glykoproteinen, die nicht nur in Makrophagen, Monocyten, Neutrophilen, Basophilen und Lymphozyten, sondern auch in zytoplasmatischen Granula vorkommen.

Das auf Deckgläschen kultivierte Zellmaterial wurde wie oben beschrieben in Aceton fixiert, mit anti-Ki-M6-Lösung inkubiert (Pawaresch et al., 1986), gewaschen und mittels eines Immundefärbekits detektiert. Dabei wurden die Zellen zunächst mit einem Universal-Zweitantikörper inkubiert. Danach erfolgte die Kopplung eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes und eine Reaktion mit dem beigefügten Chromogen. Nach einer abschließenden Hämalaunfärbung konnten die eingebetteten Präparate begutachtet werden.

3.2.2.3 Nachweis von VEGF

Zum Nachweis der Expression von VEGF in Gliomazellen wurden ca. 50.000 Zellen direkt auf speziell beschichtete Objektträger (HistoBond Adhesion Micro Slides, Marienfeld, Germany) ausgesät. Nach ca. 2 h waren die Zellen weitgehend angeheftet und konnten mit Medium versorgt werden. In Petrischalen kultivierte man die Zellen dann 2-3 Tage, sodass sie zwar gut angewachsen, aber noch nicht zu dicht geworden waren. Danach wurde das Medium abgezogen, und die Objektträger mit PBS gespült. Dann gab man auf die Zellen 0,1 % Saponin, um eine bessere Durchlässigkeit der Zellmembran zu erreichen und ließ 15 min bei 4 °C inkubieren, bevor das Saponin entfernt und erneut mit PBS

gespült wurde. Die Objektträger wurden zur Fixierung der Zellen in 4% Paraformaldehyd gegeben, wo sie bis zu 14 Tagen bei 4°C verbleiben konnten.

Zum immunhistochemischen Nachweis des VEGF wurden die Objektträger zunächst mit 3% Wasserstoffperoxid behandelt, um die Gewebeperoxidasen zu inaktivieren. Anschließend folgte ein Schritt, der der Demaskierung der spezifischen Epitope galt: Die Zellen wurden in 0,01 M Natriumcitratpuffer (pH 6,0) gekocht (Mikrowelle, 750W), bevor sie dann 5 min mit TBS gespült und mit Kaninchenserum abgeblockt wurden (1: 5 Verdünnung in TBS). Dann wurde der Primärantikörper in TBS verdünnt und auf die Zellen gegeben (siehe Tabelle 1, Seite 18). Man ließ ihn 60 min inkubieren und spülte dann für 15 min mit TBS. Anschließend erfolgte eine 45 minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper, bevor erneut für 5 min mit TBS gewaschen wurde. Nun wurde der Peroxidase-markierte Streptavidin- Biotin-Komplex (DAKO A/S, Dänemark) auf die Zellen gegeben und nach 30 min durch fünfminütigen Waschen mit TBS entfernt. Man inkubierte für 20 min mit dem AEC Chromogen (DAKO, USA), bevor mit Aqua dest gewaschen und mit Hämalaun gegengefärbt wurde. Die Objektträger wurden mit Aquatex (Merck) versiegelt.

3.2.2.4 Nachweis VEGF- Rezeptoren

Zum Nachweis der VEGF-Rezeptorproteine wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und zwei Tage angezogen (siehe Abschnitt 3.2.2.1). Sie wurden dann mit PBS gespült und für 15 min bei 4°C mit einer 0,1 %igen Saponin-Lösung inkubiert. Mit diesem Detergens sollten die Zellmembranen porös gemacht werden, um ein späteres durchdringen der Antikörper, welche gegen intrazelluläre Epitope der Rezeptoren gerichtet waren, zu ermöglichen. Die Zellen wurden nach nochmaligem Spülen mit PBS Aceton-fixiert und unter Zuhilfenahme des „Universal Immunostaining Kit Streptavidin-Peroxidase“ (Immunotech, Marseille, Frankreich) gefärbt. Dabei hielt man sich genau an die Angaben des Herstellers. Die Primär-Antikörper flt-1 (anti-VEGFR-1, Kaninchen polyklonal) und KDR (anti-VEGFR-2, Maus monoklonal) wurden in den in Tabelle 1 angegebenen Verdünnungen eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente der in dem „Kit“ enthaltene biotinylierte, polyvalente Sekundärantikörper, der sowohl Kaninchen, als auch Maus- Antikörper erkennt. Nach Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun wurden die

Deckgläschen mit Hilfe von Glycerin auf Objektträgern fixiert und Lichtmikroskopisch begutachtet.

3.2.3 Isolierung von Proteinen verschiedener Zellfraktionen

Es gibt Verfahren, unmittelbar nach der Lyse von Zellen, bestimmte Fraktionen von Zellproteinen, wie z.B. Membranproteine oder Proteine aus dem Zellkern, während der Isolierung anzureichern. Dies erweist sich als sinnvoll, will man z. B. membranverankerte Rezeptoren im Western Blot nachweisen, oder die im Zellkern befindlichen Transkriptionsfaktoren via „EMSA“. Da in beiden Verfahren nur eine geringe Menge an Protein eingesetzt werden kann, ist es sinnvoll, das gesuchte Protein so gut wie möglich anzureichern.

3.2.3.1 Isolierung von Zellmembranen

Will man Zellmembranen isolieren, lysiert man die Zellen unmittelbar nach der Stimulation zunächst in niedrigmolarem Puffer, der die Zellmembran zum Platzen bringt. Beim Nachweis phosphorylierter Proteine, müssen diesem und allen weiteren Lysispuffern Hemmstoffe zugesetzt sein (siehe Tabelle 6). Folgendes Verfahren habe ich bei Nachweis von phosphorylierten Tyrosinkinaserzeptoren angewendet:

Nachdem die Zellen in kleinen Zellkulturflaschen stimuliert worden waren, wurde das Medium entfernt, einmal mit kaltem PBS gespült, und schließlich mit 1ml eiskaltem Lysispuffer (5mM HEPES, pH 7,4, 2mM Vanadat) lysiert. Man ließ die Zellen noch ca. 15 min auf Eis oder im Kühlschrank lysieren, bevor sie abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt wurden. Die Lysate wurden zunächst gründlich durchmischt (Vortex-Mixer) und dann einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Dazu wurden sie entweder für 10 min im Ultraschallbad oder für 1min mit dem Ultraschallstab behandelt. Dann wurde in einer gekühlten Zentrifuge bei 4°C und 800 x g für 10 Minuten der Zelldebris sedimentiert und verworfen. Der Überstand wurde mit 100µl 200mM HEPES/ 1,4M NaCl versetzt, gut durchmischt und erneut zentrifugiert, diesesmal bei 4°C und 14 000rpm für eine Stunde. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 50 µl Aufnahmebuffer (20mM HEPES, 140mM NaCl, 2mM Vanadat) aufgenommen. Nachdem die Suspension gut durchmischt war, wurde sie meist unmittelbar in eine Proteinbestimmung und nachfolgend

im Western Blot eingesetzt. Das Einfrieren der Proben sollte möglichst vermieden werden und ist nur für kurze Zeit möglich.

3.2.3.2 Isolierung von Zellhomogenaten

Einige Zellbestandteile können sich in verschiedenen Bereichen der Zelle aufhalten. Die MAP-Kinasen (MAPK) z. B. finden sich in der Regel im Zytoplasma, wandern aber nach Aktivierung häufig in den Zellkern. Dewegen habe ich zur Untersuchung von MAPK Zellhomogenate isoliert und eingesetzt.

Um diese zu gewinnen, wurden die Zellen nach Stimulation in kleinen Zellkulturflaschen mit kaltem PBS gespült und anschließend mit 600-800µl (je nach Dichte und Art der Zellen) eiskaltem Triton-Lysispuffer versetzt. Je nach Anwendung müssen hierbei dem Lysispuffer Hemmstoffe zugesetzt werden (s. Tabelle 6, S.38). Die Zellen lösten sich gut erkennbar auf und konnten sofort abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt werden. Danach wird das Lysat kräftig mit dem Vortex-Mixer gemischt. Das in dem Puffer enthaltene TritonX-100 ist ein Detergens und kann die Zellmembranen vollständig auflösen. Nukleinsäuren und Mitochondrien jedoch lösen sich nicht immer vollständig und mussten durch Zentrifugation für 15 Min bei 4°C und 14.000rpm abgetrennt werden. Die Überstände können eingefroren oder direkt in Proteinbestimmung und Western Blot eingesetzt werden.

3.2.3.3 Isolierung von Kernproteinen

Sollen Proteine der Zellkernfraktion detektiert werden, wie z. B. die Transkriptionsfaktoren im „EMSA“, wird diese nach folgendem Verfahren angereichert: Die Zellen wurden in kleinen Zellkulturflaschen ausgesät und stimuliert. Nach Entfernen des Stimulationsmediums wurde mit 5ml warmem PBS gespült, danach sofort 500µl eiskalter Puffer A auf die Zellen gegeben und die Zellen abgekratzt. Sie wurden dann möglichst bald in ein Reaktionsgefäß überführt und 10 Sekunden mit dem Vortex-Mixer gemischt. Danach standen die Proben mindesten eine Stunde bei 0-4°C, bevor sie 5 min bei 4°C im Schüttler geschüttelt und anschließend bei 1300 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden verworfen, und das Kernpellet wurde in 50µl Puffer B resuspendiert .Die Suspension wurde wiederum für 15 min bei 4°C geschüttelt und anschließend für 10 min bei 4°C und 13.000rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt die

gelösten Kernproteine. Er wurde in neue Gefäße überführt und bei -20°C bzw. -70°C eingefroren.

3.2.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der durch FANGER (1987) modifizierte Methode von BRADFORD (1976). Dazu wurden jeweils 5-10 μl Proteinprobe mit 10 μl n-Hexyl- β -D-glucopyranosid versetzt und 5 min vermischt. Anschließend wurden 800 μl Aqua dest. und 200 μl Bio-Rad Protein Assay Lösung zugegeben und vermischt. Man ließ die Proben für 20 min bei Raumtemperatur stehen, bevor die Extinktion bei 595 nm Wellenlänge bestimmt wurde. Die Proteinmenge ergab sich durch Vergleich mit einer Rinderserumalbumin-Standardreihe.

3.2.5 Western Blot

3.2.5.1 Prinzip der Methode des Western Blottings

Bei der Methode des „Western Blottings“ werden Proteine in einer vertikalen Elektrophoresekammer logarithmisch ihrer Größe nach aufgetrennt, um anschließend durch „semi-dry blotting“ auf eine Art Löschpapier übertragen zu werden (Blotting).

In den meisten Fällen sollte mit Hilfe der Western Blot Methode untersucht werden, welche Signalkaskaden innerhalb der Zellen durch bestimmte Stimuli aktiviert bzw. inhibiert wurden. So kann man die Aktivierung eines Tyrosinkinase-Rezeptors, wie z. B. des EGF-Rezeptors, dadurch nachweisen, dass man Zellen mit dem Liganden, in diesem Falle EGF, stimuliert, nach kurzer Zeit die Stimulation unterbricht und die Zellen dann sofort lysiert. Dabei muss man darauf achten, dass die Phosphorylierung des Rezeptors –als Indikator der Aktivierung- erhalten bleibt. Deshalb mussten dem Lysispuffer Hemmstoffe zugesetzt sein, die Proteasen oder Phosphatasen inhibieren konnten (siehe untenstehende Tabelle 6). Nach der Lyse werden die entsprechenden Zellfraktionen angereichert, in einer vertikalen Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Mit Hilfe von Antikörpern, die gegen das phosphorylierte Protein gerichtet sind, kann die Aktivierung wie in Abschnitt 3.2.6.3 beschrieben nachgewiesen werden.

Hemmstoff	Wirkung	Stocklösung	Arbeits- verdünnung	verwendet bei
Natrium- orthovanadat	Inhibiert Tyrosin- Phosphatasen, Alkalische Phosphatase und ATPase	1M in H ₂ O	2mM	Jedem Western Blot
DTT	hält SH-Gruppen im reduzierten Zustand	100mM in H ₂ O	1mM	EMSA
PMSF	inhibiert Serin-Proteasen	100mM in Ethanol	1mM bzw. 0,5mM	pAkt (Ser), EMSA
pNPP	Phosphatase-Substrat	100mM in H ₂ O	1mM	pERK, p-p38 pTyr,
β-Glycero- phosphat	Phosphatase-Inhibitor	100mM in H ₂ O	40mM	pERK, p-p38 pTyr, pAkt
Leupeptin	Inhibiert Serin- und Cystein-Proteasen	100mg/ ml in H ₂ O	1µg/ ml	pAkt
Aprotinin	Protease-Inhibitor	100mg/ ml in H ₂ O	10µg/ ml	EMSA

Tabelle 6: Verzeichnis der in den Lysispuffern verwendeten Hemmstoffe

3.2.5.2 Stimulation und Lyse der Zellen

Bei der Stimulation von Zellen zur Untersuchung von Signalkaskaden muss man auf zwei Dinge ganz besonders achten. Zum einen sind die Stimulationszeiten sehr kurz. So können z. B. die Rezeptoren, die am Anfang der Signalkaskade stehen, schon nach einer Minute, oder die MAP-Kinasen, wie zum Beispiel die „ERK“ bereits nach fünf Minuten phosphoryliert sein. Zum anderen reagiert eine Zelle auf äußere Einflüsse oder Stress, wie z. B. Änderungen im pH-Wert oder in der Temperatur, eventuell durch Einschalten von sogenannten Stress-Signalwegen, die ihrerseits den zu untersuchenden Signalweg beeinflussen können. Deswegen muss bei den Stimulationsexperimenten darauf geachtet werden, dass die Umgebung der Zelle sich nicht verändert, dass also die Temperatur und der pH-Wert konstant bleiben und dass keine zusätzlichen Fremdstoffe außer dem Stimulans an die Zelle gelangen. Wenn dieses nicht möglich ist, wenn also z. B. ein Stoff in toxischem Lösungsmittel wie DMSO gelöst ist, muss dieser Stoff in der gleichen Menge allen zu stimulierenden Flaschen zugefügt werden. Außerdem werden die Stimulantien

vortemperiert und immer in genau dem gleichen Volumen (50µl) zu den Zellen gegeben. Damit ist gewährleistet, dass alle Zellen die gleichen Bedingungen während des Experimentes hatten, und dass gemessene Effekte wirklich nur auf die unterschiedlichen Stimulantien zurückzuführen sind.

Meist sollte bei einem Experiment der Effekt eines bestimmten Cytokins untersucht werden. Als Negativ-Kontrolle wurden die Zellen nur mit Stimulationsmedium behandelt. Zusätzlich stimulierte ich als Positiv-Kontrolle mit einem Wachstumsfaktor, von dem bekannt ist, dass er das zu untersuchende Protein aktivierte. Häufig wurden Doppelwerte genommen, um das Ergebnis statistisch abzusichern.

Die Zellen wurden in entsprechender Anzahl (siehe Tabelle 3, S. 32) in kleine (25cm²) Zellkulturflaschen ausgesät und 2-4 Tage angezogen, bis sie annähernd konfluent gewachsen waren. U343- und U118-Zellen wurden dann dreimal für 20 min mit je 5 ml Stimulationsmedium (ohne FKS) gespült, bevor die Stimulantien zugegeben wurden. BV-2-Zellen wurden bereits einen Tag vor der Stimulation dreimal mit je 5 ml Mikroglia-Stimulationsmedium (0,5% FKS) gespült. Die Stimulantien wurden gemäß untenstehender Tabelle in dem jeweiligen Stimulationsmedium angesetzt und verdünnt. Als letzten Verdünnungsschritt wählte ich jeweils eine 1:100- Verdünnung, so dass die Stimulantien in Portionen zu 50µl den Zellen zugesetzt werden konnten. Sie wurden auf 37°C temperiert. Dann wurden die zu stimulierenden Flaschen im Abstand von 2 min einzeln aus dem Brutschrank genommen, das Stimulans zupipettiert, und sofort in den Brutschrank zurückgestellt. Die Zeit zählte sobald das Stimulans zugegeben war.

15 Sekunden vor Ablauf der Stimulationszeit wurden die Flaschen wieder aus dem Brutschrank entnommen, und mit dem Ablauf der Zeit wurde die Stimulation durch Senkrechtstellen der Flaschen gestoppt. Danach mussten die Zellen zügig aufgearbeitet werden um eine Weiterreaktion zu vermeiden. Sie wurden zunächst mit ca. 5 ml kaltem PBS gespült. Dieses wurde dann gründlich abgezogen und eiskalter Lysispuffer auf die Zellen gegeben. Nun wurden die Kulturflaschen auf Eis gestellt und die Zellen mit einem Zellkratzer abgekratzt. Das Lysat wurde in einer Ecke der Kulturflasche gesammelt und schräg im Eis stehend gelagert. Da vorher im Abstand von zwei Minuten stimuliert worden war, durfte die Aufarbeitung höchstens zwei Minuten dauern. Danach musste sofort die nächste Flasche aufgearbeitet werden. Nach Beendigung der Stimulationsreihe wurden

die Lysate in Eppendorf-Caps überführt, entsprechend Abschnitt 3.2.4.2 weiterverarbeitet und eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Stimulus	Stock-konzentration	Stimulations-Konzentration	Lösungsmittel
VEGF (human und murin)	0,1 mg / ml	10 ng / ml	PBS/ 0,1% BSA
SS	1 mM	1 nM	PBS/ 0,1% BSA
EGF	1 mg / ml	20 ng / ml	10mM Essigsäure
TNF-a	0,1 mg / ml	50 ng / ml	H ₂ O/ 0,1% BSA
bFGF	0,1 mg / ml	20 ng / ml	PBS/ 0,1% BSA
IL-3	0,5µg/ ml	50ng/ ml	H ₂ O

Tabelle 7: Konzentrationen der zur Stimulation verwendeten Zytokine

3.2.5.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Ein wichtiger Schritt bei Durchführung eines „Western Blots“ ist die logarithmische Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe. Dazu bedient man sich in der Regel der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Prinzip dieses elektrophoretischen Verfahrens ist es, die Proteine durch Zugabe des sich an sie anlagernden Detergens SDS mit einer einheitlich negativen Ladung zu versehen. Durch vorhergehendes Denaturieren mit z. B. DTT oder β -Mercapto-Ethanol werden Sekundärstrukturen weitgehend aufgebrochen, sodass die Proteine letztlich im Elektrischen Feld streng ihrer Größe nach aufgetrennt werden können.

Zunächst wurden die Glasscheiben und Spacer der Elektrophoresekammer mit 70%igem Ethanol entfettet. Dann wurde das Trenngel gemäß untenstehender Tabelle angesetzt und die Gelkammer zu ca. $\frac{3}{4}$ damit befüllt. Für die Auftrennung von Zellmembranen wurde ein 5%iges Trenngel gegossen, für die Untersuchung cytosolischer Proteine zwischen 30 und 100 kDa Größe ein zehnzehntiges und für kleinere Proteine ein 12,5%iges. Nach dem Gießen wurde das noch flüssige Gel mit 100%igem Isopropanol überschichtet, um ein Austrocknen des Geles zu vermeiden und um eine glatte, blasenfreie Gelkante zu erhalten. Nach ca. 10 min war das Gel auspolymerisiert. Nun wurde das Sammelgel angesetzt, das Isopropanol entfernt und der verbleibende Raum der Kammer mit dem Sammelgel befüllt. Anschließend wurden sofort die Kämme eingesetzt.

	Sammelgel	Trenngel 5%	Trenngel 10%	Trenngel 15%
Gelpuffer I		2,5 ml	2,6 ml	2,6 ml
Gelpuffer II	2,5 ml			
Acrylamid/ Bisacrylamid (30% / 0,8%; Serva)	1,5 ml	1,67 ml	3,33 ml	5 ml
dest. Wasser	5,91 ml	5,74 ml	4,03 ml	2,31 ml
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

Tabelle 8: Gelzusammensetzung für die SDS-Page von Proteinen (angegebene Menge ausreichend für zwei Gele).

Nach 30 minütiger Polymerisationsdauer wurden die Kämme entfernt und die Geltaschen mit Wasser gespült, um unpolymersierte Gelpufferreste zu entfernen.

Die Proteinproben und ein Molekulargewichtsmarker wurden mit Probenpuffer vermischt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Danach ließ man die Proben kurz abkühlen und sammelte entstandenes Kondensat durch kurzes Zentrifugieren. Nun wurden die Proben aufgetragen und die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer befüllt.

Im anodischen Teil der Kammer wurde etwas Bromphenolblau in den Laufpuffer gegeben, das als Lauffrontanzeige diente. Die Spannungsquelle wurde auf konstante 75 mA eingestellt (entspricht 0,25mA/cm²). Nach ca. 45 min war das Bromphenolblau bis zur unteren Gelkante gelaufen und die Elektrophorese beendet.

Als zusätzliche Anzeige für das Fortschreiten der Elektrophorese konnte der Molekulargewichtsstandard dienen. Hier wurde ein sogenannter „Rainbowmarker“ verwendet, der in verschiedenen Tönen vorgefärbte, und somit mit bloßem Auge sichtbare Proteine als Größenstandard enthielt.

3.2.5.4 „Semi-Dry-Blotting“

Beim sogenannten “semi-dry-blotting” werden die Proteine mit Hilfe von Strom aus dem Gel auf eine Polymer-Membran – meist eine PVDF-Membran- übertragen, auf der sie durch die Eigenschaften des Polymers festgehalten und fixiert werden.

Zunächst wurden die Elektroden der Blottingapparatur mit Transferpuffer angefeuchtet. Dann wurden zwei Lagen starkes Blottingpapier („17“ CHR, Whatman) etwas größer als die Proteingele zugeschnitten, in Transferpuffer getränkt und übereinander auf die Anode gelegt, die den Untergrund des Gerätes darstellte. Die PVDF-Membran wurde zuvor auf die Größe des Geles zugeschnitten und zunächst für 10-20 Sekunden in Methanol aktiviert, dann für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Danach wurde sie auf das Blottingpapier gelegt. Das Proteingel wurde vorsichtig von den Glasplatten der Elektrophoresekammer gelöst und auf die PVDF-Membran gelegt. Man musste hier darauf achten, dass die einzelnen Lagen überall Kontakt zueinander hatten und keine Luftblasen oder Gelreste den Transfer behindern konnten. Nun wurden zwei weitere Lagen in Transferpuffer getränkten Whatman-papieres auf das Gel gelegt. Diese bildeten nach dem nun folgenden Schließen der Apparatur den Kontakt zur Kathode. Die Stromquelle wurde auf 25V und 170mA eingestellt und der Transfer gestartet. Dabei wurden die 25V nie erreicht sondern dienten nur als obere Grenze, denn ein Überschreiten derselben hätte einen Defekt des Gerätes zur Folge. Die Dauer des Transfers war Abhängig von der Größe der zu übertragenden Proteine und schwankte zwischen 1 Stunde (für Proteine um 50kDa) und 2 Stunden (für Rezeptorproteine von 150-200kDa). Der Erfolg des Transfers konnte an dem verwendeten Rainbowmarker überprüft werden, denn war die Farbbande, deren Größe der des gesuchten Proteins entsprach, weitgehend vollständig übergetreten, konnte das Blotting beendet werden. Nach Kennzeichnung der Membran wurde sie in Blockingreagenz überführt.

3.2.5.5 Detektion der Proteinbanden

Die Detektion der spezifischen Proteinbanden beginnt mit dem Absätigen der PVDF-Membran mit einem tierischen Protein, dem sogenannten „blocking“. Dies dient dazu, bei der später erfolgenden Inkubation mit Antikörpern eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die geladene Membran zu verhindern, denn dies würde das spezifische

Signal stören oder sogar überdecken. Als Blocking Reagenz wurde, je nach zu verwendendem Antikörper, je 20ml einer 1%igen Lösung bovinen Serumalbumins (BSA) in TBST-Puffer oder je 20ml einer 5%-igen Lösung Casein in TBST verwendet (siehe Tabelle 9). Blockiert wurde wahlweise für 1h bei leichtem Schütteln und Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

Antikörper	Art	Verdünnung	Blocking-reagenz	Verw. Sekundärantikörper
p-ERK	Maus monoklonal	1:200	BSA	HRP-konjugierter Kaninchen anti-Mause
ERK 2	Maus monoklonal	1:250	BSA	HRP-Kaninchen-anti-Maus
PTyr	Maus monoclonal	1:250 (S.Cruz) 1:1000 (transd.lab.)	BSA	HRP-Kaninchen-anti-Maus
p-Akt (Ser)	Kaninchen polyklonal	1:400	Casein	HRP-Ziege-anti-Kaninchen
Akt	Kaninchen polyklonal	1:400	Casein	HRP-Ziege-anti-Kaninchen
p-p38	Kaninchen polyklonal	1:200	Casein	HRP-Ziege-anti-Kaninchen
VEGFR-1/ flt-1	Kaninchen polyklonal	1:100	Casein	HRP-Ziege-anti-Kaninchen

Tabelle 9: Bedingungen der im Western Blot verwendeten Antikörper

Bei Verwendung von BSA als Blockingreagenz wurde der Primärantikörper darin verdünnt und die Membran damit inkubiert. Bei Verwendung von Casein wurde die Membran dreimal für 10 Min mit ca. 50ml TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte dann in einer Lösung von 5% BSA in TBST. Die jeweiligen Primärantikörper wurden dazu gemäß Tabelle 9 in 1ml Blockingreagenz verdünnt und zur optimalen Benetzung zusammen mit der Membran in Schlauchfolie eingeschweißt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wurde ungebundener Antikörper durch dreimaliges, zwanzigminütiges Waschen mit TBST entfernt. Die darauffolgende Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der in TBST verdünnt war, erfolgte für eine Stunde bei

Raumtemperatur. Danach wurde die Membran wieder dreimal 20 min mit TBST gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit einem Zwei-Komponenten-Chemilumineszenz-Verstärkersystem („ECL“ = „Enhanced Chemiluminescence“, bzw. „ECL plus“ von Amersham Pharmacia) nach folgendem Prinzip:

Die am Sekundärantikörper haftende Meerrettich-Peroxidase oxidiert unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid das cyclische Diacylhydrazid Luminol und regt es dadurch an. Beim Zurückfallen auf das ursprüngliche Energieniveau emittiert es Licht. Phenole verstärken diese Reaktion um das 1000-fache und verlängern sie auch.

Die beiden Komponenten des ECL-Kits wurden gemäß Angabe des Herstellers angesetzt und auf die Blots gegeben. Nach angegebener Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit mit Hilfe von Fließpapier entfernt und der Blot in Frischhaltefolie eingeschlagen. Dies geschah zum einen, um ein Austrocknen der Membran zu verhindern, zum anderen um den aufzulegenden Film vor der Feuchtigkeit zu schützen. Durch Auflegen eines speziellen hochempfindlichen Filmes (Hyperfilm ECL, Amersham) für die Dauer von 10 Sekunden bis zu 30 min und anschließendem Entwickeln konnte die Chemilumineszenz detektiert werden.

3.2.6 Durchführung der Proliferationsversuche

Wird Zellen in Kultur ein radioaktiv markiertes Analogon der DNA-Bausteine, z. B. Tritium-markiertes Thymidin angeboten, so werden die Zellen entsprechend dem aktuellen Bedarf an DNA-Bausteinen innerhalb der DNA-Replikation -somit innerhalb der Zellteilung- dieses Basenanalogon in ihr Genom einbauen. Somit lassen sich je nach Menge des eingebauten radioaktiven Basenanalogons Rückschlüsse auf die Teilungsfreudigkeit, d.h. auf das Proliferationsverhalten des untersuchten Zellmaterials ziehen.

Es wurde das Proliferationsverhalten der Zelllinien U343, U118 und BV-2 unter Einwirkung verschiedener Stimulantien über verschiedene Zeiten untersucht.

3.2.6.1 Aussaat und Stimulation der Zellen

Von den BV-2-Zellen wurden je 50.000, von U343 und U118-Zellen je 100.000 Zellen in kleine (25cm²) Petrischalen ausgesät und 1-3 Tage in DMEM-Nähmedium kultiviert. Die Zellen sollten gut angewachsen, der Boden aber nur mäßig bedeckt sein (ca. 30% konfluent). Darauf war besonders bei den BV-2-Zellen zu achten, denn sobald diese konfluent gewachsen waren, lösten sie sich ab. Gerade deshalb war es auch wichtig, die Zellen gleichmäßig auszusäen, so dass Zellanhäufungen auf dem Kulturschalenboden vermieden wurden. Ein Abschwimmen von Zellen hätte das Ergebnis verfälscht.

Zur Stimulation wurde dann das Nähmedium abgezogen und die Zellen zweimal mit Stimulationsmedium gespült. Das diente dazu, das in dem Nähmedium enthaltene fötale Kälberserum zu entfernen, denn die Stimulationsmedien enthielten reduzierte Mengen oder gar kein Serum. Nach dem zweimaligen Spülen wurden die Stimulantien, gelöst in 2ml Stimulationsmedium, zugegeben. Es wurden immer mindestens Dreifachwerte ermittelt, als Negativ-Kontrolle diente jeweils reines Stimulationsmedium, als Positivkontrolle ein Wachstumsfaktor/ Cytokin, der bekannterweise die Proliferation anregte, oder Nähmedium (mit 10% FKS). Die Stimulationsdauer betrug in der Regel 48h. Waren die Zellen bereits nach 24h annähernd konfluent gewachsen, wurde vorher abgebrochen.

Fünf Stunden vor Ablauf der Stimulationsdauer erfolgte die Zugabe von 25µl einer 1:100-Verdünnung von [Methyl 1',2'-³H]-Thymidin (Endkonzentration 125µCi/ ml) für die verbleibenden 5 Stunden.

3.2.6.2 Aufarbeitung der Stimulationsansätze

Zur Aufarbeitung der Stimulationsansätze wurde zunächst das Stimulationsmedium entfernt und zweimal mit PBS gespült. Dann folgte eine fünfminütige Inkubation mit 1ml eiskaltem 100%igem Methanol und zwei weitere Spülgänge mit PBS. Danach wurden die Zellen für 5min mit 1ml kalter Trichloressigsäure (10%ig) behandelt und wieder zweimal mit PBS gespült. Schließlich wurden die Zellen durch Zugabe von 1ml kalter 0,3M NaOH für mindestens 30 min lysiert. Durch Zugabe von 1ml 0,3M HCl erfolgte die Neutralisation des Lysats. Dieses wurde dann in 20ml-Szintillationsgefäße überführt und mit 10ml Hydroluma-Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Proben blieben über Nacht stehen, um

eine vollständige Szintillations-Reaktion abzuwarten, und wurden am nächsten Tag im β -Counter gemessen.

3.2.7 VEGF-Sandwich-ELISA

Der „Enzyme linked immunosorbent Assay“ (ELISA) ist eine beliebte Methode, nicht nur, um Proteine nachzuweisen, sondern auch, um sie zu quantifizieren. Ein sogenannter „Sandwich-ELISA“, besteht aus zwei Antikörpern die spezifisch an zwei verschiedenen Epitope des nachzuweisenden Proteins binden. Der erste, der Fang (capture)- Antikörper bindet unspezifisch mit seinem Fc-Teil am Boden der Mikrotiterplatte, um das dann zugegebene Protein spezifisch an seinen Bindungsstellen zu binden. Danach wird der Detektions (detection-) Antikörper hinzugegeben, welcher ebenfalls spezifisch, und zusätzlich biotinyliert ist. Nach Kopplung mit einer Streptavidin-Peroxidase und Reaktion mit einem Substrat kann dieser Komplex sichtbar gemacht und bei geeigneter Substratwahl photometrisch ausgewertet werden.

3.2.7.1 *Beschichten der Mikrotiterplatte*

Es wurden 96well-Flachbodenmikrotiterplatten („Nunc-Immuno™ Plate, MaxiSorb™ Surface“) verwendet. In jedes benötigte well wurden 200 μ l einer 1:250-Verdünnung des Fang-Antikörpers pipettiert. Dies entsprach einer Konzentration von 80ng/ well. Die Platte wurde abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimal mit ELISA-Waschpuffer (0,05% Tween-20 in PBS, pH 7,4) gewaschen bevor durch Zugabe von 350 μ l Blockingreagenz (1% BSA, 5% Sucrose, 0,05% NaN₃ in PBS) pro well und Inkubation bei 4°C über Nacht unspezifische Bindungen blockiert wurden.

3.2.7.2 *Durchführung des ELISAs*

Es wurde jedesmal eine Standardreihe mitgemessen. Dafür wurde rekombinantes humanes VEGF zu 125, 250, 500 und 1000pg/ml in dem Medium/ Puffer verdünnt, in dem sich auch die Proben befanden, um eine optimale Vergleichbarkeit der Messwerte zu erreichen. Als Proben waren hier immer Zellüberstände stimulierter U343- oder U118-Zellen. Die Standardreihe wurde daher in Stimulationsmedium erstellt.

Die Mikrotiterplatte wurde von dem Blockingreagenz befreit und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Dann wurden je dreimal 200µl der Proben und der Standards in die Vertiefungen pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte eine 24stündige Inkubation mit je 200µl des biotinylierten Detektionsantikörper bei 4°C. Es wurde dann wieder dreimal gewaschen und anschließend 200µl Streptavidinperoxidase in jedes Well gegeben. Man ließ nun 20 min bei Raumtemperatur inkubieren und wusch erneut dreimal. Dann wurden in jedes well 100µl Tetramethylbenzidin-Substrat gegeben und so lange inkubiert, bis eine deutliche Farbreaktion auftrat (5-15 min), welche dann mit je 50µl Stop-Lösung (0,5M H₂SO₄) abgebrochen wurde. Die Extinktion der nun gelb gefärbten Proben wurde bei 450 nm (550nm Referenz) in einem Spektrophotometer gemessen. Durch Extrapolation auf die durch die Standardreihe ermittelte Eichgerade, konnte die in den Proben enthaltene Menge an VEGF berechnet werden.

3.2.8 Der Chemotaxis-Assay

Zur Überprüfung des Einflusses von VEGF auf die Migration der Mikrogliazellen wurde ein Chemotaxis-Assay in einer Kammer nach Boyden durchgeführt.

In diese Kammer wird eine Polycarbonatmembran bestimmter Porengröße eingespannt, sodass die Kammer in zwei Kompartimente unterteilt wird. In das untere Kompartiment wird der Stimulus gefüllt, während in das obere Kompartiment die Zellsuspension gegeben wird. Die Zellen migrieren entlang des zwischen den Kompartimenten entstehenden Stimulusgradienten durch die Poren der Membran und bleiben dort haften. Je nach Zellart kann die Membran zur Optimierung dieser Anhaftung mit z. B. Poly-D-Lysin (PDL) beschichtet werden.

Die verwendete Kammer war eine 48 well „Micro Chemotaxis Chamber“ der Firma Neuro Probe.

3.2.8.1 *Durchführung des Experiments*

Die Polycarbonatfilter (5µm Porengröße, PVP-frei; Neuro Probe, Inc.) mussten zunächst vorbehandelt werden. Sie wurden in der „clean bench“ für 20min in Eisessig inkubiert, mehrmals mit Aqua dest. gespült und an der Luft getrocknet.

Das VEGF, das als Stimulus diente, wurde in Stimulationsmedium (DMEM mit 0,5% FKS) verdünnt bis zu einer Endkonzentration von 10ng/ml und dann in die Vertiefungen des unteren Teiles der Kammer gegeben. Dabei wurden immer genau 28,5µl VEGF-Lösung bzw. Kontrolle (reines Stimulationsmedium) in jeweils sechs wells pipettiert. Es musste darauf geachtet werden, dass die Lösung blasenfrei eingefüllt wurde und ein kleiner Konus auf der Flüssigkeit stand. Dann wurde dieser untere Teil mit einem entsprechend großen Stück der Polycarbonatmembran bedeckt, die Dichtung daraufgelegt, und der obere Teil der Kammer aufgesetzt und festgeschraubt. Die Kammer wurde nun so in den Brutschrank verbracht, um bei 37°C für ca. 30min zu equilibrieren.

Währenddessen wurden die BV-2-Mikroglia nach dem in Abschnitt 3.2.1.2 beschriebenen Verfahren abtrypsinisiert und gezählt. Eine ausreichende Menge an Zellen wurde bei Raumtemperatur und 800 x g für 5min abzentrifugiert und in soviel Stimulationsmedium aufgenommen, dass eine Suspension von 500.000 Zellen pro ml Medium entstand. Davon wurden dann jeweils 50µl in eine Vertiefung des oberen Kompartiments der Boydenkammer gegeben. Die Kammer wurde in einer Petrischale in den Brutschrank gegeben und über Nacht inkubiert.

3.2.8.2 Detektion und Quantifizierung der gewanderten Zellen

Nach Beendigung des Migrationsassays wurde die Kammer zunächst auf den Kopfgestellt, um die überschüssige Zellsuspension zu entfernen. Dann wurde sie vorsichtig aufgeschraubt und der untere Teil abgenommen. Die Membran wurde vorsichtig entfernt. Auf deren Unterseite, also der den Stimuli zugewandten Seite, sollten die gewanderten Zellen angehaftet sein. Die obere Seite wurde vorsichtig an einem Spezialgerät abgestrichen, um nicht gewanderte Zellen zu entfernen. Sie wurde dann auf dieser Seite mit PBS gespült, erneut abgestrichen und wieder gespült. Dieses wurde noch ein weiteres Mal wiederholt, bevor die migrierten Zellen an der Membran fixiert wurden. Dazu wurde die Membran für 15 min in 100% Methanol inkubiert. Anschließend wurde sie gründlich in Aqua dest. gespült und in Hämalaunlösung (MAYER Hämalaunlösung, Merck) gegeben. Darin verblieb die Membran für 30 min, wurde dann zunächst in Aqua dest. und schließlich mit Leitungswasser gespült, um die Zellkerne der anhaftenden Zellen zu detektieren. Die Membran wurde auf einen Objektträger gelegt, und

mit einem Deckglas bedeckt, das mit Hilfe von „Kaisers Glyceringelatine“ (Merck) fixiert wurde.

Mikroskopisch konnte nun die Dichte der gewanderten Zellen verglichen werden. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe der „pcbas“ Software des Biochemischen Institutes der CAU.

3.2.9 RNA-Isolierung

Will man untersuchen, ob bestimmte Gene in einer Zelle oder einem Gewebe exprimiert werden, bedient man sich meist der zellulären mRNA als Matrize, entweder um sie in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben und in einer PCR zu untersuchen oder z. B. um sie - an eine Membran fixiert - in eine Hybridisierungs Reaktion wie den Northern Blot einzusetzen. Erhält man hierbei ein positives Signal, also z. B. ein Amplifikat in der PCR, so kann man darauf schließen, dass in dem zugrunde liegendem System (Zellart) das gesuchte Protein exprimiert wird. Bei negativem Befund, kann man die Expression in jedem Fall ausschließen.

3.2.9.1 *Isolierung von RNA aus Zellen*

Es wurde sowohl die Gesamt-RNA-Population von kultivierten Zelllinien, von kultivierten Primärtumoren, sowie von frischem Gewebe isoliert. Je nach dem, wie umfangreich die Probenmenge, bzw. wie gering die Menge des zu Verfügung stehenden Materials ist, wurden verschiedene Methoden zur Isolierung der RNA angewendet.

Bei der Präparation und auch bei der Weiterverarbeitung von RNA musste dringend darauf geachtet werden, dass alle Materialien, Lösungen und Puffer RNase-frei waren. Deshalb wurden sie, soweit wie möglich, einer Diethylpyrocarbonat-Behandlung unterzogen (Sambrook et al., 1989), und ausschließlich sterile Plastik-Einmal-Materialien verwendet.

3.2.9.1.1 *Durchführung der RNA-Isolation mit der „Single-Step“- Methode*

Die „Single-Step“-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987) bedient sich –wie die meisten RNA-Isolierungs- Methoden- 4M Guanidinium thiocyanat-Lösung zum

Homogenisieren der Zellen (Chirgwin et al., 1979; Cox, 1968). Guanidinium thiocyanat ist eines der effektivsten bekannten Protein-Denaturierungsmittel. Lysiert man Zellen damit, werden sofort alle Proteine denaturiert, so auch die endogenen Ribonukleasen, was eine Isolierung der RNA erst ermöglicht. Durch Zugabe von β -Mercaptoethanol zum Lysispuffer werden gleichzeitig Disulfidbrücken aufgebrochen, wodurch eine noch effektivere Lyse ermöglicht wird. Die Single-step Methode, die in dieser Arbeit angewendet wurde, basiert darauf, dass RNA die Eigenschaft hat, bei saurem pH (pH4) und in Gegenwart von Phenol/Chloroform noch in der wässrigen Guanidinium-Phase löslich zu sein. Unter diesen Bedingungen sind die meisten Proteine und kleinere DNA-Fragmente (50 – 10.000 bp) in der organischen Phase gelöst, größere Fragmente und einige Proteine befinden sich in der Interphase. Die Single-step-Methode hat sich vor allem dann bewährt, wenn man eine Vielzahl von Proben gleichzeitig isolieren muss, denn die Präparation dauert zum einen nur wenige Stunden und zum anderen kann sie in kleinen Reaktionsgefäßen (1,5 ml) durchgeführt werden. Dadurch können die Zentrifugationsschritte in kleineren Rotoren vorgenommen werden, und es ist eine gleichzeitige Aufarbeitung von bis zu 30 Proben möglich. Bei der klassischen Guanidinium-Methode mit CsCl- Dichtegradienten-Zentrifugation hingegen (Glisin et al., 1974) kann wegen der Beschaffenheit der benötigten Ultrazentrifuge maximal sechs Proben gleichzeitig verarbeiten.

Vor der Lyse wurden die Zellen, die sämtlich adhärent in Zellkulturflaschen wuchsen, vom Medium, bzw. Stimulationsmedium befreit und einmal mit PBS gespült. Nun wurde der zimmerwarme Lysispuffer direkt auf den –meist konfluenten- Zellrasen gegeben. Die Menge des Lysispuffer richtete sich nach der (geschätzten) Zellzahl (siehe Tabelle 5, S. 25), es wurde 1ml Lysispuffer pro 1×10^7 Zellen verwendet. Deutlich sichtbar lysierten die Zellen sofort und konnten mit einem sterilen Zellkratzer abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt werden. Dabei wurde durch wiederholtes (7-10 mal) Aufziehen in die Pipettenspitze das Lysat homogenisiert. Durch dieses Homogenisieren sollte eine bessere Durchdringung des Lysispuffers und eine weitgehende Fragmentierung der genomischen DNA erreicht werden, damit diese sich bei der späteren Aufarbeitung in der organischen Phase ansammeln konnten. Das Homogenat wurde in Aliquots zu je 500µl auf 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße verteilt. Man gab nun 50µl 2M Natriumacetatlösung (pH 4) hinzu und mischte kräftig durch Schütteln des Gefäßes. Danach gab man 500µl wasser-

gesättigtes Phenol (kein gepuffertes!) hinzu, schüttelte wieder kräftig und fügte schließlich noch 100µl Chloroform/ Isoamylalkohol(49:1) hinzu. Das Ganze wurde gründlich mit dem Vortex-Mixer gemischt und 15min auf Eis inkubiert. Danach wurde durch Zentrifugation für 20min bei 4°C und 10.000 x g die Phasentrennung erreicht. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500ml (1 vol) 100% Isopropanols, mischen und Inkubation für mindestens 30 min bei –20°C wurde nun die RNA ausgefällt. Dieser Inkubationsschritt konnte beliebig ausgedehnt werden. Danach wurde durch Zentrifugation bei 4°C und 10.000 x g für 10 min die RNA pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und verworfen, und das Pellet wurde in 500µl 75% Ethanol resuspendiert (Vortex-Mixer). Durch anschließende Inkubation für 10-15 min bei Raumtemperatur sollten kontaminierende Reste von Guanidinium Thiocyanat herausgewaschen werden. Durch erneute Zentrifugation (5 min, 4°C, 10.000 x g) wurde die RNA pelletiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet für ca. 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde die RNA in 50-100µl –je nach zu erwartender Ausbeute- resuspendiert und, da RNA schwer löslich ist, noch ca. 1h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nun konnte die RNA in eine photometrische Konzentrationsbestimmung und/ oder eine elektrophoretische Qualitätsüberprüfung eingesetzt werden. Die wässrigen Lösungen von RNA sind nicht sehr stabil und wurden bei Gebrauch möglichst immer auf Eis belassen und verarbeitet. Durch Lagerung bei –80°C konnte sie einige Monate konserviert werden.

3.2.9.1.2 Isolierung mit Hilfe des „RNeasy“-RNA-Isolierungskits

Während sich Zellen aus Zelllinien sehr häufig teilen, und somit in beinahe unendlicher Anzahl anzuzüchten waren, standen Zellen, die aus Gewebe kultiviert wurden, nicht in beliebiger Menge zur Verfügung. Die Gliomazellen aus Tumorgewebe wuchsen sehr viel langsamer als die der Zelllinien. Außerdem waren sie deutlich größer, sodass eine konfluente Kultur sehr viel weniger Zellen und damit weniger RNA enthielt. Zusätzlich waren diese Kulturen nicht beliebig oft subkultivierbar. Je höher die Subkultur war, desto langsamer wuchsen die Zellen. Ab einem bestimmten „Alter“ schließlich mussten die Kulturen aufgegeben werden. Bei der Kultur von Endothelzellen war dasselbe Phänomen zu beobachten, nach nur 5-6 Subkulturen, war die Zellteilungsaktivität nahezu eingeschlafen. Bei der Kultur von Ratten-Mikroglia-Zellen war es zum einen sehr Zeit- und Arbeitsaufwendig, eine reine Mikrogliakultur anzuzüchten, zum anderen war eine hohe

Anzahl postnataler Rattengehirne nötig, um eine einzige konfluente Kultur anzuzüchten. Durch diese Parameter wurden die Gewebekultur-Zellen sehr wertvoll, und man musste sehr sorgfältig, sparsam und effektiv damit arbeiten. Da sich erfahrungsgemäß durch Verwendung von RNA-Isolierungskits höhere Ausbeuten erzielen lassen, wurde in diesen Fällen bei der Isolierung von RNA auf so ein Kit zurückgegriffen. Verwendet wurde das „RNeasy“-Kit der Firma Qiagen.

Die Zellen wurden entsprechend ihrer Anzahl gemäß den Angaben des Herstellers in der entsprechenden Menge des Lysispuffers lysiert. Das Lysat wurde durch mehrmaliges aufziehen mit der Pipettenspitze homogenisiert. und mit dem gleichen Volumen 70% Ethanol versetzt, um die Bindungseigenschaften der RNA zu erhöhen. Das Gemisch wurde in ein Mikroreaktionsgefäß mit einer Silikagelmembran gegeben und anschließend bei 8000 x g (10000 rpm, Mikrozentrifuge) zentrifugiert. Obwohl die Silikagelmembran so beschaffen ist, dass die DNA nicht binden kann, wurde jetzt ein zusätzlicher DNA-Verdau-Schritt mit DNase I dazwischengeschoben (15 min RT). In den folgenden Schritten wurde mit verschiedenen Puffern die RNA von Verunreinigungen freigeschrieben, indem der Puffer auf die RNA bindende Membran pipettiert wurde, um anschließend abzentrifugiert zu werden. Die RNA wurde abschließend mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Bei –70°C konnte die RNA für mehrere Wochen gelagert werden.

3.2.9.2 Isolierung von RNA aus Gewebe

Als Positiv-Kontrollen für einige PCR-Reaktionen wurde in dieser Arbeit RNA aus bestimmten Geweben isoliert. Gute Positivkontrollen für die VEGF-Rezeptoren sind Endothelzellen. Humane Endothelzellen sind durch Präparation aus Nabelschnüren relativ gut zugänglich und wurden als Positivkontrolle bei den PCRs mit humanem Material eingesetzt. Sie wurde mir freundlicherweise von Dr. Karen Mähns, Biochemisches Institut der CAU überlassen. Bei Ratten- oder Maus-Zellen standen solche reinen Zellen nicht zur Verfügung. Auch Nabelschnüre sind nicht zugänglich, da die Tiere sie kurz nach der Geburt auffressen. Deshalb wurde in diesen Fällen RNA aus Lungengewebe neugeborener Tiere (2-5 Tage alt) isoliert, denn es ist sehr stark vaskularisiert und damit endothelzellreich.

Die Organe (5-10 Stück) wurden frisch getöteten Tieren entnommen, gewogen und in sterilen Gefäßen kurz auf Eis gelagert bis sie weiterverarbeitet wurden. Das Gewebe wurde grob mit einem sterilen Skalpell zerkleinert, und dann pro 100mg 1ml RNA-Lysispuffer (4M Guanidiniumthiocyanat (GTC) + β -Mercaptoethanol, siehe Abschnitt 3.2.10.1.1) hinzugegeben. Nun wurde das Gewebe mit Hilfe eines automatischen Zerkleinerers (Polytron[®], Kinematica AG) homogenisiert. Dabei musste das Homogenat mehrfach auf Eis abgekühlt werden. Es wurde dann für 5 min bei 4°C und 300 x g zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene Gewebestückchen abzutrennen. Es wurden nun 2-4 Aliquots à 500 μ l in 1,5ml-Eppendorf-Caps abgefüllt und eine RNA-Präparation nach der Single-Step-Methode (Abschnitt 3.2.10.1.1) durchgeführt. Das restliche Homogenat konnte bei -20°C gelagert und für spätere RNA-Präparationen benutzt werden.

3.2.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Die jeweilige Ausbeute an RNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde am Photometer von einer 100-fachen Verdünnung der RNA-Lösung in Aqua bidest. ein Absorptionsspektrum zwischen 240 und 300 nm aufgenommen. Das Absorptionsmaximum sollte bei 260 nm liegen, das Verhältnis A_{260} zu A_{280} (Proteine) möglichst nahe bei 2 sein und sollte 1,7 nicht unterschreiten (DELIDOW et al., 1993). Eine Absorption von 1 entsprach einer RNA-Konzentration von 40 μ g / ml (SAMBROOK et al., 1989). Aus dem maximalem Absorptionswert des Spektrums ließ sich mit dieser Angabe die Konzentration der RNA berechnen.

3.2.11 RNA-Elektrophorese

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA kann anhand einer horizontalen Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft werden. Dabei werden die RNA-Moleküle der Größe nach aufgetrennt und durch Inkubation mit Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht. mRNA-Banden kann man dabei –wenn überhaupt- nur als durchgehenden „Schmierfilm“ im Größenbereich unterhalb 2000bp erkennen. Deutlich sichtbar jedoch sind die Banden der 28 S bzw. 18 S rRNA bei 5,0 bzw. 1,9 kb. Wären diese Banden nicht zu sehen, oder wären sie nur sehr schwach oder im falschen Verhältnis (normalerweise ist die 28S-

Bande doppelt so stark wie die 18S-Bande), so müsste man davon ausgehen, dass die RNA durch RNasen in kleine Fragmente abgebaut worden war. Damit ist sie von mRNA-Molekülen dann nicht mehr zu unterscheiden und ordnet sich in den mRNA-Schmier ein.

Da die Sekundärstruktur der RNA einen Einfluss auf ihr gleichmäßiges Wanderungsverhalten im Gel hätte, musste die RNA vor Auftragen auf das Gel denaturiert werden. Dies geschah durch Zugabe des RNA-Probenpuffers, der Formaldehyd als Denaturierungsmittel enthält und fünfminütiges Erhitzen auf 65°C. Zusätzlich enthielt das Agarose-Gel Formamid, um die Denaturierung während des Laufes aufrecht zu erhalten. Für ein 1%iges Agarose-Gel wurde 1g Agarose (RNase-frei) in 75ml DEPC-behandeltem Aqua dest. suspendiert und durch Aufkochen im Mikrowellengerät gelöst. Nach ca. 10minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurden noch 20ml 5x running buffer, 5 ml Formamid und 5µl Ethidiumbromidlösung hinzugefügt und gut gemischt. Das Gel wurde in eine Gelwanne gegossen, die zuvor durch Inkubation mit NaOH und gründliches Spülen mit sterilem Wasser von RNasen befreit worden war. Durch einen Kamm blieben Taschen zum Auftragen der Proben ausgespart. Nach ca. 30 min war das Gel erstarrt. Die RNase-freie Elektrophoresekammer wurde mit 1x-„running-buffer“ gefüllt und das Gel hineingelegt. Der Kamm wurde entfernt und die Geltaschen mit Puffer gespült. Je 10µg der Gesamt-RNA-Proben wurden im Volumenverhältnis von 5:1 mit RNA-Probenpuffer (5 x) vermischt, 10 min bei 65°C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Nach Abkühlung wurden die Proben durch kurze Zentrifugation gesammelt und wieder auf Eis gelagert. Die RNA-Proben wurden in die Gel-Taschen pipettiert und der Gellauf durch Anlegen einer Spannung von 100V gestartet. Es dauerte etwa eine Stunde bis die beiden in dem Probenpuffer enthaltenen Marker Bromphenolblau und Xylencyanol sich deutlich getrennt hatten und der untere Marker (Bromphenolblau) sich im unteren Drittel des Geles befand. Dann wurde die Elektrophorese beendet. Das in dem Gel enthaltene Ethidiumbromid lagerte sich während des Laufes in die RNA-Moleküle ein, so dass diese nach Ende der Elektrophorese auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert werden konnten.

3.2.12 Reverse Transkription (RT)

Um zu überprüfen, ob eine bestimmte genetische Information innerhalb einer Zelle zunächst in eine mRNA-Sequenz und somit auch in den meisten Fällen in eine Proteinsequenz umgeschrieben wird, bedient man sich der Reversen-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Hier bei wird im ersten Schritt, der RT-Reaktion, eine RNA-Sequenz in eine einzelsträngige cDNA (complementary, oder copy DNA) umgeschrieben (KAWASAKI, 1989), die in der darauf folgenden PCR als Matrize für die Synthese komplementärer DNA-Sequenzen dienen kann. Bei der RT-Reaktion dienen p(dT) –Oligomere, die mit den poly-A-Enden der mRNA-Sequenzen hybridisieren, als Startpunkt für die Reverse Transkriptase.

Alle RT-Reaktionen wurden nach dem gleichen Prinzip durchgeführt.

Zunächst wurden ca. 200ng gemäß obenstehender Vorschriften isolierter Gesamt-RNA zusammen mit 1 µl Oligo-dT-Primer (100ng/µl) in ein Eppendorf-Cap gegeben und mit RNase-freiem Aqua bidest. auf 12µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 8 min auf 65°C erhitzt und anschließend schnell auf Eis abgekühlt. Auf Eis stehend wurden dann 4µl RT-Puffer (5x), 2µl DTT (0,1 M), 1µl dNTP-Lösung (10mM) und 0,8µl (100u) MMLV-Reverse Transkriptase hinzupipettiert. Die Reaktion wurde bei 37°C für eine Stunde durchgeführt. Darauf folgte ein Denaturierungsschritt, bei dem durch Erhitzen auf 75°C für 15 min die Reverse Transkriptase inaktiviert wurde. Die so entstandene cDNA konnte nun entweder eingefroren oder in einer PCR eingesetzt werden.

3.2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine häufig eingesetzte Methode für die enzymatische Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Das Prinzip besteht darin, dass ein darin eingesetztes sequenzspezifische Primerpaar einen bestimmten cDNA oder DNA-Abschnitt erkennt, mit diesem hybridisiert („Annealing“) und somit als Startpunkt für eine DNA-Polymerase dient. Diese wird nun unter Verwendung von Desoxynukleotiden einen zu der cDNA oder DNA komplementären Strang bilden („Elongation“). Durch mehrmalige Wiederholung dieses Vorganges wird der spezifische DNA-Abschnitt exponentiell vermehrt und kann als PCR-Fragment mit distinkter Lage, z.B. durch Agarose-Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht werden.

Neben der DNA-Matrize muss der gepufferte Reaktionsansatz vier Desoxynukleotide, zwei spezifische Primer und die *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) enthalten. (MULLIS & FALLONA, 1987; SAIKI et al., 1988).

	Amplifikat	Denaturierung	Annealing	Elongation	$\mu\text{l MgCl}_2$ (25mM)
hVEGFsplice	730bp 658bp 526bp	94°C; 30 s	55°C; 45 s	72°C; 60 s	5
hVEGF	255bp	94°C; 30 s	55°C; 30 s	72°C; 60 s	5
hVEGFR-1	316bp	94°C; 30 s	62°C; 60 s	72°C; 60 s	5
hVEGFR-2	555bp	94°C; 30 s	60°C; 60 s	72°C; 60 s	5
hGAP DH	983 bp	94°C; 30 s	55°C; 60 s	72°C; 90 s	5
h β -Actin	850bp	94°C; 30 s	60°C; 60 s	72°C; 60 sk	5
mVEGFR-1	423bp	94°C; 30 s	60°C; 60 s	72°C; 60 s	5
mVEGFR-2	339bp	94°C; 30 s	60°C; 60 s	72°C; 60 s	5
m β -Actin	514bp	94°C; 30 s	60°C; 60 s	72°C; 60 s	5
rVEGFR-1	240bp	94°C; 30 s	58°C; 60 s	72°C; 60 s	5
rVEGFR-2	537bp	94°C; 30 s	58°C; 60 s	72°C; 60 s	5
r β -Actin	402bp	94°C; 30 s	58°C; 60 s	72°C; 60 s	5

Tabelle 10: Bedingungen der durchgeführten RT-PCRs.

3.2.14 DNA-Gelelektrophorese

Nach erfolgter PCR musste überprüft werden, ob wirklich die spezifischen Fragmente mit korrekter Basenlänge -und nur die- entstanden waren. Dazu bedient man sich neben chromatographischen vor allem elektrophoretischen Methoden. Genau wie RNA lässt sich auch die DNA aufgrund ihrer negativen Nettoladung durch Wanderung im elektrischen Feld der Größe nach auftrennen. Anhand eines DNA-Längenstandards kann dann kontrolliert werden, ob das PCR-Fragment die erwartete Größe besitzt. Agarose-Gel-Elektrophoresen eignen sich besonders gut für die Auftrennung von Fragmenten zwischen 200bp und 3000bp Größe. Für kleinere Fragmente entscheidet man sich besser für eine Acrylamid-Gel-Elektrophorese, denn mit ihr können Fragmente zwischen 30 und 500bp optimal getrennt werden.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Agarose-Gel-Elektrophoresen durchgeführt.

Zur Herstellung des Agarosegels wurde zunächst 2g Agarose in 100ml TAE-Puffer (1x) in der Mikrowelle vorsichtig aufgekocht und auf ca. 50 °C abgekühlt. Die Lösung wurde dann in eine Form gegossen, wobei durch einen Kamm Taschen zum Auftragen der Proben ausgespart blieben. War das Gel erstarrt wurde es nach Entfernung des Kammes samt Wanne in eine Elektrophoresekammer gelegt, die mit 1xTAE-Puffer gefüllt war. Je 5-15µl der PCR-Ansätze wurde mit entsprechender Menge 5x-DNA-Probenpuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde in eine Tasche ein Gemisch aus Probenpuffer und Längenstandard (100bp-Marker, Gibco) pipettiert. Die Trennung erfolgte bei 100V für 30-60min. Das Gel wurde anschließend für 15-30min in eine Färbelösung gelegt, die aus 0,01% Ethidiumbromid-Lösung in Aqua dest. bestand. Das Ethidiumbromid baute sich in die DNA-Fragmente ein, die so bei 254 nm im UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden konnten.

3.2.15 Isolierung und und Aufreinigung einzelner PCR-Fragmente

Man bedient sich der PCR nicht nur, um einen qualitativen Nachweis über die Transkription spezifischer Gene zu führen, sondern auch, um bestimmte DNA-Fragmente zu vermehren, die man in einer späteren Reaktion einsetzen will. Als Beispiel sind Hybridisierungsexperimente wie z. B. die Southern- oder Northern-Blot-Methode zu nennen, in denen solche spezifischen Genfragmente mit einem Detektions-Reagenz markiert als Sonde eingesetzt werden (siehe Abschnitt 3.2.17).

Für die Herstellung solcher Sonden mussten die PCR-Amplifikate aufgereinigt werden. Dazu kann man sie entweder direkt aus dem Reaktionsansatz aufreinigen oder die gesamte PCR-Probe auf ein Agarose-Gel auftragen, die spezifische Bande detektieren, mittels eines Skalpell ausschneiden und aus dem Gel extrahieren. Letztere Methode empfiehlt sich vor allem dann, wenn die PCR-Reaktion nicht optimal verlaufen war und man zusätzlich zu dem Produkt unspezifische Banden oder andere Unreinheiten auf dem Gel entdecken konnte. Diese unspezifischen Produkte würden bei einer Gesamtaufreinigung mit aufgereinigt und könnten das Hybridisierungsergebnis verfälschen.

3.2.15.1 Isolierung von Fragmenten aus dem PCR-Ansatz

Bei der Isolierung von PCR-Amplifikaten aus dem Reaktionsansatz wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Dabei hielt man sich genau an die Vorschrift des Herstellers.

Zu dem Reaktionsansatz (aus dem bereits 5µl für ein qualitatives Gel entnommen worden waren) wurden 225µl (5x vol) Puffer „PB“ gegeben und vermischt. Ein „spin column“ wurde in ein Reaktionsgefäß gestellt und des Gemisch aufgetragen. Durch Zentrifugation bei 10.000 x g wurde die Flüssigkeit durch das Säulenmaterial getrieben, wobei die höhermolekularen (ab 100bp) doppelsträngigen DNA-Fragmente an das Material gebunden wurden. Die DNA-Primer rauschten mit dem Lösungsmittel durch. Dieses wurde nach der Zentrifugation verworfen. Nun wurde die gebundene DNA durch Auftragen des Waschpuffers „PE“ und anschließende Zentrifugation (60 s, 10.000 x g) gewaschen. Der Waschpuffer wurde entfernt, bevor ein zweiter Zentrifugationsschritt folgte, der dazu diente, den verbleibenden Waschpuffer restlos zu entfernen. Nun wurde die Mini-Säule in ein frisches Reaktionsgefäß gestellt. Zur Eluation der DNA wurde nun 50µl Puffer „EB“ auf die Säule gegeben und erneut bei 10.000 x g für 60s zentrifugiert. Das Eluat enthielt das aufgereinigte PCR-Produkt.

3.2.15.2 Isolierung von Fragmenten aus einem Agarose-Gel

Wenn man sicherstellen möchte, dass das aufgereinigte DNA-Produkt wirklich nur das spezifische Amplifikat aus der PCR-Reaktion enthält, empfiehlt sich eine Aufreinigung aus einem Agarose-Gel. Dazu musste zunächst ein Agarose-Gel mit einer entsprechend großen Tasche hergestellt werden. Dahinein wurde dann der gesamte Reaktionsansatz plus Probenpuffer pipettiert. Man ließ nun das Gel solange laufen, bis man glaubte, eine ausreichende Abtrennung der spezifischen von eventuellen unspezifischen Banden erreicht zu haben, also 45-60 min. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und auf einem UV-Tisch angeschaut. Die deutlich fluoreszierende Bande wurde mit einem Skalpell sehr genau ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und gewogen. Die nun folgende Aufarbeitung erfolgte mit dem „Nucleotrap® extraction kit“ der Firma Macherey-Nagel. Pro 100g Agarose wurden 300µl Puffer NT1 zu dem Gelfragment gegeben. Die Suspension wurde solange vorsichtig gevortext, bis eine homogene

Mischung entstanden war. Nun wurden 10µl „Nucleotrap“-Suspension hinzugefügt und das Ganze 10 min bei 50°C inkubiert. Dabei musste die Probe alle 2-3 Minuten kurz durchmischt werden. Danach zentrifugierte man für 30s bei mindestens 10.000 x g. Das Pellet enthielt die an die „Nucleotrap“-Matrix gebundene DNA. Der Überstand wurde verworfen. In dem nun folgenden Waschschrift wurde das Pellet zweimal durch kräftiges mischen (Vortex-Mixer) in 500µl Puffer NT2 resuspendiert und durch Zentrifugation (30s, 10.000x g) erneut sedimentiert. In einem weiteren Waschschrift wurde ebenso verfahren unter Verwendung des Puffer NT3. Danach wurde das Pellet für 5-15 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50µl TE-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde gut durchmischt und 10 min inkubiert. Dann wurde durch Zentrifugieren für 30s bei 10.000 x g die Matrix sedimentiert. Der Überstand enthielt das aufgereinigte DNA-Fragment.

3.2.16 Northern Blot

Das Northern-Blotting ist ein dem Western Blotting äquivalentes Verfahren für RNA (Ursprung der Methode: „Southern Blot“ nach E.M. SOUTHERN (1975)). Hierbei wird Gesamt-RNA bzw. mRNA elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt und durch das sogenannte „blotting“ auf eine Nylonmembran übertragen, wobei die relative Position der einzelnen RNA-Moleküle bestehen bleiben. Auf der Nylonmembran wird die RNA zunächst fixiert und dann in einer Hybridisierungsreaktion eingesetzt. Dabei wird sie einem DNA-Fragment (Sonde) präsentiert, dass einem Sequenzbereich eines spezifischen nachzuweisenden Gen entspricht, und sich somit während der Hybridisierung an die komplementäre mRNA dieses Genes auf der Membran binden kann. Die Sonde ist markiert, so dass sie danach mittels eines radioaktiven oder nicht-radioaktiven Nachweises detektiert werden kann.

Mit der Northern Blot Methode kann man nicht nur das bloße Vorhandensein eines Genes in einer mRNA-Population nachweisen. Anders als mit der PCR kann man auch einen quantitativen Vergleich eines bestimmten Genes vornehmen. Wenn man gleiche Mengen RNA aufgetrennt hatte und am Ende ein unterschiedlich starkes Signal für ein bestimmtes Gen erhält, kann man darauf schließen, dass dieses Gen in den RNA-Populationen unterschiedlich stark transkribiert wurde. Auf diese Weise kann man untersuchen ob die Behandlung von Zellen mit bestimmten Faktoren Einfluss auf die Expression eines bestimmten Proteins hat.

3.2.16.1 „Blotting“ bzw. Übertragung der RNA auf eine Nylonmembran

Mit Hilfe des Northern Blots sollte untersucht werden, ob die Transkription des VEGF-Gens in U343-Gliomazellen durch Somatostatin beeinflusst werden kann. Dazu wurden die Zellen für 2, 8 und 24 h mit Somatostatin, mit EGF, mit Somatostatin und EGF und mit reinem Medium als Kontrolle stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und die RNA nach der „Single-step“-Methode (Abschnitt 3.2.9.1.1) isoliert. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden genau 10µg RNA jeder Probe entnommen, auf ein Agarose Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.2.11).

Nach einer Ethidiumbromid-Behandlung konnten auf einem UV-Transilluminator die charakteristischen rRNA-Banden erkannt, und anhand ihrer Stärke die aufgetragene Menge an RNA verglichen werden. Nun erfolgte das eigentliche Blotting. Dabei wurden durch einen konventionellen Kapillartransfer (Sambrook et al., 1989) in 20x SSC über Nacht w die aufgetrennten RNA-Moleküle auf eine Nylonmembran übertragen. Durch anschließendes Trocknen und „Backen“ der Membran bei 80°C wurde die RNA fixiert.

3.2.16.2 Markierung der Sonde

Zur Markierung der DNA-Sonde („labelling“) wurde das „Megaprime™ DNA labelling system“ der Firma Amersham verwendet.

Es wurden ca. 25ng des zu markierenden DNA-Fragmentes zusammen mit 5µl „Primer solution“ in ein Reaktionsgefäß gegeben und auf 34µl mit Aqua bidest. aufgefüllt. Zur Denaturierung der DNA wurde der Ansatz für 5min bei 95°C im Thermoblock inkubiert, danach kurz zentrifugiert. Bei Raumtemperatur wurden dann 10µl „labelling buffer“, 4µl [32 P]dCTP und 2µl Klenow-Enzym hinzupipettiert und vorsichtig vermischt. Nun wurde die Markierungsreaktion bei 37°C im Thermoblock durchgeführt und nach wenigstens 10 min (maximal 30min) durch Zugabe von 5µl 0,2M EDTA abgestoppt.

Zur Aufreinigung der markierten Sonde wurde eine sogenannte „Nick Column“ der Firma Pharmacia verwendet. Die „Column“ wurde zunächst für eine Minute bei 735 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, um die Chromatographiesäule aufzubauen und überschüssigen Puffer zu entfernen. Von dem Reaktionsansatz wurde 1µl für eine spätere Messung abgenommen und der Rest vorsichtig in die Mitte der Kieselgel-Schicht der

Nick-Column gegeben. Diese wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und erneut für 2 min bei 735 x g zentrifugiert. In dem Gefäß befand sich nun die aufgereinigte markierte Sonde. Davon wurde ebenfalls 1µl abgenommen und in ein 5ml-Szintillationsröhrchen überführt. Zusammen mit dem Mikroliter der unaufgereinigten Probe wurde die Zerfallsrate und damit die Markierungseffizienz durch Messung der Zerfälle pro Minute im Beta-Counter bestimmt. Die Einbaurrate sollte etwa 30% betragen.

3.2.16.3 Hybridisierung der Membran und Detektion der spezifischen Banden

Vor Beginn der Hybridisierungsreaktion wurde der Hybridisierungsofen auf 68°C eingestellt und die „ExpressHyb“ Hybridisierungslösung (Clontech) darin vortemperiert. Der RNA-Blot wurde dann entweder in eine Hybridisierungsröhre oder ein 50ml-Zentrifugenröhrchen –je nach Größe des Blots- gelegt, dabei musste die Seite, auf der die RNA fixiert ist, zur Innenseite der Röhre gerichtet sein. Nun wurden 10ml (5ml) Hybridisierungslösung zu dem Blot gegeben und mindestens eine Stunde im Ofen vorhybridisiert. Danach musste die Sonde denaturiert werden. Dazu wurde sie 5min bei 95°C inkubiert, danach auf Eis gestellt und kurz ,runterzentrifugiert. Dann wurde die Menge an Sonde, die 1×10^6 cpm pro ml Hyb-Mix entsprach, zügig in die heiße Hybridisierungslösung pipettiert und die Röhre zurück in den Ofen verbracht. Man ließ bei derselben Temperatur über Nacht hybridisieren. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung aus der Röhre entfernt und einmal mit Waschlösung 1 (2xSSC, 0,1% SDS) nachgespült. Dann wurde der Blot dreimal für 5min bei Raumtemperatur mit Waschlösung 1 gewaschen. Darauf folgten drei Waschgänge à 15min mit Waschlösung 2 (0,1xSSC; 0,1%SDS) bei 68°C. Die Waschlösung sollte vortemperiert sein. Danach wurde der Blot in dünne Schlaufolie gelegt, eingeschweißt und in eine Autoradiographiekassette gelegt. Durch Auflegen eines „Hyperfilm MP“ (Amersham) Autoradiographie-Filmes bei –70°C für mehrere Stunden konnten die Hybridisierungsbanden detektiert werden. Anschließend konnte die Intensität der Banden mit einem Phosphoimager quantifiziert werden.

3.2.17 Electrophoretic Mobility Gel Shift Assay (EMSA)

3.2.17.1 Die Methode

Der Electrophoretic Mobility Gel Shift Assay (EMSA) wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren nach Stimulation von Zellen nachzuweisen. Transkriptionsfaktoren stehen meist am Ende einer intrazellulären Signalkaskade. Sie bestehen aus Proteinen, die im Zellkern nach Phosphorylierung durch MAP-Kinasen aktiviert werden. Durch diese Aktivierung werden die Proteine entweder verformt, oder sie binden weitere Proteine, und bilden so die eigentlichen Transkriptionsfaktoren. Diese nun besitzen durch ihre strukturellen Eigenschaften die Fähigkeit, an DNA zu binden. Sie binden im Zellkern an spezifische Bereiche der genomischen DNA, den sogenannten Promoterregionen, und bilden damit einen Startpunkt für die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen des Zellkerns. Sie sind damit in der Lage, die Transkription von mRNA und damit die Expression eines bestimmten Genes zu regulieren.

In der EMSA-Methode werden Oligonukleotide eingesetzt, die Sequenzen bestimmter Promoterregionen haben, die für die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren spezifisch sind. Diese Oligonukleotide werden radioaktiv markiert und zusammen mit frisch isolierten Kernproteinen von stimulierten Zellen in einer Hybridisierungsreaktion als Sonde eingesetzt. Wurde der gesuchte Transkriptionsfaktor in den Zellen aktiviert, bindet er das markierte Oligonukleotid. Nach elektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches kann dann dieser Komplex durch Autoradiographie detektiert werden.

3.2.17.2 Präparation der Proteine

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ -B an stimulierten U343 und U118-Zellen untersucht.

Die Zellen wurden in 25cm² Kulturflaschen ausgesät, 1-3 Tage angezogen bis sie annähernd konfluent waren und wie in 3.2.5.2 beschrieben nach einer streng standardisierten Vorschrift für verschiedene Zeiten stimuliert. Gemäß Erfahrungswerten, waren Aktivierungen nach 1-10 Stunden zu beobachten. Deshalb wurden die Zellen jeweils für 3 und 6 Stunden stimuliert. Als Negativ-Kontrolle diente reines Stimulationsmedium, als Positiv-Kontrolle ein Cytokin, das –der Literatur nach– den zu

untersuchenden Wachstumsfaktor aktivieren sollte. Bis auf die Positiv-Kontrollen, wurden alle Ansätze doppelt durchgeführt, um eine statistisch genaueres Ergebnis zu erhalten.

Nachdem Die Zellen stimuliert waren, wurden sie schnell lysiert und die Kernproteine wie in Abschnitt 3.2.3.3 beschrieben isoliert. Sollten eingefrorene Proteine benutzt werden, so mussten diese zunächst langsam im Kühlschrank aufgetaut werden. Danach wurden sie für 10 min bei 4°C und 13 000rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden 5µl für die Proteinbestimmung abgenommen, und der Rest auf zwei neue Eppendorf-Caps verteilt, wovon eines sofort wieder bei -70°C eingefroren wurde. Nun wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (s. Abschnitt 3.2.4) durchgeführt.

3.2.17.3 Markierung der Sonde

Danach erfolgte die Markierung (Labelling) der Oligonukleotid-Sonde. Dazu wurde das „Gel Shift Assay System“ von Promega benutzt und genau nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen: In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 2µl T4-Kinase-Puffer, 14µl Aqua dest. und 2µl (10ng) Sonde („target nucleotide“) pipettiert. Dazu gab man dann noch 1µl [³²P]-ATP (10mCi/ml) und 1µl T4-Polynucleotid Kinase (10U) und inkubierte diesen Reaktionsansatz für 30 min bei 37°C. Anschließend musste das markierte Oligonukleotid von unmarkiertem sowie von nicht-eingebauter Radioaktivität abgetrennt werden. Dies geschah mittels „MicroSpin™ G-25 Columns“ der Firma Pharmacia (#17085501) gemäß Vorschrift des Herstellers.

Die Columns wurden zunächst für eine Minute bei 735 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, um die Chromatographiesäule aufzubauen und überschüssigen Puffer zu entfernen. Von dem Reaktionsansatz wurde nun zunächst 1 µl für eine spätere Messung abgenommen, und dann der Rest vorsichtig in die Mitte der Kieselgel-Schicht der MicroSpin-Column gegeben. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und erneut für 2 min bei 735 x g zentrifugiert. In dem Gefäß befand sich die aufgereinigte markierte Sonde. Davon wurde ebenfalls ein µl abgenommen und in ein Szintillationsröhrchen überführt. Zusammen mit dem µl der unaufgereinigten Probe wurde die Zerfallsrate und damit die Markierungseffizienz durch Messung der Zerfälle pro Minute im Beta-Counter bestimmt. Die Einbaurate sollte etwa 30% betragen. Für eine effiziente Hybridisierungsreaktion mit der Sonde „AP-1“ benötigte man etwa 30 000cpm bei frischer Radioaktivität. War das ³²P-ATP schon mehr als 10 Tage alt, musste man etwa das

Doppelte einsetzen. Bei Einsatz der Sonde „NF κ B“ musste man 40 000 bzw. 80 000 cpm einsetzen. Die markierten Sonden konnten bis zu einen Tag im Kühlschrank aufbewahrt werden.

3.2.17.4 Herstellung des Polyacrylamidgeles

Die Elektrophorese wurde in einer Vertikal-Elektrophorese-Kammer mit Wasserkühlung der Firma Biometra durchgeführt. In die Kammer konnten zwei Gele der Größe 10 x 12 cm, 0,75 mm dick, eingebracht werden, Die Breite der Geltaschen betrug 1cm. Als Gel wurde ein 4%iges Polyacrylamidgel mit folgender Zusammensetzung hergestellt: 1,5ml 10x TBE; 750 μ l Bisacrylamid (2%); 3ml Acrylamid (40%); 938 μ l Glycerin (80%); 23,85ml Aqua dest. ; 15 μ l TEMED; 225 μ l 10% Ammoniumpersulfat (APS). Das APS wurde frisch angesetzt oder tief gefrorenen Aliquots entnommen. Man ließ das Gel unter dem Abzug eine Stunde lang auspolymerisieren. Wenn man es erst später oder am nächsten Tag benutzen wollte, musste es danach in feuchte Zellstoff-Tücher, Frischhaltefolie und Aluminiumfolie verpackt werden, um es vor dem Austrocknen zu schützen. Danach konnte es über Nacht bei Raumtemperatur oder bei 4 °C (im Sommer) stehen bleiben. Vor Benutzung wurde das Gel in die Kammer eingebaut, die Taschen gespült und außen auf der Glasplatte markiert. Nun wurde die Kammer mit 0,5 x TBE als Laufpuffer befüllt. Das Gel musste vor Benutzung mindestens eine halbe Stunde bei 140V und Wasserkühlung vorlaufen.

3.2.17.5 Der Gel-Shift

Für jede Proteinprobe wurde ein Reaktionsgefäß vorbereitet. Da hinein kamen je 2 μ l „Gelshift binding buffer“ (5x; Promega) und 5 μ g Kernproteinextrakt (in maximal 7 μ l gelöst). Dann wurde mit Aqua dest. auf 9 μ l Volumen aufgefüllt und noch 1 μ l markierte Sonde entsprechender Aktivität (siehe 3.2.18.3) hinzupipettiert. Der Ansatz inkubierte für 30 min im Kühlschrank (während dieser Zeit wurde der Vorlauf des Polyacrylamidgeles gestartet). Nun wurden die gesamten Ansätze auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Eine zusätzliche Tasche des Geles wurde mit 5 μ l Marker (250mM Tris.HCl, pH 7,5; 0,2% Bromphenolblau; 40% Glycerin) befüllt. Dann wurde die Elektrophorese gestartet. Sie lief 1,5 h bei ca. 20°C (Wasserkühlung) bei 140V. Nach dieser Zeit war der Marker ungefähr

$\frac{3}{4}$ der Laufstrecke gelaufen. Die Elektrophoresekammer wurde abgebaut, und das Gel wurde mit Hilfe eines etwas größer zugeschnittenen Bogens Whatmanpapier von der Glasplatte abgezogen. Das Gel wurde mit Klarsichtfolie bedeckt und in eine Autoradiographiekassette gelegt. Durch das Auflegen eines Autoradiographiefilmes (Kodak) für 6-72h bei -70°C und anschließendem Entwickeln wurden die Gel-Shift-Banden detektiert. Danach konnten die Gele noch mit einem Geltrockner getrocknet und die Intensität der Banden mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fuji 1000) quantifiziert werden.

4 **Ergebnisse**

4.1 **VEGF an Gliomen**

Dass Gliome, sowie viele andere Tumorzellen, VEGF sezernieren, ist seit längerem bekannt. Dass auch die in dieser Arbeit verwendeten Glioblastomzelllinien VEGF produzieren, konnte von meiner Arbeitsgruppe bereits früher durch ELISA-Experimente bewiesen werden. Bis dahin war bekannt, dass VEGF chemotaktisch und mitogen auf Endothelzellen wirkt, um eine Kapillarisierung des Tumorgewebes zu erreichen. Um zu überprüfen, ob VEGF auch autokrin auf seine produzierenden Zellen, die Gliomazellen, wirkt, sollte zunächst ermittelt werden, welche Splicevarianten des VEGF die Zelllinien U343 und U118 und kultivierte Glioblastomazellen exprimieren. Dann sollte geprüft werden ob VEGF-Rezeptoren an den Zelloberflächen nachweisbar sind, um zu untersuchen, ob das VEGF einen autokrinen Effekt auf die Tumorzellen haben kann. Schließlich sollte eine mögliche Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden in den Gliomazellen durch VEGF nachvollzogen werden.

4.1.1 **Zellkultur**

Um untersuchen zu können, welche VEGF-Rezeptoren an Gliomazellen exprimiert sind, wurden die humanen Glioma-Zelllinien U343 und U118 und Gliomazellen aus diversen soliden Tumoren in Kultur genommen. Für die Überprüfung des Einflusses von VEGF auf die Zellen, bzw. der Funktionalität der VEGF-Rezeptoren wurden lediglich die beiden Zelllinien herangezogen.

4.1.1.1 Kultur und Subkultivierung der Zelllinien U343 und U118

Die humanen Glioblastoma-Zelllinien U343 und U118 wurden wie unter 3.2.1.1 beschrieben in DMEM-Nährmedium angezüchtet. Beide Zelllinien ließen sich unproblematisch kultivieren, insbesondere die U118-Zellen zeigten eine sehr hohe Wachstumsrate. Bei einer Ausgangszahl von 2×10^6 Zellen war eine 75cm² Zellkulturflasche nach 3-4 Tagen konfluent gewachsen, entsprechend wuchsen die U343-

Zellen ausgehend von 5 Mio innerhalb derselben Zeit konfluent. Die Zellen unterschieden sich morphologisch kaum. Beide hatten ein vielfältiges Erscheinungsbild: Es ließen sich rundliche, langgestreckte, spindelförmige, polygonale und polymorphe Strukturen differenzieren.

4.1.1.2 Kultivierung von soliden humanen Tumoren

Die Kultivierung von frischem Hirn-Tumor-Material wurde wie in 3.2.1.3 beschrieben durchgeführt. Die Glioblastome (WHO-Grad IV) ließen sich stets ohne Probleme aus dem gereinigten Operations-Material anzüchten und zeigten eine hohe Teilungsfreudigkeit (eine 25cm² Zellkulturflasche war nach 14 Tagen konfluent mit Zellen bewachsen; Ausgangszahl der Zellen je nach Materialmenge unterschiedlich). Sie überstanden mehrere Subkultivierungen ohne Probleme und konnten sogar nach Einfrieren wieder in Kultur genommen werden. Die Zellen zeigten ein polymorphes Erscheinungsbild, sie waren unterschiedlich groß und hatten häufig mehr als einen Zellkern.

4.1.1.3 Immunhistochemische Überprüfung der Reinheit der Zellen

Nach Anzucht der verschiedenen Zelltypen wurde deren Reinheit durch immunhistochemische Nachweise bestimmter zellspezifischer Markerproteine überprüft. (siehe Abschnitt 3.2.2) Dieser Schritt erwies sich besonders bei hoher Kultivierungsdauer der verschiedenen Zelltypen als unerlässlich und wurde routinemäßig bei allen neu angelegten Primärkulturen sowie in regelmäßigen Abständen während der Kultivierung der Zellen durchgeführt.

4.1.1.3.1 Nachweis von GFAP

Der Nachweis des für Gliazellen, also auch für Glioblastome spezifischen Filamentproteins „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) wurde wie unter 3.2.2.1 beschrieben durchgeführt.

In der Abb. 5 ist als Beispiel eine GFAP-positiver Kultur der U343-Zelllinie gezeigt. Bild A der Abbildung zeigt eine Übersicht (50fache Vergrößerung), Bild B eine Ausschnittsvergrößerung (160fach). Deutlich läßt sich ein durch die alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase-Reaktion entstandener gleichmäßiger roter

Farbniederschlag über die gesamte Zellausdehnung der Glioblastomzellen feststellen. Das GFAP stellte ein die ganze Zelle durchziehendes Filamentprotein dar, das mit seinen einzelnen Fibrillen –die besonders bei den einzeln liegenden Zellen deutlich zu differenzieren waren- auch in die astrozytären Zellfortsätze einstrahlte und ein filigranes Netzwerk bildete. Zusätzlich wird durch diesen Nachweis die Zellmorphologie der Astrozyten veranschaulicht.

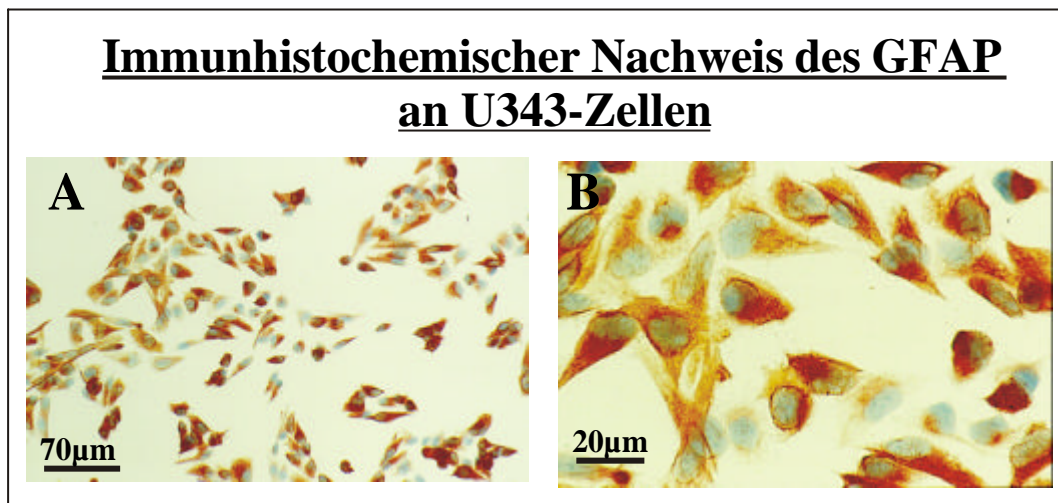


Abb. 5: Immunhistochemischer Nachweis des glialen Filamentproteins GFAP in U343-Gliomazellen. Die Zellen wurden mit Aceton fixiert und mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers und eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes detektiert. A) x50, B) x160

Dieser immunhistochemische Nachweis fiel erst ab dem dritten Tag der Kultur deutlich positiv aus. Dann erst waren 95% -100% der U343- und U118-Zellen GFAP-positiv. Es handelte sich also bei den verwendeten Zelllinien um nahezu reine gliale Zelllinien, und sie konnten somit als Modell für unsere Untersuchungen verwendet werden. Sie wurden allerdings nicht viel weiter als über die zwanzigste Subkultur hinaus eingesetzt, da mit zunehmender Kultivierungsdauer die Zellen immer weiter „entarteten“. So konnte ein stark vermehrtes Wachstum der Zellen mit steigender Subkultivierung verzeichnet werden. Außerdem verlieren sehr lange kultivierte Zellen für sie typische Eigenschaften. Die Zellen der U343 und der U118 Zelllinie verlieren so z. B. auch die Eigenschaft, GFAP zu exprimieren, wie Abb. 7 zeigt. Dieses Bild zeigt eine immunhistochemische Färbung gegen GFAP, die an einer 30. Subkultur von U118-Zellen durchgeführt wurde. Man sieht, dass weniger als 50% der Zellen eine positive Reaktion zeigten.

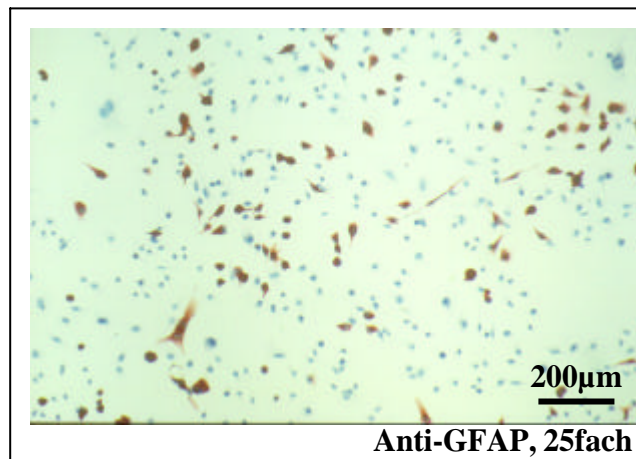


Abb.6: Immunhistochemische Färbung einer 30. Subkultur von U118-Zellen mit einem Antikörper gegen das gliale Filamentprotein GFAP. Die Zellen wurden auf beschichteten Deckgläschen angezogen, Aceton-fixiert und mit APAAP-Reaktion gefärbt.

Die GFAP-Expression der soliden Tumoren entsprach im Durchschnitt 70-90% und lag damit unter dem Wert für die Zelllinien. Trotzdem war die Anzahl der positiven Zellen hoch genug, um die Kultur für Experimente einzusetzen. Waren Kulturen zu weniger als 70% positiv, wurden sie verworfen.

4.1.2 Nachweis des VEGF an Gliomen

4.1.2.1 Immunhistochemischer Nachweis

Es ist bekannt, dass neben anderen Tumoren auch Glioblastome VEGF exprimieren (Alvarez et al., 1992, Mentlein et al., 2001). Um sicher zu gehen, dass auch die hier als Modell zu verwendenden Glioma-Zelllinien U343 und U118 VEGF exprimieren, wurden immunhistochemische Färbungen mit einem VEGF-Antikörper durchgeführt. Dies geschah gemäß der Vorschrift in Abschnitt 2.2.2.3 an direkt auf „Histobond“-Objektträger ausgesäten Zellen. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Färbungen an U343- (A) sowie an U118- (B) Zellen dargestellt. Man kann auf den Bildern eine deutliche rote Färbung im gesamten zytosolischen Bereich beider Zelllinien erkennen, hervorgerufen durch die Reaktion des AEC-Chromogens mit der Streptavidin-gekoppelten Peroxidase (HRP).

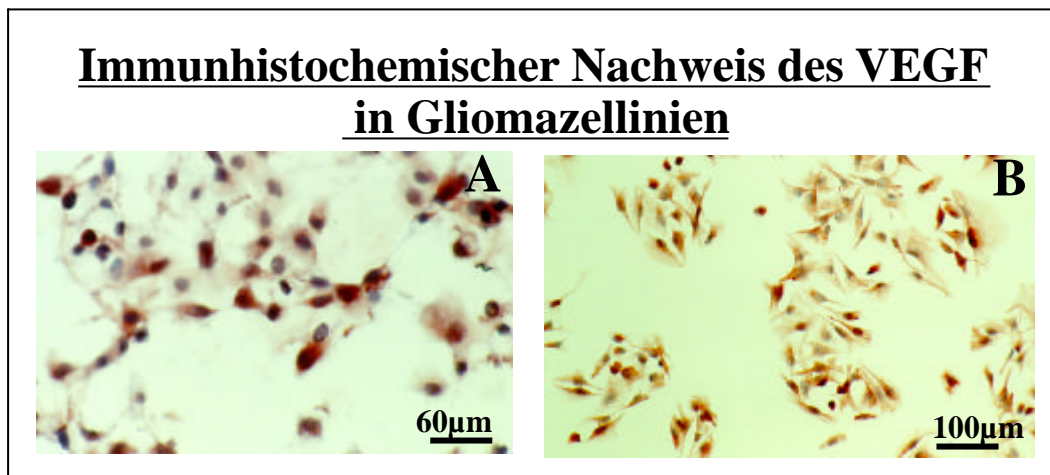


Abb. 8: Immunhistochemische Färbung gegen VEGF bei U343- (A) und U118- Zellen (B); Die Zellen wurden auf speziell beschichteten Objektträgern (Histobond) ausgesät, mit Formalin fixiert und unter Verwendung eines Streptavidin-HRP-Komplexes mit Hilfe eines AEC-Chromogens angefärbt. Vergrößerung:A: x100, B:x50

Somit konnte der Beweis erbracht werden, dass genauso wie native humane Gliome auch die von mir verwendeten Zelllinien das VEGFA-Protein exprimieren.

4.1.2.2 Detektion der exprimierten Splice-Varianten mittels RT-PCR

Nachdem sowohl durch ELISAs als auch durch immunhistochemische Färbung nachgewiesen werden konnte, dass das VEGF-A-Protein in den Gliomazellen exprimiert wird, sollte überprüft werden, welche der fünf Splicevarianten des VEGF-A gebildet wurden. Durch proteinbiochemischen Methoden konnte dies nicht ermittelt werden, da keine Antikörper bekannt waren, die zwischen den einzelnen Splicevarianten unterscheiden konnten.

Mittels RT-PCR allerdings ist es möglich, die einzelnen Spliceformen zu detektieren. Dabei werden Primer verwendet, die an Exone binden, die allen Splicevarianten gemeinsam sind. Die Primer überspannen dabei alle anderen Exone, sodass die verschiedenen Splicevarianten Amplifikate in unterschiedlicher Länge hervorbringen. Dieses Prinzip ist in Abbildung 9 erläutert.

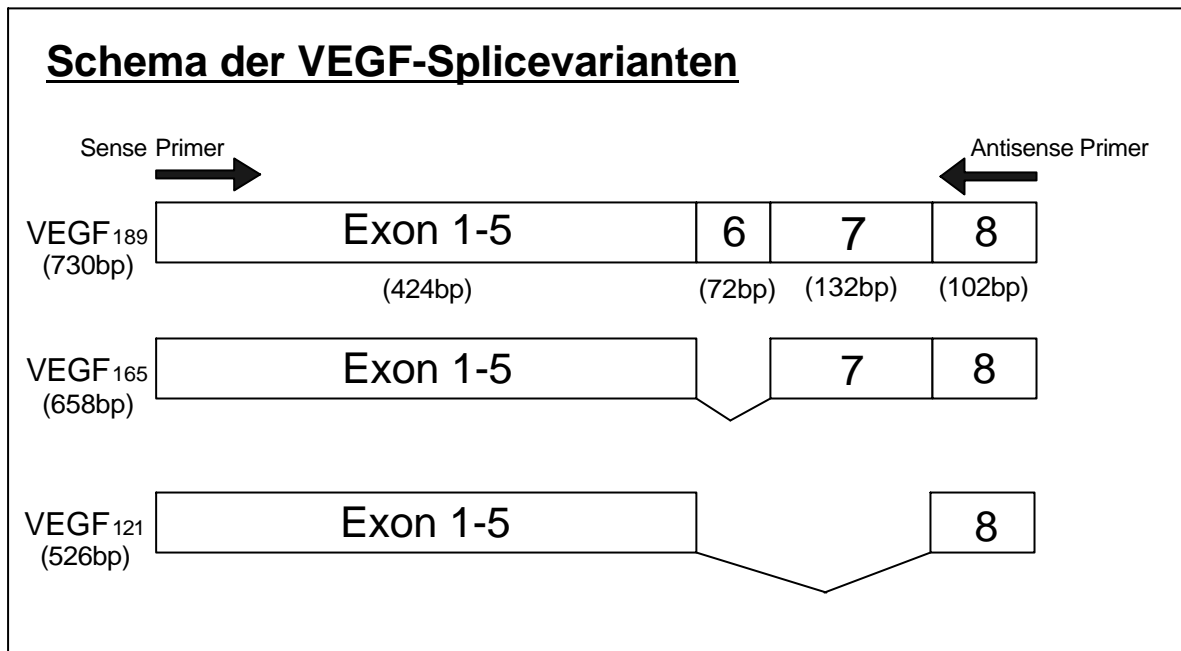


Abb. 9: Schematische Darstellung der unterschiedlichen VEGF-Splicevarianten mit Lage der Primer zur Veranschaulichung der RT-PCR und der resultierenden Produkte

Die reverse Transkription und anschließende PCR wurde wie in den Abschnitten 3.2.12 und 3.2.13 beschrieben durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR sind der Tabelle 10 entnehmbar.

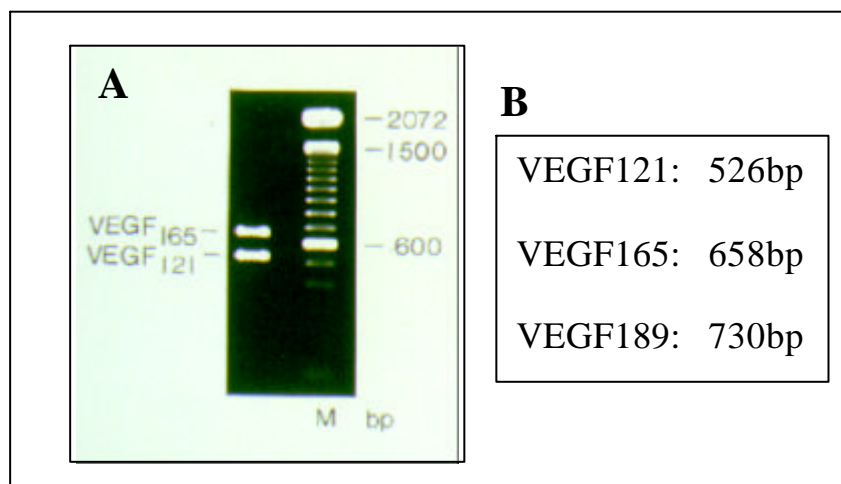


Abb.10: A) Ergebnis einer Splicevarianten-PCR mit U343-Zellen. Die beiden Banden bei 526 und 658 bp Höhe zeigen an, dass VEGF 121 und VEGF 165 exprimiert werden. B) Zusammenfassung aller in dieser PCR möglichen Amplifikate und ihre Größe

Das Ergebnis einer Splicevarianten-RT-PCR ist beispielhaft in Abbildung 10 dargestellt. Die PCR mit cDNA der Gliomazelllinie U343 ergab zwei deutliche Banden bei 526bp und

658bp Höhe. Diese Banden entsprechen den Splicevarianten VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅, denjenigen Varianten des VEGF-A mit dem höchsten angiogenetischen Potential.

Die Splicevarianten-RT-PCR wurde noch mit RNA der Zelllinie U118 und kultivierter Glioblastomen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in untenstehender Tabelle 11 zusammengefasst. Die Zellen der Linie U118 exprimieren ebenfalls die Splicevarianten VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅, ebenso wie die Zellen aller untersuchter soliden Tumoren.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass ausschließlich die frei diffusiblen Splicevarianten des VEGF in den Glioblastomen exprimiert werden.

	WHO- Grad	VEGF			VEGFR 1	VEGFR 2	β-Actin
		121	165	189			
U 343	IV	+	+	-	+	-	+
U 118	IV	+	+	-	-	+	+
A 761	IV	+	+	-	-	-	+
A 764	IV	+	+	-	+	-	+
A 767	IV	+	+	-	-	-	+
A 776	IV	+	+	-	-	+	+
A 778	IV	+	+	-	-	-	+
A 780	IV	+	+	-	-	-	+
A 789	IV	+	+	-	+	-	+
A 790	IV	+	+	-	+	-	+

Tabelle 11: Ergebnisse der RT-PCR für VEGF-Splicevarianten und VEGF-Rezeptoren bei verschiedenen soliden Gliomen und Gliomazelllinien

4.1.3 Regulierung der VEGF-Expression in Gliomazellen

Die VEGF-Genexpression kann durch vielerlei Faktoren, wie z.B. Hypoxie beeinflusst werden. MENTLEIN et al. konnten durch ELISAs zeigen, dass die Produktion des VEGF-Proteins durch Wachstumsfaktoren wie EGF oder bFGF um ein Vielfaches erhöht werden und durch gleichzeitige Gabe des inhibitorischen Neuropeptids Somatostatin wieder auf das basale Niveau gesenkt werden konnte. In dieser Arbeit sollte mit Hilfe eines Northern

Blots überprüft werden, ob diese Regulierung des VEGF bereits auf transkriptioneller Ebene zu beobachten ist.

4.1.3.1 Northern Blot

U343 Zellen wurden in 25cm² Zellkulturflaschen ausgesät und für 2, 8 und 24 Stunden mit Somatostatin, EGF, deren Kombination und Kontrollmedium stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die RNA durch Extraktion mit Phenol/ Chloroform isoliert (siehe Abschnitt 3.2.5). Die RNA wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und einem Northern Blotting gemäß Abschnitt 3.2.16 unterzogen. Als Sonde für die anschließende Hybridisierung diente ein VEGF-Fragment, das mit Hilfe der Primer „VEGF s“ und „VEGF as“ (s. Tabelle 10) durchgeführt wurde. Diese Primer binden innerhalb der Exone 1 und 5 des VEGF A, und amplifizieren so einen Bereich des Genes der bei allen Splicevarianten gleich ist (vgl. Abb. 9). Somit war gewährleistet, dass alle Splicevarianten durch eine einzige Hybridisierung angezeigt werden konnten.

Die Hybridisierung und Detektion erfolgte wie in 3.2.16.2 beschrieben. Die Abbildung 11 zeigt das Ergebnis des Northern Blots mit RNA-Proben, die nach zweistündiger Stimulation mit Somatostatin und EGF gewonnen worden waren. Die VEGF-Sonde wurde nach der Detektion wieder abgewaschen und die Membran erneut für einen Northern Blot eingesetzt. Dabei diente ein Amplifikat des „house-keeping-genes“ GAPDH als Sonde. Da die Stimulationen der Zellen keinen Einfluss auf die Expression der GAPDH gehabt haben dürfte, müsste sie in allen Zellen gleichstark exprimiert sein. Wie Abb. 11B zeigt, sind die Signale der Hybridisierung für GAPDH gleich stark, woraus man rückschließen kann, dass gleich viel RNA aufgetragen sein muss. Dagegen variieren die VEGF-Signale und zeigen die Regulation der VEGF-Expression durch EGF und SS (Abb. 11A).

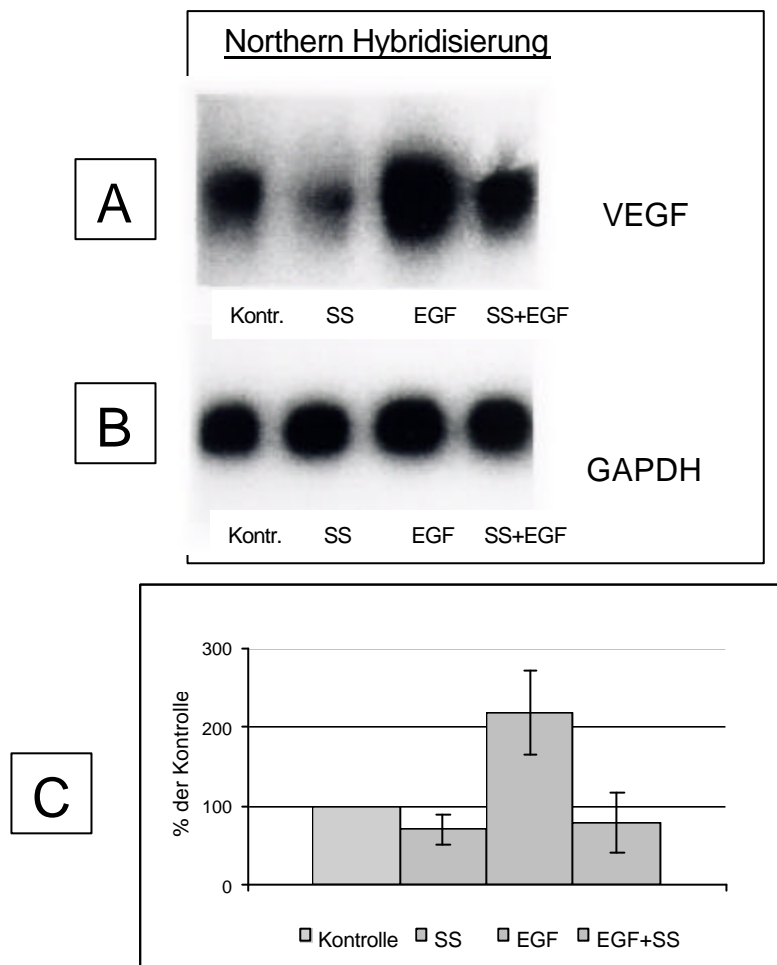


Abb. 11: Ergebnisse von Northern Blot- Experimenten zur Überprüfung der Regulation der VEGF-Sekretion. Gesamt-RNA von stimulierten U343-Zellen wurde elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit radioaktiv markierten Sonden und anschließender Autoradiographie analysiert. A) Hybridisierung mit einer VEGF-spezifischen Sonde, B) Hybridisierung desselben Blots mit einer GAPDH-Sonde nach „Stripping“; C) Densitometrische Auswertung von 4 durchgeführten Northern Blots.

Nach densitometrischer Auswertung von 4 unabhängigen Hybridisierungen (Abb. 11C) ergibt sich: EGF induziert die VEGF-Expression, Somatostatin hat einen inhibierenden Einfluss auf die VEGF-mRNA-Transkription in Gliomazellen. Auch auf die Wachstumsfaktor(hier EGF)- induzierte vermehrte VEGF-Produktion wirkt Somatostatin bereits auf transkriptioneller Ebene inhibierend ein, wie das Ergebnis der kombinierten Stimulation in Spalte bzw. Balken 4 zeigt.

4.1.4 VEGF-Rezeptoren in Gliomazellen

Vor Untersuchung eines autokrinen Effektes des VEGF auf die Tumorzellen selbst, musste überprüft werden, ob Bindungsstellen für das VEGF, also VEGF-Rezeptoren an den zu untersuchenden Zellen vorhanden sind. Dazu wurde eine RT-PCR durchgeführt, um die Transkription der mRNA nachzuweisen, um dann anschließend in einer immunhistochemischen Färbung zu zeigen, dass auch ein vollständiges Rezeptorprotein exprimiert wird.

4.1.4.1 RT-PCR

Zunächst wurde eine RT-Reaktion mit U343-, U118- und Tumor-Gesamt-RNA wie in Abschnitt 3.2.12 beschrieben durchgeführt. Danach folgte eine PCR mit spezifischen Primern für die VEGF-Rezeptoren 1 (flt-1) und -2 (KDR/ flk-1). Da U343, U118 und die soliden Tumoren ausschließlich aus humanem Gewebe stammen, wurden für die PCR die Primer „hflt-1s+as“ und „hKDRs+as“ (siehe Tabelle 10) verwendet. Als Kontrolle dienen Primer, die für das humane β -Aktin-Gen kodieren (h β Aktin s +h β Aktin as), bzw. Primer für das humane ribosomale Protein „L7“. Die Bedingungen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Abbildung 12 A zeigt das Ergebnis der PCR mit U343-cDNA. Als Positiv-Kontrolle wurde gleichzeitig die identische PCR mit cDNA von humanen Endothelzellen (HUVEC= human umbilical vein endothelial cells) durchgeführt, und wie man der Abbildung entnehmen kann, erhielt man bei Einsatz der HUVEC-cDNA jedes Mal ein Amplifikat. Es konnte hierin der VEGFR-1 (Spur1), der VEGFR-2 (Spur3) und das β -Aktin (Spur 5) nachgewiesen werden. Bei der U343-cDNA verhält es sich anders. Man erhält hier ebenfalls ein Signal für den VEGFR-1 (Spur 2) – wenn auch ein schwächeres. Der VEGFR-2 jedoch konnte nicht amplifiziert werden (Spur 4). Der in etwa gleich starken Bande für das β -Aktin (6) kann man entnehmen, dass die Mengen der eingesetzten cDNA von HUVEC- und U343-Zellen vergleichbar gewesen sind. Die sehr viel schwächere Bande für den VEGFR-1 (Spur2) lässt darauf schließen, dass dieser Rezeptor in den Gliomazellen schwächer exprimiert sein muss.

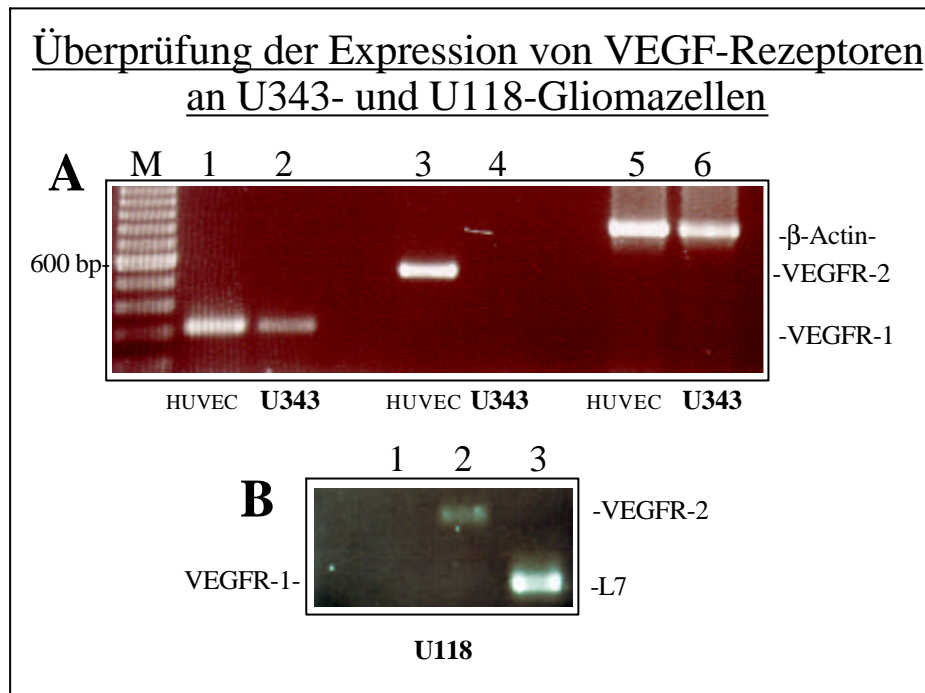


Abb. 12: RT-PCR zum Nachweis der Expression von VEGF-Rezeptoren in den Gliomazelllinien U343 und U118. Teil A der Abbildung zeigt die Amplifikate aus U343-cDNA (Spur 2,4,6) und aus Endothelzell-cDNA (Spur 1, 3, 5) mit spezifischen Primern für den VEGFR-1(316bp), den VEGFR-2 (555bp) und β -Aktin (850bp). Teil B zeigt die entsprechenden Amplifikate aus U118-cDNA, statt β -Aktin wurde hier das ribosomale Protein L7 als Positiv-Kontrolle amplifiziert.

In Abbildung 12B sieht man das Ergebnis derselben PCR mit cDNA der Gliomazelllinie U118, die Positiv-Kontrolle ist nicht dargestellt. Genau anders als bei den U343-Zellen findet man hier ein schwaches Signal bei Amplifizierung des VEGFR-2 (Spur2), jedoch keine Bande für den VEGFR-1 (Spur1). Um die Güte der cDNA zu prüfen, wurde das ribosomale Protein L7 amplifiziert (Spur3). Die unterschiedliche Stärke der beiden Banden (Spur 2 und 3) lässt wieder darauf schließen, dass der VEGFR-2 lediglich schwach exprimiert wird.

Um zu verifizieren, dass die Rezeptorexpression kein Spezifikum der Zelllinie ist, sondern auch in Gliomazellen solider Tumoren zu finden ist, wurde die RT-PCR auch mit Material mehrerer kultivierter Glioblastomazellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Auch in kultivierten Zellen solider Tumoren sind vereinzelt VEGF-Rezeptoren nachzuweisen. So exprimieren die Tumoren A764 und A789 den VEGFR-1

und Tumor A776 den VEGFR-2. Die Aktin-Kontrolle war bei allen Tumoren etwa gleich stark, das heißt, dass man von gleicher Menge eingesetzter RNA ausgehen kann (nicht gezeigt).

Dass die erhaltenen PCR-Banden ausschließlich mRNA-Fragmenten entstammen und nicht aus verunreinigender genomischer DNA amplifiziert wurden, ist dadurch gewährleistet, dass die spezifischen Rezeptorprimer Bereiche aus mehr als einem Exon des Genes amplifizieren. Sie überspannen somit mindestens ein Intron und müssten somit bei Amplifikation genomischer DNA ein sehr viel größeres Fragment als das erwartete hervorbringen.

4.1.4.2 Immunhistochemischer Nachweis der VEGF-Rezeptoren

Die immunhistochemischen Färbungen wurden wie in Abschnitt 3.2.2.4 beschrieben an auf Deckgläschen ausgesäten Zellen der Linien U343 und U118 durchgeführt. Die Abbildung 13 zeigt das Ergebnis. Man sieht durch Vergleich mit den Kontrollen (13 B und D), dass die U343-Zellen eine deutliche Reaktion auf den VEGFR-1 (flt-1) zeigen (13 A), wohingegen die U118 Zellen nur für den VEGFR-2 (KDR) immunopositiv sind. Beide Antikörper sind gegen den C-Terminus der Rezeptoren gerichtet weshalb man die Farbreaktion im inneren Bereich des Zellkörpers findet. Die Schwäche der Färbung kann zum einen darauf zurückgeführt werden, dass die Rezeptoren nur schwach auf den Zelloberflächen exprimiert sind. Zum anderen verlangt die Tatsache, dass die Antikörper gegen einen intrazellulären Bereich gerichtet sind, einen Aufschluss der Zellen, ohne deren Membran zu zerstören, damit die Antikörper an ihr Epitop gelangen können. Dies wurde in der Reaktion durch die Inkubation mit Saponin zu erreichen versucht. Es ist möglich, dass hier nur ungenügend aufgeschlossen wurde, oder bereits Teile der Zellmembran zerstört waren.

Da jedoch das Vorhandensein der Rezeptoren bereits mittels der RT-PCR nachgewiesen war (s. Abschnitt 4.1.4.1) wurde auf eine Optimierung der Methode verzichtet.

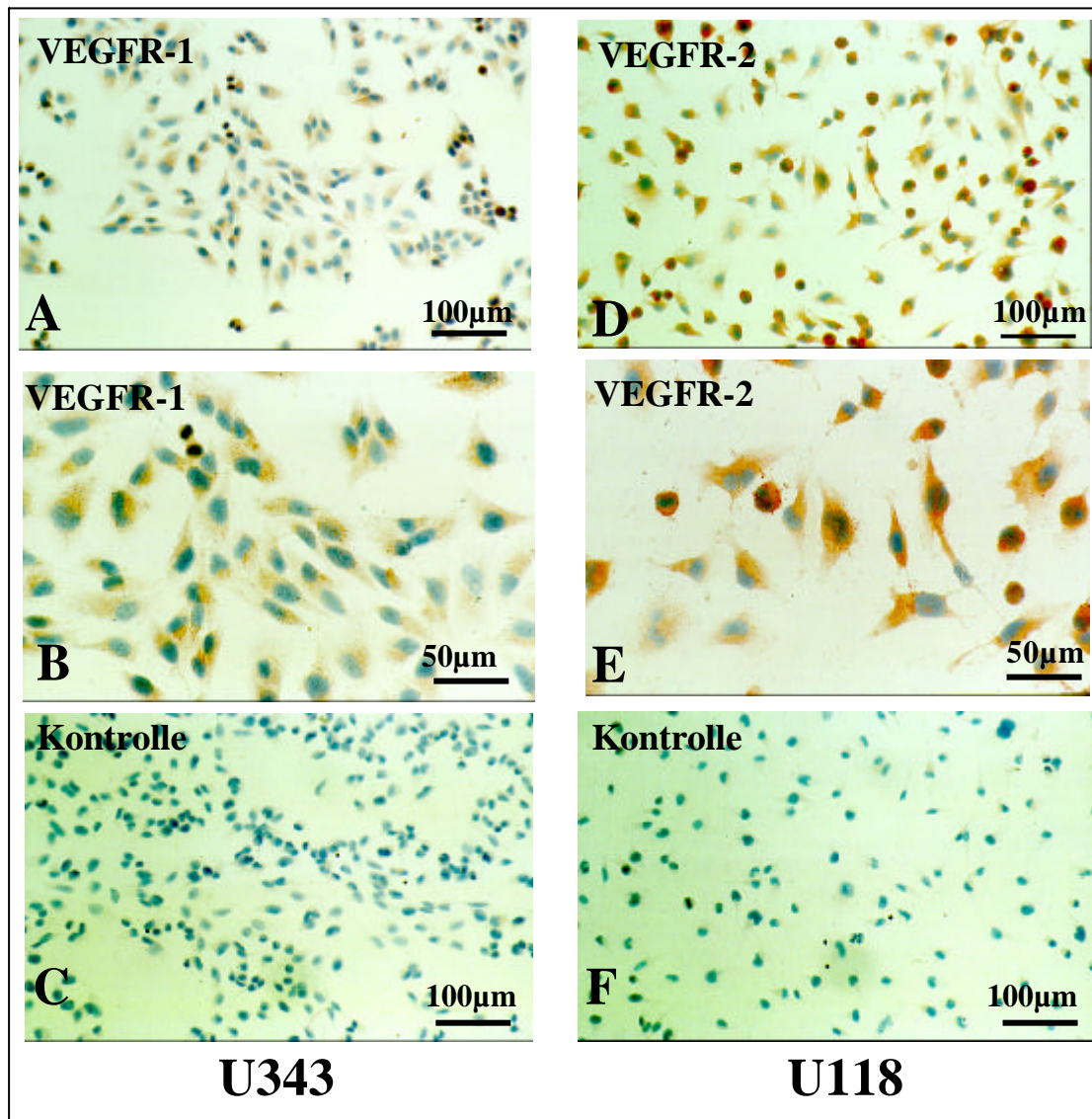


Abb. 13: Immunhistochemischer Nachweis von VEGF-Rezeptoren in Gliomazelllinien. In U343-Zellen konnte der VEGFR-1 (flt-1) nachgewiesen werden. B zeigt eine Ausschnittsvergrößerung, C die Kontrolle. In U118-Zellen wurde der VEGFR-2 (KDR) detektiert (D, E: Ausschnittsvergrößerung), die Kontrolle (F) blieb negativ. Die Zellen wurden jeweils auf beschichtete Deckgläschen ausgesät, mit Saponin „angeätzt“ und Aceton-fixiert. Die Farbreaktion erfolgte mittels Meerrettich-Peroxidase (HRP) und AEC-Chromogen. Vergrößerung: A, C, D, F x50; B, E x100

4.2 Effekte von VEGF auf Gliomazellen

In den vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, dass Gliomazellen VEGF sezernieren und selbst VEGF-Rezeptoren exprimieren können. Deshalb wurden potentielle autokrine Effekte des VEGF auf Gliomazellen untersucht.

Da VEGF über den VEGFR-2 mitogen auf Endothelzellen wirkt, sollte zunächst geprüft werden, ob die Proliferation der Gliomazellen durch VEGF beeinflusst werden kann. Weiterhin ist bekannt, dass die VEGF-Expression durch Wachstumsfaktoren und Cytokine reguliert werden kann. Deshalb sollte hier mittels eines VEGF-ELISAs überprüft werden, ob in den Gliomazellen die Applikation von VEGF zu erhöhter VEGF-Produktion führt.

Schließlich wurde untersucht, ob die Bindung des VEGF an die Rezeptoren der Gliomazellen eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst, ob man also Phosphorylierungen an intrazellulären Signalmolekülen nach Stimulation mit VEGF feststellen kann.

Neben VEGF wurden zur Stimulation Rezeptor-Subtyp-spezifische Agonisten eingesetzt. PlGF ist ein Agonist des VEGFR-1, wohingegen VEGF-D spezifisch an den VEGFR-2 bindet. Neben dem Vorteil, dass sich auf diese Weise Effekte studieren lassen, die jeweils nur über den einen der beiden Rezeptor-Subtypen ausgelöst werden, lässt sich so der Einfluss auf die VEGF-Produktion selbst in einem VEGF-ELISA messen, da die darin verwendeten Antikörper mit beiden Agonisten nicht kreuzreagieren.

Zunächst sollte überprüft werden, ob VEGF Einfluss auf das Proliferationsverhalten von U343- und U118-Zellen hat. Schließlich sollte ermittelt werden, ob die VEGF-Sekretion der Zellen durch Bindung von VEGF bzw. –Agonisten verändert werden kann. Letzteres sollte durch Untersuchung von Zellüberständen mittels eines VEGF-Sandwich-ELISAs überprüft werden. Da bei dieser Methode sämtliches im Überstand befindliches VEGF nachgewiesen wird, konnte dieses nicht zur Stimulation eingesetzt werden. Stattdessen wählte man für den jeweiligen VEGF-Rezeptor spezifische Agonisten, die nicht mit den im ELISA verwendeten Antikörpern kreuzreagierten. Für den VEGFR-1, der ja an U343-Zellen exprimiert ist, wurde humanes rekombinantes PlGF (Placenta Growth Factor) gewählt, für den an den U118-Zellen exprimierten VEGFR-2 humanes rekombinantes VEGF-D.

4.2.1.1 VEGFR-Agonisten haben keinen Einfluss auf die Zellproliferation

Wie unter 3.2.6 beschrieben, wurden die U343 und U118-Zellen in kleine Zellkulturschälchen ausgesät, für zwei Tage mit den verschiedenen Agonisten stimuliert

und anschließend durch Messung von Tritium-markiertem Thymidin die Proliferation der Zelltypen bestimmt.

Die Ergebnisse der Proliferationsversuche sind in den beiden Balkendiagrammen der Abbildung 14 dargestellt. Die ohne Stimulus in reinem DMEM gemessenen Leerwerte der Kontrollschalen wurden gleich hundert gesetzt, die übrigen Messwerte dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Balken zeigen die ermittelte Standardabweichung an, ebenfalls relativ zur Kontrolle. Die Stichprobenzahl betrug vier.

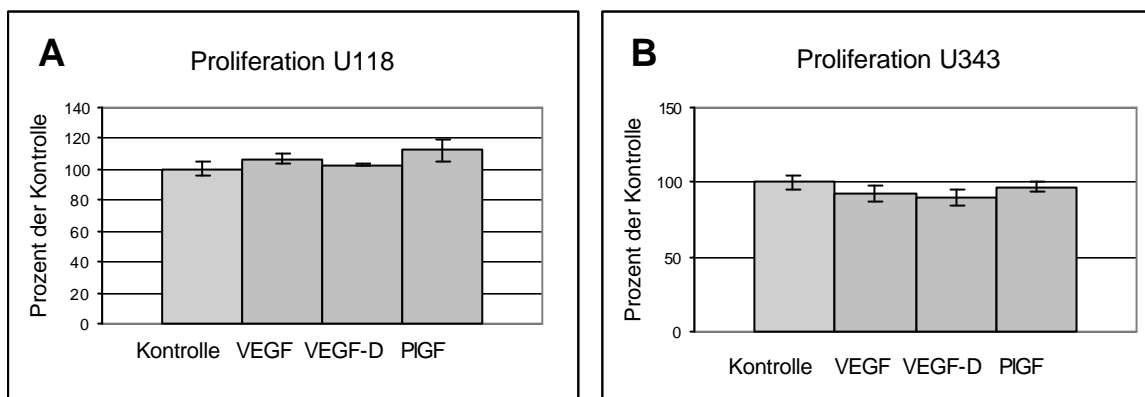


Abb. 14: Einfluss von VEGF auf die Proliferation von Gliomzelllinien: Ergebnisse der Proliferationsteste bei U343-Zellen (A) und U118-Zellen (B). Subkonfluente Zellen wurden mit VEGF und VEGF-Rezeptor-Agonisten in serumreduziertem Medium (1% FKS) stimuliert. Der ^3H -Thymidin-Einbau wurde gemessen und relativ zur Kontrolle gesetzt.

4.2.1.2 VEGFR-Agonisten haben geringen Einfluss auf die VEGF-Sekretion

Zur Bestimmung des autokrinen Einflusses von VEGF auf seine Sekretion wurden U343 und U118-Zellen für 48 h mit den jeweiligen VEGF-Rezeptor-Agonisten stimuliert, die Überstände abgenommen und gemäß Vorschrift in Abschnitt 3.2.7 in einem Sandwich – ELISA untersucht.

Die Balkendiagramme in Abbildung 15 geben das Ergebnis wieder. Bei den U343-Zellen ist kein Effekt des VEGFR-1-Agonisten PIGF zu beobachten (Abb. 15 A). Bei nur sehr kleiner Standardabweichung sind die sezernierten VEGF-Mengen von stimulierten und unstimulierten Zellen (Kontrolle) nahezu identisch. Die U118-Zellen wurden mit dem VEGFR-1-Agonisten PIGF, und mit dem VEGFR-2-Agonisten VEGF-D stimuliert. Während PIGF keinen Einfluss auf die Sekretion hatte, zeigte sich bei der Stimulation mit VEGF-D eine geringe Absenkung der VEGF-Sekretion (Abb. 15 B).

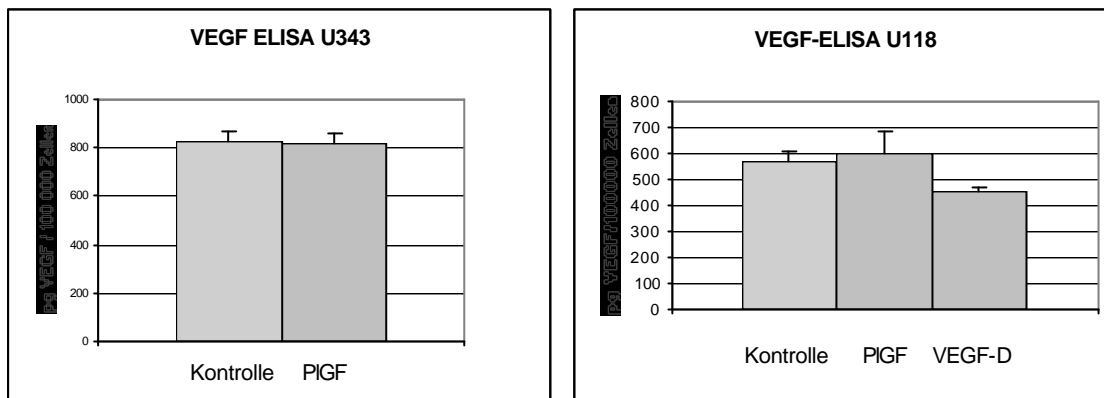


Abb. 15: Einfluss von VEGFR-Agonisten auf die VEGF-Sekretion: Darstellung der Ergebnisse der VEGF-ELISAs. Überstände von U343 (A) und U118 (B) –Zellen wurden nach 48 stündiger Stimulation mit VEGF-Rezeptoragonisten bezüglich der sezernierten VEGF-Mengen untersucht. n= 4

4.2.2 Einfluss von VEGF auf intrazelluläre Signalkaskaden

Wie in den Abschnitt 4.2.1 beschrieben, konnten keine Effekte des VEGF auf die Gliomazelllinien U118 und U343 beobachtet werden. Ein Grund dafür könnte ein Defekt in der Signaltransduktion der VEGF-Rezeptoren sein.

Um die Funktionalität der Rezeptoren zu überprüfen, sollten deshalb untersucht werden, ob nach Bindung des VEGF an die Rezeptoren tatsächlich eine Autophosphorylierung derselben stattfindet und ob eine Signalkaskade aktiviert wird. Dazu wurde nach Stimulation und Aufarbeitung der Zellen zunächst ein anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper im Western-Blot-Verfahren eingesetzt. Anschließend wurde die Aktivierung verschiedenener Signalmoleküle ebenfalls mittels Western Blot untersucht. Schließlich sollte noch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren überprüft werden. Dazu wurden Electrophoretic Mobility Shift Assays durchgeführt.

4.2.2.1 Überprüfung der Rezeptorphosphorylierung

Mit Hilfe eines Antikörpers gegen phosphorylierte Tyrosinreste (pTyr, siehe Tabelle 6) wurde im Western Blot-Verfahren untersucht, ob die Stimulation der Zellen mit VEGF eine Veränderung des Phosphorylierungsmusters nach sich zog. Eine Bindung des VEGF an einen seiner Rezeptoren, hätte eine Autophosphorylierung derselben zur Folge, die mit Hilfe des Antikörpers angezeigt werden könnte.

U343 und U118 Zellen wurden in kleine Zellkulturflaschen ausgesät und 2-4 Tage kultiviert. Dann wurden sie gemäß der Vorschrift 3.2.5.2 für 5 und 15 min mit 10ng/ ml VEGF stimuliert. Als Positiv-Kontrolle diente eine Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF, dessen Rezeptoren an Gliomazellen überexprimiert sind und folglich eine deutliche Aktivierung aufzeigen musste.

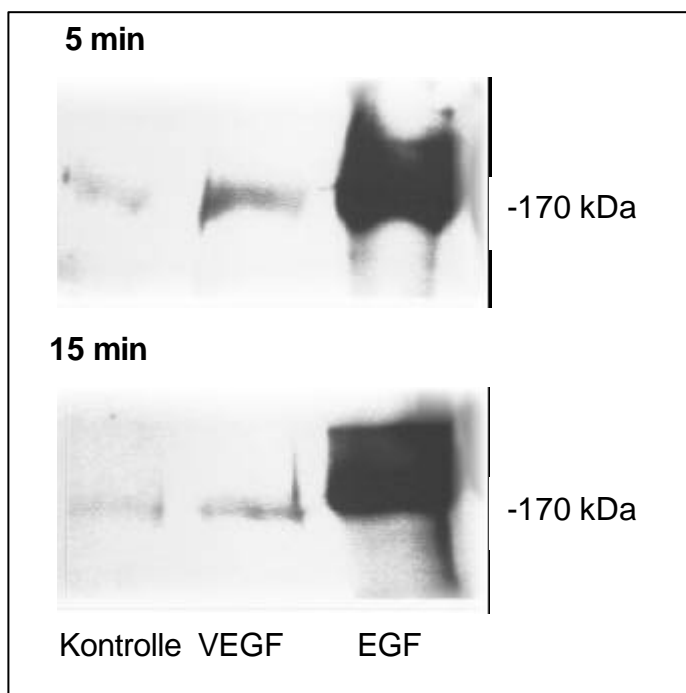


Abb. 16: Western-Blot mit Zellmembranen stimulierter U343-Zellen. Die Detektion erfolgte mit einem anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper und einer nachgeschalteten Chemolumineszenz-Reaktion. Die Banden weisen auf eine Phosphorylierung des VEGFR-1 (170kDa), bzw. EGFR (170kDa) hin.

Nach fünf- bzw. 15minütiger Stimulation wurden die Zellen lysiert und die Membranfraktion isoliert (Abschnitt 3.2.3.1). Jeweils 5 μ g der Fraktionen wurde auf ein 5%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und nach dem Western Blot-Verfahren gemäß Abschnitt 3.2.5 analysiert. Das Ergebnis der fünfminütigen Stimulation ist in Abbildung 16 dargestellt.

Man erkennt verschieden intensive Banden bei einer Höhe von 170kDa (Marker nicht abgebildet). Diese Höhe entspricht sowohl der Größe des VEGFR-1 (170 kDa), der in den U343-Zellen exprimiert ist, als auch dem EGF-Rezeptor (170 kDa). Im Vergleich zur Kontrolle ist vor allem bei dem Ergebnis der kurzen Stimulation ein leichte Verstärkung

der Bandenintensität durch das VEGF zu beobachten (Spur 2). Dies lässt eine Aktivierung des VEGFR-1 vermuten. Die Stimulation mit EGF hat eine starke Phosphorylierung eines Proteins an Tyrosinresten zur Folge, wie in Bahn 3 deutlich zu erkennen ist, wobei es sich wahrscheinlich um den EGF-Rezeptor handelt. Offensichtlich ruft also VEGF eine leichte Tyrosinphosphorylierung des VEGFR-1 in U343-Zellen hervor.

4.2.2.2 Überprüfung der Aktivierung von MAP-Kinasen

Um zu überprüfen, ob die in Abschnitt 4.1.5.2 beschriebene, durch VEGF herbeigeführte Rezeptorphosphorylierung in einer intrazellulären Signalkaskade weitergegeben wird, wurde mit Hilfe von Western Blots die Aktivierung von MAP-Kinasen untersucht. Dazu wurden U343 und U118 Zellen in kleinen Zellkulturflaschen ausgesät und für verschiedene Zeiten mit VEGF und EGF stimuliert. EGF diente als Kontrolle für die Aktivierbarkeit der MAP-Kinasen in den Zellen. Als Negativ-Kontrolle fungierte reines Medium.

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Stimulation der U343-Zellen erfolgte für 5, 10, 20 und 30 min mit VEGF (Spur 2), EGF (Spur 3) und je zwei Kontrollen (Spur 1 und 4). Lediglich die Stimulation mit EGF hat einen Effekt zur Folge. Bei allen Zeiten ist hier eine starke Aktivierung der MAP-Kinasen ERK 1 und 2 angezeigt. Nach Applikation von VEGF hingegen, ist kein Unterschied zu den Kontrollen zu beobachten.

Teil B der Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der U118-Stimulationen für 3 und 15 Minuten. Man sieht auch hier, dass die Banden der mit VEGF stimulierten Proben (Spur 2) sich nicht von denen der Kontrollen (Spur 1) unterscheiden, wohingegen die Applikation von 10ng/ml EGF eine deutliche Aktivierung von ERK1/2 zur Folge hatte (Spur 3). In diesem Experiment wurde zusätzlich mit einer Kombination von VEGF und EGF stimuliert (Spur 4), um einen eventuellen inhibierenden oder synergistischen Effekt zeigen zu können. Allerdings wurde auch hier kein Unterschied zu den Ergebnissen der EGF-Stimulation festgestellt.

Somit konnte also weder bei den VEGFR-1-exprimierenden U343-Zellen noch den VEGFR-2-tragenden U118-Zellen ein Effekt des VEGF auf die MAP-Kinasen nachgewiesen werden.

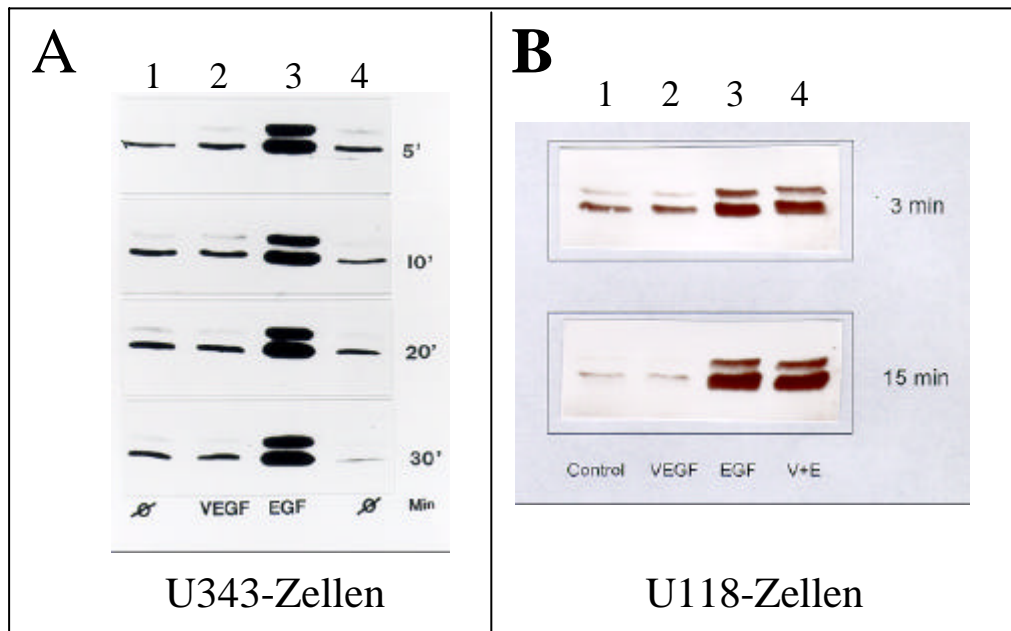


Abb. 17: Western Bot mit Homogenaten stimulierter U343- und U118-Zellen. Überprüfung der Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 (p42/44) mit einem anti-phospho-ERK-Antikörper und nachgeschalteter Chemolumineszenz-Reaktion

4.2.2.3 Überprüfung der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren

Nachdem kein Einfluss des VEGF auf der Signaltransduktionsebene der MAP-Kinasen gezeigt werden konnte, sollte überprüft werden, ob sich ein Effekt auf Transkriptionsfaktoren feststellen ließ.

Dazu wurden U343 und U118-Zellen in kleine Zellkulturflaschen ausgesät und für verschiedene Zeiten (30 min, 3h) mit reinem Medium (Kontrolle), 10ng/ml VEGF oder EGF, bFGF und TNF α als Positivkontrollen stimuliert. Anschließend wurden wie in Abschnitt 3.2.3.3 beschrieben die Kernproteine der Zellen isoliert und in ein „Electrophoretic Mobility Gel Shift Assay“ eingesetzt. Überprüft wurden die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B mit den entsprechenden Oligonukleotid-Sonden entsprechend der Vorschrift in Abschnitt 3.2.17.

In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Experimente mit U343- und U118-Zellen wiedergegeben. Es wurden überwiegend Doppelwerte angefertigt. Die Spuren 1 und 2 zeigen die Kontrollwerte (ohne Stimulation), Spuren 3 und 4 die Ergebnisse der VEGF-Stimulation. Die Spuren 4, bzw. 4 und 5 zeigen die Positiv-Kontrollen, bei denen EGF und bFGF als Posotiv-Kontrolle für eine AP-1-Aktivierung eingesetzt wurden. TNF- α diente als

Kontrolle für NF κ B. Abgebildet sind hier die Ergebnisse der langen Stimulation (3h) für AP-1 und der kurzen (30min) für NF κ B.

Man sieht deutlich, dass die spezifischen Banden der Spuren 1-4, die denen der Kontrollen bzw. der VEGF-Stimulation entsprechen, sich nicht unterscheiden, während die Positiv-Kontrollen in Spur 4 bzw. 4-5 eine deutliche Aktivierung des jeweiligen Transkriptionsfaktors zeigen. Ein vergleichbares Bild brachte die Stimulation der U118 Zellen hervor. Auch hier sind in den mit VEGF stimulierten Zellen die jeweiligen Transkriptionsfaktoren, verglichen mit den Kontrollen, nicht beeinflusst. Die Positivkontrollen jedoch, zeigen ein deutliches Signal des aktivierten Transkriptionsfaktors.

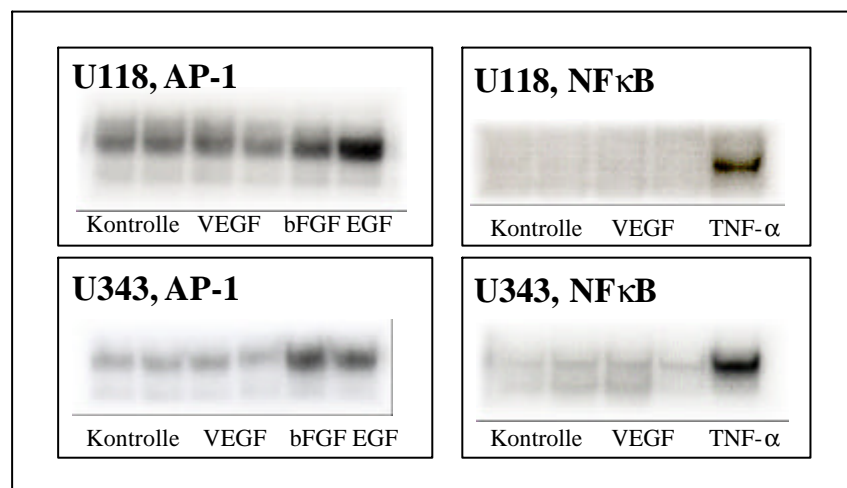


Abb. 18: Ergebnisse der „Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs)“ zur Untersuchung der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 (links) und NF κ B (rechts). Kernproteine stimulierter U118- (oben) und U343-Zellen (unten) wurden mit radioaktiv markierten Sonden inkubiert, die Hybride mittels PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. bFGF und EGF oder TNF- α dienten jeweils als Positivkontrolle für die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren.

Somit konnte auch auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren der aktivierende Einfluss des VEGF, der noch auf Rezeptorebene zu beobachten war nicht nachvollzogen werden. Vielmehr findet man die Ergebnisse der Untersuchungen der Effekte, wie der Proliferation und der Sekretion bestätigt. VEGF scheint keinerlei Einfluss auf die Gliomazellen selbst auszuüben.

4.3 VEGF-Rezeptoren und -Effekte an Mikroglia-Zellen

4.3.1 Zellkultur

Um das Vorhandensein von VEGF-Rezeptoren an Mikroglia-Zellen und ihre Bedeutung untersuchen zu können, wurden sowohl eine (murine) Mikroglia-Zelllinie in Kultur genommen als auch native Mikroglia-Zellen der Ratte verwendet.

4.3.1.1 Kultur von Ratten-Mikroglia-Zellen

Es wurden zunächst Mikrogliazellen verwendet, die aus den zerebralen Cortices von 1-3 Tage alten Wistar-Ratten isoliert worden waren. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Ralph Lucius zur Verfügung gestellt. Sie waren wie in WOLLMER et. al. (2001) beschrieben isoliert und kultiviert worden. Nach 1-2 Subkulturen wurden die Zellen isoliert und für die Experimente eingesetzt.

4.3.1.2 Kultur der murinen Mikroglia-Zelllinie BV-2

Die Kultivierung nativer Mikrogliazellen ist sehr aufwendig, zeitintensiv und bedarf hoher Mengen Ausgangsmaterials. Zusätzlich waren die Zellen nicht beliebig subkultivierbar und standen daher nur in sehr geringer Menge zur Verfügung. Deshalb sollten weitere Untersuchungen an einer Mikroglia-Zelllinie durchgeführt werden.

Die murine Zelllinie BV-2 wurde wie in 3.2.11 beschrieben in DMEM-Nährmedium angezüchtet und kultiviert. Die Zellen zeigten eine sehr hohe Wachstumsrate. So war eine 75cm² große Zellkulturflasche bei einer Ausgangszahl von 1×10^6 Zellen nach bereits 3 Tagen konfluent. Die Zellen besaßen eine heterogene Morphologie. Dies sei in Abbildung 19 verdeutlicht, die eine Phasenkontrastaufnahme einer BV-2-Kultur zeigt. Die Zellen hatten teilweise spindelförmiges bis astrozytenähnliches Aussehen mit langen, strahlenförmigen Ausläufern. Daneben gab es Zellen, die kleiner waren, mehr rund bis oval. Einige wenige Zellen zeigten die sogenannte „fried egg“ Morphologie (aktivierte Mikroglia), wie sie in WOLLMER et al. (2001) beschrieben wurde. Je dichter ein Zellrasen wurde, desto größer wurde der Anteil der runden Mikrogliazellen. Man musste darauf

achten, die Zellen nicht über die Konfluenz hinaus wachsen zu lassen, da sie sich dann in großer Menge ablösen.

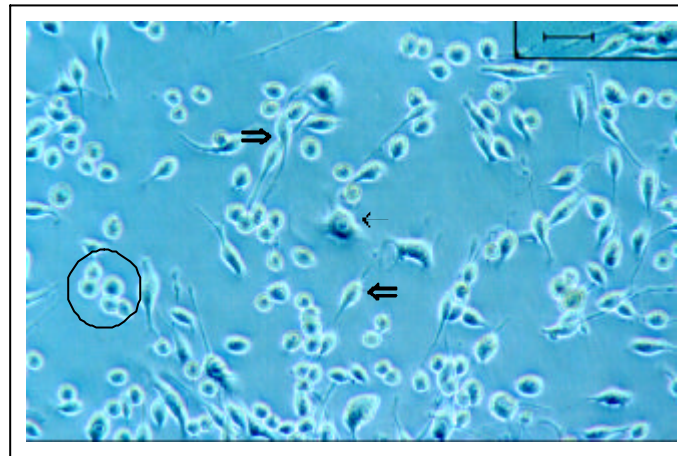


Abb. 19: Phasenkontrastaufnahme von kultivierten BV-2-Mikrogliazellen. In der heterogenen Kultur sind gleichzeitig aktivierte/amöboide (Pfeil), Spindelförmige (Doppelpfeile) und runde (Kreis) Mikrogliazellen zu finden. Balken=50µm, Vergrößerung x200

4.3.2 Nachweis von VEGF-Rezeptoren mittels RT-PCR

4.3.2.1 RNA-Isolierung

Um für die Mikrogliazellen die Expression der VEGF-Rezeptoren überprüfen zu können, musste zunächst Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert werden.

Nach der Single-Step-Methode nach Chomczynski wurden 110µg Gesamt-RNA aus ca 10 Mio. BV-2-Zellen, mit Hilfe des RNeasy-Kits aus Ratten-Mikroglia ca. 45µg pro 10 Mio Zellen isoliert. Die photometrisch bestimmte Reinheit der RNA lag stets zwischen 1,6 und 2,0 (A_{260}/A_{280}).

Da es sich bei den Mikrogliazellen um Zellen aus der Maus und der Ratte handelt, wurde die RT-PCR für die VEGF-Rezeptoren zunächst an Kontroll-Geweben etabliert, die die zu amplifizierenden Gene mit Sicherheit enthielten. Beide VEGF-Rezeptoren sind an Endothelzellen exprimiert, deshalb wurde Lungengewebe als Kontrollgewebe gewählt, denn es ist sehr gut vaskularisiert und damit endothelzell-reich.

Mit der Single-Step-Methode nach Chomczynski (Abschnitt 3.2.9.1.3) wurden aus 100mg Lungengewebe bei der Maus ca.20µg und bei der Ratte 250µg RNA isoliert. Die Reinheit betrug jeweils ungefähr 1,75 (A_{260}/A_{280}).

Um die Qualität der isolierten Gesamt-RNA zu überprüfen, wurde wie unter 3.2.11 beschrieben, eine RNA-Elektrophorese durchgeführt, in die jeweils 10µl der in Wasser gelösten RNA-Proben eingesetzt wurden.

In Abb.19 ist das Ergebnis einer typischen RNA-Elektrophorese dargestellt.

Deutlich lassen sich die für Eukaryonten spezifischen 28S- und 18S-ribosomalen (r)RNAs differenzieren. Sie erscheinen als auffällig distinkte Banden bei 4,7kb (28S) und 1,9kb (18S), wobei die 18S-Bande weniger stark ausgeprägt ist. Dieses Bild zeigt, dass intakte RNA vorliegt, denn wäre sie bereits durch RNasen degradiert worden, sähe das Bild anders aus. In dem Fall nämlich erschiene entweder die 18S-Bande dicker als die 28S-Bande, bedingt durch einen hohen Anteil, kleiner, bereits abgebauter RNA-Moleküle, oder die Banden wären gar nicht mehr zu erkennen, wenn die ribosomale RNA bereits vollständig abgebaut wäre.

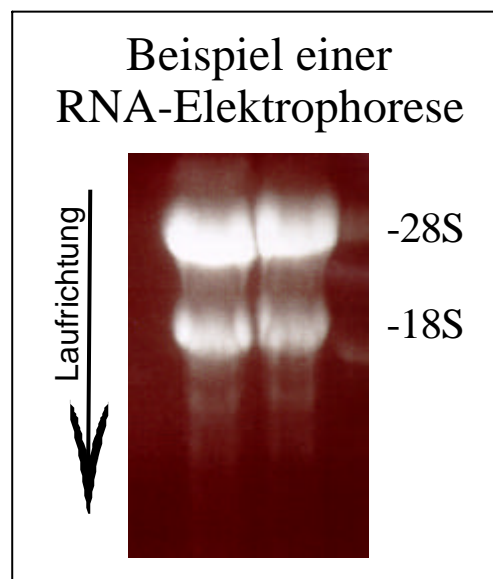


Abb. 19: Abbildung von elektrophoretisch aufgetrennter RNA. Die Gesamt-RNA wurde mittels Phenol-Extraktion aus Ratten-Lungen-Gewebe gewonnen und auf einem 1%igen Agarose-Gel in Gegenwart von Formamid und Ethidiumbromid aufgetrennt. Mit Hilfe von UV-Licht konnten die charakteristischen 18S und 28S- Banden sichtbar gemacht werden.

Diese intakte RNA konnte somit in die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt werden.

4.3.2.2 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit anschließender DNA-Elektrophorese

Mit Hilfe der RT-PCR sollte nun überprüft werden, ob und welche der beiden VEGF-Rezeptoren –VEGFR-1 oder VEGFR-2- in Mikrogliazellen exprimiert werden.

4.3.2.2.1 Nachweis des VEGFR-1 an Ratten-Mikrogliazellen

Wie unter 3.2.12 beschrieben wurden die Ratten-Mikroglia-RNA und die RNA aus Ratten-Lunge einer reversen Transkription und einer anschließenden PCR mit den spezifischen Primern rVEGFR-1 und rVEGFR-2 unterzogen, um das Vorhandensein der Rezeptoren zu überprüfen. Als Kontrolle für die Qualität der RNA wurde zusätzlich jeweils ein Ansatz mit Primern für das Haushaltsgen β -Aktin hergestellt.

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der PCR dargestellt.

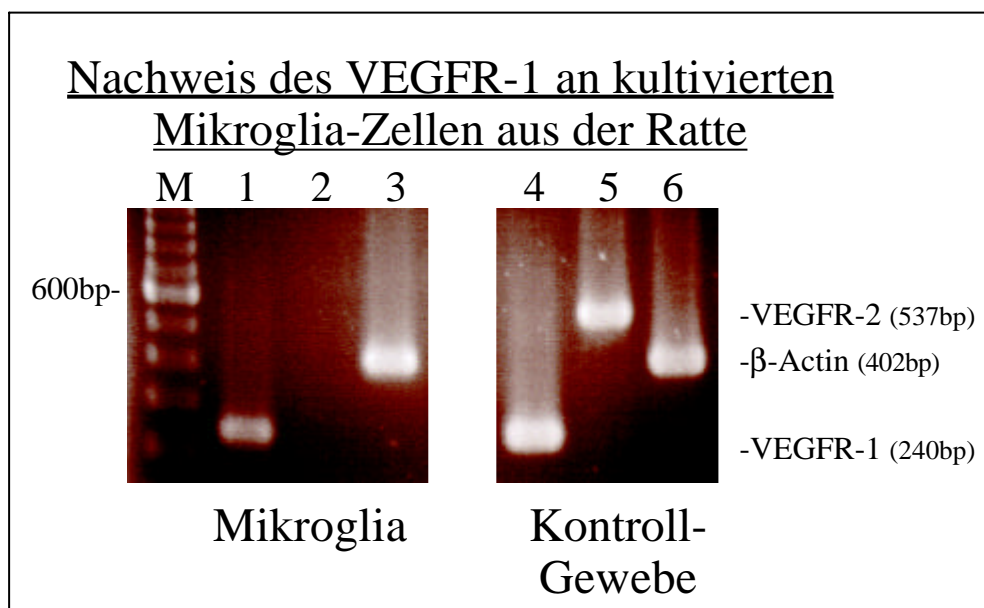


Abb. 20: Ergebnis der Überprüfung der VEGF-Rezeptor-Expression in Ratten-Mikrogliazellen mittels RT-PCR. Als Kontrolle wurde die RT-PCR an Lungengewebe der Ratte durchgeführt. Während dort beide VEGF-Rezeptoren exprimiert sind (Spur 4 und 5), findet man in den Mikroglia lediglich den VEGFR-1 (Spur 1). Ethidiumbromidfärbungen von 2%igen Agarose-Elektrophoresegelelen.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, erhielt man bei Verwendung der VEGFR-1-Primer in beiden Fällen ein Amplifikat (Spur 1+4). Während jedoch die Aktin-Kontrollen in beiden Fällen eine gleich starke Bande hervorbrachte (Spalte 3+6), ist das Signal des VEGFR-1

bei den Mikrogliazellen viel schwächer. Der VEGFR-2 konnte nur im Kontroll-Gewebe amplifiziert werden (vgl. Spalte 2 und 5) und ist offensichtlich in den Mikrogliazellen nicht exprimiert.

4.3.2.2.2 Nachweis des VEGFR-1 an BV-2-Zellen

Auch hier wurde die aus BV-2 Zellen und aus Maus-Lungen gewonnene RNA zunächst in eine RT-Reaktion gemäß Abschnitt 3.2.12 eingesetzt. Entsprechend Abschnitt 4.2.2.4.1 wurden die Ansätze danach einer PCR mit den Primern mVEGFR1 und mVEGFR2 und m β -Aktin unterzogen (siehe Kapitel 3.2.13).

Abbildung 21 gibt das Ergebnis wieder:

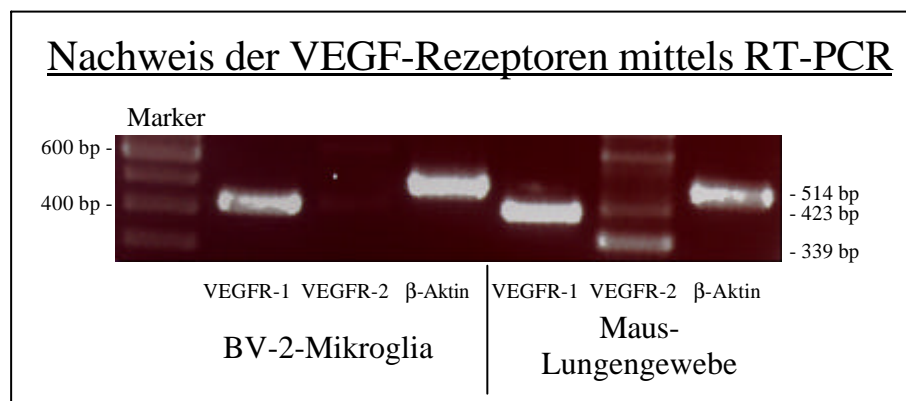


Abb. 21: Darstellung des Ergebnisses der RT-PCR zum Nachweis von VEGFR-1 und VEGFR-2 in BV-2-Mikrogliazellen, verglichen mit Kontrollgewebe. Ethidiumbromidfärbung eines analytischen, 2%igen Agarose-Gels.

Sowohl bei den BV-2-Zellen als auch bei dem Kontrollgewebe konnte ein Amplifikat mit den VEGFR-1-Primern in der erwarteten Größe (423bp) erhalten werden (Spuren 1+4). Für den VEGFR-2 konnte lediglich in der Kontrolle eine Bande in der Höhe von 339bp detektiert werden (Spur5, neben unspezifischen). Die Aktin-Kontrollen zeigte bei beiden Proben ein relativ gleich starkes Signal. Ebenso wie die nativen Mikroglia-Zellen, exprimieren die BV-2-Zellen auch den VEGFR-1. Sie sind daher als Modell geeignet und konnten im folgenden für die weiteren Versuche eingesetzt werden.

4.3.3 Nachweis von VEGF-Rezeptoren auf Proteinebene

Eine RT-PCR kann nur das Vorhandensein einer mRNA-Population in einer Zelle oder einem Organismus beweisen. Ob jedoch die mRNA danach auch in ein vollständiges Protein umgeschrieben wird, kann dadurch nicht gezeigt werden. Um nun also das Vorhandensein des vollständigen Rezeptorproteins nachzuweisen, wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt.

Der immunhistochemische Nachweis des VEGFR-1 erfolgte wie in 3.2.2.4 beschrieben unter Verwendung des Antikörpers „flt-1“. Die BV-2-Zellen wurden dafür auf Deckgläschen ausgesät und mindestens 2 Tage angezchtet.

In untenstehender Abbildung 22 ist das Ergebnis dargestellt. Man sieht in Abbildung 22 A deutlich eine rote Färbung des cytosolischen Bereiches der BV-2-Zellen, hervorgerufen durch die alkalische Phosphatase / anti-alkalische Phosphatase-Reaktion. In Abbildung B ist die ungefärbte Kontrolle abgebildet, bei welcher der Primärantikörper weggelassen wurde.

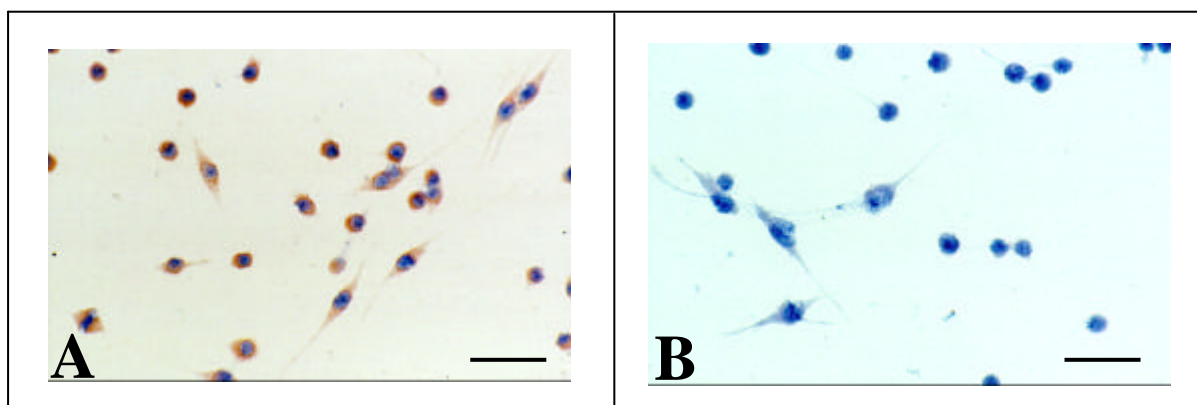


Abb. 22: Immunhistochemische Färbung von BV-2-Mikrogliazellen auf den VEGFR-1, APAP-Methode (A). B zeigt die Kontrolle (Weglassen des Primärantikörpers); Balken= 50µm, Vergrößerung x200.

Gleichzeitig kann man noch mal die heterogene Morphologie der BV-2-Zellen erkennen. Der überwiegende Anteil der Zellen ist klein und abgerundet. Nur wenige zeigen eine spindelförmige Morphologie welche für nicht-aktivierte Zellen charakteristisch ist. Es

scheint, als seien die runden Zellen intensiver gefärbt als die spindelförmigen. Dies ist aber wahrscheinlich nur auf die unterschiedliche Beschaffenheit bzw. Tiefe der Zellkörper zurückzuführen, denn bei Vergleich mit der Kontrolle, kann man dasselbe Phänomen beobachten. Ein Immunhistochemischer Nachweis des VEGFR-2 gelang nicht (nicht gezeigt), was die Ergebnisse der RT-PCR bestätigte.

4.3.4 Untersuchungen zur Funktionalität des VEGFR-1 an Mikrogliazellen

Nachdem bewiesen werden konnte, dass der VEGFR-1 an Mikrogliazellen exprimiert wird, sollte nun untersucht werden, ob er funktionell aktiv ist, genauer gesagt, ob nach Behandlung der Zellen mit dem Liganden VEGF ein Effekt zu beobachten war.

Dazu wurden zunächst der Einfluss von VEGF auf das Proliferationsverhalten der Zellen und schließlich der auf ihre Migration untersucht.

Bindet ein Ligand an seinen Rezeptor so löst dies meist eine intrazelluläre Signalkaskade aus. Deshalb wurde später geprüft, ob den Effekten des VEGF intrazelluläre Ereignisse vorausgingen.

4.3.4.1 Einfluss von VEGF auf die Proliferation von Mikroglia-Zellen

Je 50.000 BV-2 Zellen wurden in kleinen Petrischalen ausgesät und nach zweitägiger Stimulation in 0,5% FKS einem Proliferationstest unterzogen, wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben. Die Zellen wurden mit VEGF und IL-3 als Positivkontrolle stimuliert. Als zweite Positivkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit 10% FKS.

Das Balkendiagramm in Abb. 23 zeigt das Ergebnis des Proliferationstestes.

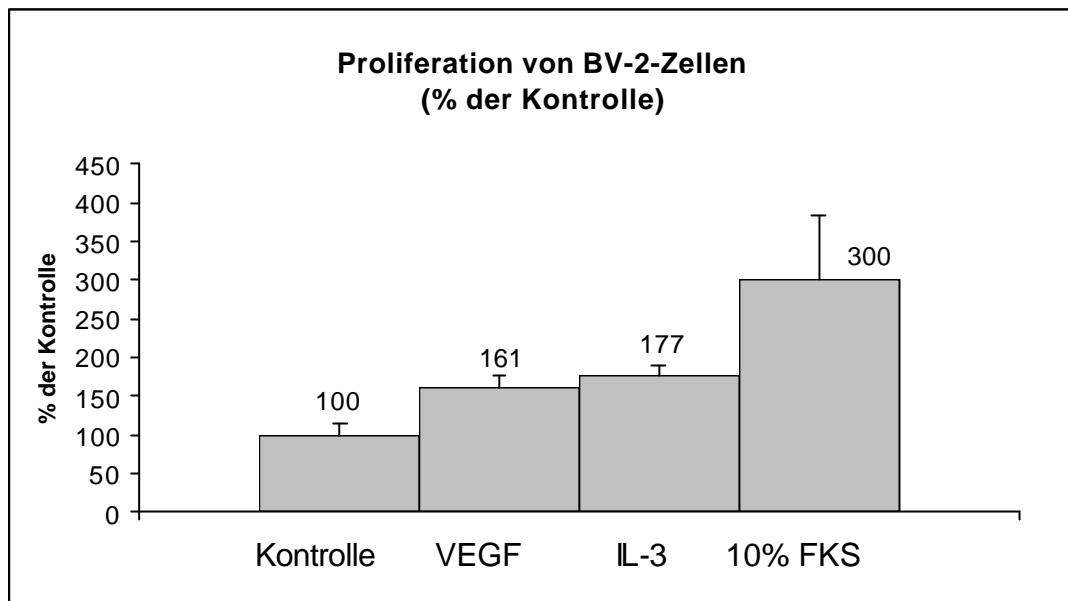


Abb. 23: Einfluss von VEGF auf die Proliferation von Mikrogliazellen. Gemessen wurde der Einbau von ^3H -Thymidin nach 48h Stimulation mit 10ng/ml VEGF bzw. IL-3 in 0,5% FKS und in Prozent auf die Kontrolle bezogen, $n=4$

VEGF hat einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der Mikrogliazellen. Es konnte eine um mehr als das 1,6 fache gesteigerte Einbaurrate gemessen werden, was in etwa dem Wert der Positiv-Kontrolle IL-3 entsprach, die eine Steigerung um 1,77 hervorbrachte. Eine zweite Positivkontrolle wurde mit Nährmedium (10% FKS) durchgeführt. Sie zeigt eine noch größerern Verstärkung des Proliferationsverhalten der Zellen auf durchschnittlich den dreifachen Wert. Die relativ hohe Standard-abweichung bei Balken 4 kann damit erklärt werden, dass die Zellen hier schon zu dicht gewachsen waren, so dass sich einige bereits abgelöst hatten.

4.3.4.2 Einfluss von VEGF auf die Migration von Mikroglia-Zellen

Es ist bekannt, dass Zellen der Monozyten/Makrophagen-Familie durch Chemokine und andere Faktoren zur Migration angeregt werden. Das hohe Vorkommen von Mikrogliazellen innerhalb der Tumormasse in Gliomen lässt vermuten, dass sie durch einen von den Tumoren sezernierten Faktor angelockt werden könnten. Ob dies VEGF sein könnte, sollte in einem Chemotaxis-Assay überprüft werden.

Dazu wurde ein Migrationsassay in einer Kammer nach Boyden wie in Abschnitt 3.2.17 beschrieben durchgeführt. Einer Suspension von 5×10^5 Zellen/ml wurde VEGF in verschiedenen Konzentrationen und reines Medium als Kontrolle angeboten. In Abbildung 24 ist das Ergebnis mit der effektivsten Konzentration von 10ng/ml VEGF dargestellt. Die gewanderten und an dem verwendeten Carbonatfilter anheftenden Zellen wurden mit Hämatoxylin angefärbt und densitometrisch ausgewertet. Der Durchschnittswert der Kontrollen wurde gleich hundert gesetzt und die übrigen Werte prozentual darauf bezogen.

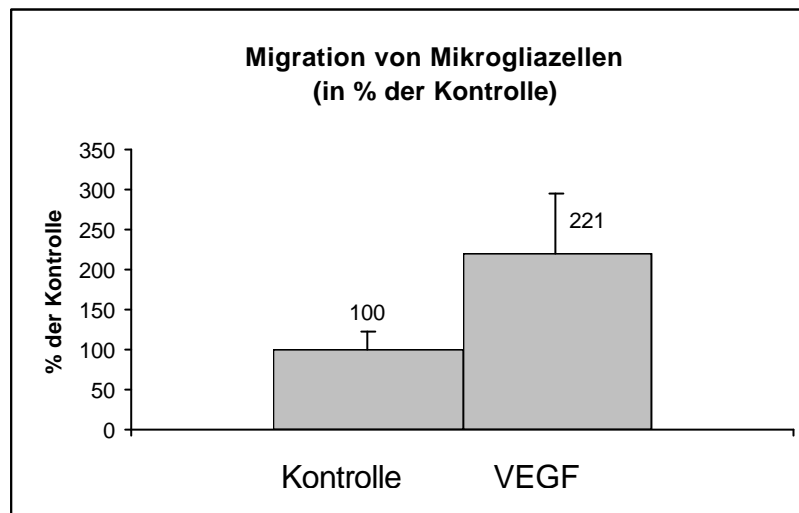


Abb. 24: Darstellung der densitometrischen Auswertung der durchgeführten Chemotaxis-Tests, in denen BV-2-Mikrogliazellen in einer Boydenkammer für 14h in Stimulationsmedium (0,5% FKS) entlang eines VEGF-Gradienten wanderten. n=6

Wie der Abbildung 24 zu entnehmen ist, wanderten bei Verwendung von VEGF als Stimulus, durchschnittlich mehr als doppelt so viele Zellen wie bei der Kontrolle. Die Standardabweichung ist zwar relativ groß, aber dennoch signifikant ($p=0,01$).

4.3.4.3 Einfluss von VEGF auf die Signaltransduktion in Mikrogliazellen

Die in den Abschnitten 4.3.4.1 und 4.3.4.2 beschriebenen Effekte des VEGF auf Mikrogliazellen sollten auf intrazelluläre Effekte zurückzuführen sein. Das stimulierende VEGF muss nach Bindung an seinen Rezeptor eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst haben, die es nun nachzuvollziehen galt.

4.3.4.3.1 VEGF hat keinen Effekt auf die Phosphorylierung der MAPKinasen ERK1/2 und p38

Deshalb wurden wie schon bei der Untersuchung der Signalkaskaden in den Gliomazellen BV-2-Zellen mit VEGF und Kontrollen stimuliert, cytosolische Proteine isoliert und Western Blots mit Antikörpern gegen verschiedene Signalproteine durchgeführt. Zunächst wurde auf die für den Tyrosinkinasezeptor –Signalweg typische MAP-Kinase pERK1/2 bzw. p42/ 44 untersucht. Abbildung 25 zeigt das Ergebnis. Weder nach kurzer, noch nach längerer Zeit ist irgendein Effekt des VEGF auf die Aktivierung dieser Kinase zu beobachten. Es wurden auch Stimulationen für dazwischen liegende Zeiten (15 und 30 min, nicht abgebildet) durchgeführt, die aber ebenso keinen Effekt zeigten.

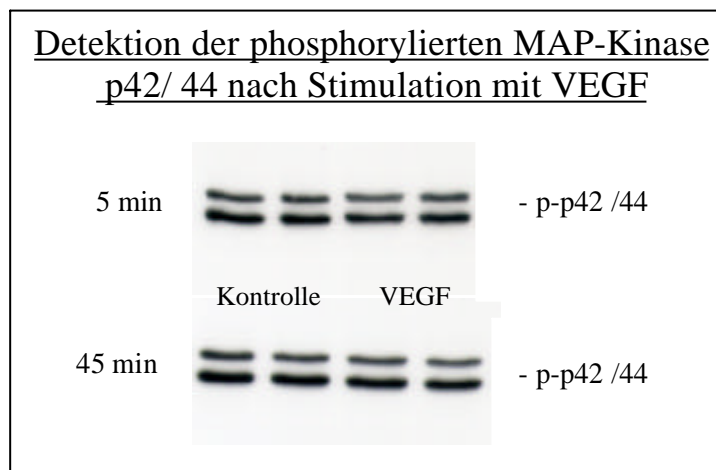


Abbildung 25: Western Blot zur Überprüfung der Aktivierung der p42/44- MAP-Kinase. Dargestellt ist das Ergebnis der Stimulation mit 10ng/ ml VEGF und Kontrolle für 5 und 15 min. Der Western Blot wurde mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte ERK 1/ 2 durchgeführt und über eine Chemolumineszenz-reaktion detektiert.

Desweiteren wurde die Aktivierung der MAP-Kinase p38 überprüft. Dazu wurde genau wie bei der p42/44 BV-2-Zellen für verschiedene Zeiten mit und ohne VEGF stimuliert und Western Blots mit Antikörpern gegen die phosphorylierte („p“-p38) MAP-Kinase durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.5). Es wurden Doppelwerte stimuliert. Wie man in untenstehender Abbildung 26 sieht, ist auch hier kein Effekt des VEGF zu erkennen.

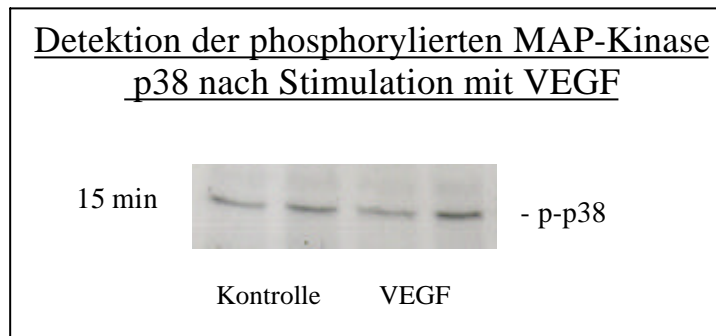


Abb. 26: Ergebnis eines Western Blots zur Überprüfung der Aktivierung der p38- MAP-Kinase durch 15minütige Stimulation mit 10ng/ml VEGF. Es wurde ein Antikörper gegen die phosphorylierte p38 verwendet. Die Detektion erfolgte mittels einer Chemolumineszenzreaktion.

Zwar ergeben sich in der Stärke der Banden leichte Schwankungen (vgl. beide VEGF-Banden), diese sind aber innerhalb eines Doppelwertes und daher nicht aussagekräftig. Zusammengefasst mit dem Ergebnis des p42/ 44-Western Blots kann man feststellen, dass VEGF keinen Effekt auf die klassischen MAP-Kinasen in Mikroglia-Zellen zu haben scheint.

4.3.4.3.2 VEGF hat inhibierenden Einfluss auf die Kinase „Akt“

Nachdem kein Effekt von VEGF auf die „klassischen“ MAP-Kinasen ERK (p42/ 44) und p38 beobachtet werden konnte, sollte nun ein anderer Signalweg untersucht werden, der nicht über MAP-Kinasen verläuft, und zwar der der PI3-Kinase. In bestimmten Zelltypen wird diese durch den VEGFR aktiviert und gibt ihr Signal an die den MAP-Kinasen verwandte Kinase „Akt“ weiter, deren Aktivierung im Folgenden untersucht wurde.

Ebenso wie oben in Abschnitt 4.3.4.3.1 beschrieben, wurden BV-2-Zellen stimuliert und mittels Western Blot Methode untersucht. Es wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch gegen die phosphorylierte Kinase Akt gerichtet ist. Nach der ersten Detektion wurden Primär- und Sekundärantikörper von der Membran abgewaschen und eine erneute Immunreaktion mit anti-Akt-Antikörper durchgeführt. Dieser Antikörper sollte sämtliche vorhandenen Akt-Proteine –auch die nicht-phosphorylierten- detektieren. Das diente

dazu, die Menge an insgesamt vorhandenem Akt vergleichen zu können, um eine sichere Aussage über differentielle Aktivierung erst zu ermöglichen.

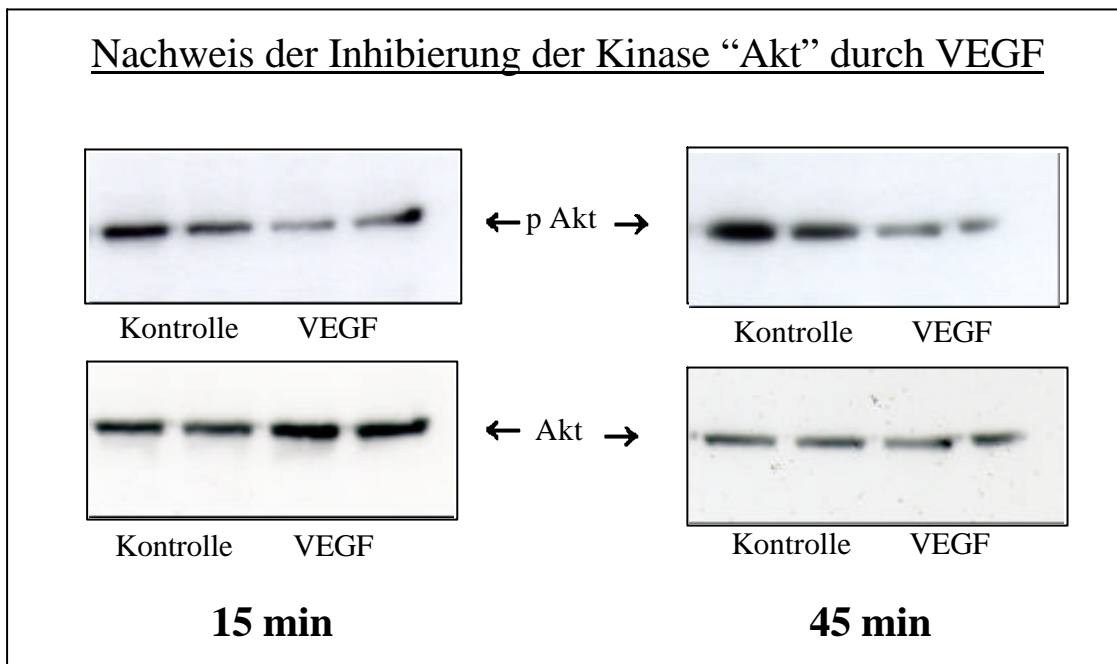


Abb. 27: Western Blot mit Homogenaten stimulierter BV-2-Mikrogliazellen. Detektion erfolgte mit einem anti-phospho-Akt-Antikörper (A+B) und Chemolumineszenz-Reaktion. Die Blots wurden „gestrippt“ und mit einem anti-Akt-Antikörper detektiert, um die gleiche Beladung der Spuren zu zeigen (B+D)

Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente, die an Zellen durchgeführt wurden, die für verschiedene Zeiten stimuliert waren (15 und 45 min). Sowohl nach 15 als auch nach 45 min ist nach Applikation von VEGF eine deutliche Verminderung in der Aktivierung der Akt-Kinase zu beobachten. Während bei 45 min die Stärke der Banden in der α -Akt-Kontrolle (27B) sich nicht unterscheiden, und bei 15min die der VEGF-Werte sogar stärker sind, sind sie bei dem Nachweis des aktivierten Proteins (α -pAkt, A und C) deutlich schwächer als die Kontrollen.

Offensichtlich übt VEGF einen Effekt auf intrazelluläre Signalkaskaden aus, und zwar auf die Signalkaskade der PI3-Kinase.

5 Diskussion

VEGF wurde ursprünglich als heparinbindender, endothelzellspezifischer Faktor identifiziert, der die vaskuläre Permeabilität erhöht (Connolly et al., 1989, Clauss et al., 1990). Heute weiß man, dass dieser Faktor vielfältige biologische Funktionen in Endothelzellen reguliert (Übersicht: z. B. Ferrara, 1999; Zachary and Gliki, 2001). Seine Bedeutung liegt vor allem in der durch ihn initiierten Vaskulogenese und Neoangiogenese begründet. Bei der Vaskulogenese erfolgt während der Embryonalentwicklung die Differenzierung von Endothelzellen und die Bildung von Gefäßen, bei der Angiogenese das Einsproießen von Kapillaren aus bestehenden Blutgefäßen. Mit diesen Eigenschaften spielt VEGF eine Schlüsselrolle auch bei postnataler Angiogenese wie z.B. bei der Schwangerschaft und Wundheilung. Zusätzlich hat er bedeutenden Einfluss bei vielen pathologischen Prozessen, wie bei der rheumatoiden Arthritis, pathologischen Neovaskularisierungen des Auges, kardiovaskulären Erkrankungen und im besonderen bei Tumoren (Folkman, 1995; Isner und Losordo, 1999; Zachary et al., 2000; Okamoto et al., 1997).

Wie viele andere Erkrankungen ist das Tumorwachstum durch eine abnorme Angiogenese charakterisiert und vorangetrieben, die in den meisten Fällen durch eine hohe Produktion des VEGF begleitet wird. In diesem Zusammenhang konnte man feststellen, dass durch Modulation des VEGF ein Weg zu einer erfolgreichen Therapie dieser Erkrankungen führen könnte. Dazu fehlt es heutzutage allerdings noch an der genauen Kenntnis über die exakte Wirkung des VEGF. Seine Signaltransduktionswege sind nur mäßig bekannt, und viele Publikationen widersprechen sich in ihren Ergebnissen. Darüberhinaus ist die Kenntnis über die Wirkungen des VEGF bisher weitgehend auf endotheliale Zellen beschränkt. Man ist sich einig, dass offensichtlich seine Wirkungen von Zelltyp zu Zelltyp variieren.

Das genaue Verständnis über die Signaltransduktion des VEGF und seine Wirkung auf andere Zellen sind essentiell für eine erfolgreiche Entwicklung von Therapien, die auf die Inhibierung von Angiogenese abzielen.

5.1 Gliomazellen

Die Wirkungen von VEGF auf Endothelzellen im Tumorgewebe sind weitgehend aufgeklärt. Ob und wie es jedoch auf die Zellen der Umgebung wirkt, ist nicht immer bekannt und sollte bezüglich der hochmalignen Gehirntumore Glioblastoma multiforme in dieser Arbeit untersucht werden.

5.1.1 Zellkultur

Für *in vitro* Untersuchungen an einem bestimmten Zelltyp bieten sich aus dem Ursprungsgewebe selektionierte und kultivierte Zellen sowie Zelllinien an. Beide Möglichkeiten bieten verschiedene Vor- und Nachteile.

Bei der Isolierung aus dem Gewebeverband ist zu beachten, dass dieser aus verschiedenen Zelltypen bestehen kann, die funktionell miteinander verknüpft sind. Hirntumorgewebe enthält neben den Gliomazellen selbst unter anderem Endothelzellen, Mikrogliazellen und (bei infiltrierenden Gliomen) Nervenzellen. Dabei bilden die Gliomazellen das Gerüst und den größten Anteil des Gewebes. In gesundem Gewebe erfüllen insbesondere die Astrozyten *in vivo* zahlreiche wichtige Funktionen – und zwar im Zusammenspiel mit den Zellen ihrer Umgebung. Sie fungieren auch als eine Art Leitgerüst für Nervenzellen im heranreifenden Gehirn, verändern aber selbst im Zuge der Nervenzellwanderung ihre Morphologie. Wie daraus ersichtlich ist, beeinflussen sich Gliazellen und Nervenzellen im Hirngewebe gegenseitig, sie bilden ein komplexes Gefüge. Wird ein Teil dieses Gefüges abgetrennt – wie es z. B. bei reinen Gliomazellkulturen der Fall ist – so können unter Umständen zusätzlich zu dem malignen Status der Zellen bestimmte Rückkopplungsmechanismen nicht mehr korrekt ablaufen und es könnte dadurch zur Bildung von „Kulturartefakten“ kommen. Diese treten dabei vor allem dann auf, wenn man die Zellen lange in Kultur hält und viele Subkultivierungen vornimmt. Zusätzlich zu den Kulturartefakten unterliegen kultivierte Zellen der sogenannten Seneszens. Das bedeutet, dass die aus dem Gewebeverband herausgelösten Zellen in der unnatürlichen Umgebung der Zellkultur schneller altern und nach einer begrenzten Anzahl von Teilungen ihr Wachstum einstellen und zugrunde gehen.

Diese Alterung ist bei Verwendung von Zelllinien, der zweiten Möglichkeit zur Untersuchung eines bestimmten Zelltyps, nicht gegeben. Zellen einer Zelllinie sind „immortalisiert“, das heißt, dass sie ständig aktiviert sind, und sich nahezu unendlich subkultivieren lassen. Diese Immortalisierung bedeutet allerdings wiederum eine Veränderung der natürlichen Zelleigenschaften. Neben der unendlichen Teilbarkeit der Zelllinien ist ein weiterer Vorteil, dass sie weitgehend rein sind für ihre Zellpopulation, während bei Primärkulturen, häufig trotz gründlicher Präparation und komplizierter Trennverfahren, Verunreinigungen mit anderen Zelltypen oft nicht zu vermeiden sind. Wären z. B. Gliomazellkulturen mit Endothelzellen verunreinigt, könnten gemessene Effekte von VEGF auf diese Kontamination zurückzuführen sein. Man kann also Zelllinien als eine Art „genormten“ Zelltypus betrachten, an dem modellhaft Untersuchungen durchgeführt werden können, bevor diese an Primärkulturen oder sogar *in vivo* wiederholt werden können.

Beide Methoden wurden in dieser Arbeit angewendet. Die Primärkulturen aus Tumorgewebe wurden eingesetzt, um grundlegende Befunde wie die VEGF-Sekretion und Expression von Rezeptoren zu bestätigen. Dabei wurden nur sehr junge Subkulturen verwendet, um langsam entstehenden Kulturartefakten zuvorzukommen, und so möglichst die *in vivo* Situation der Zellen einzufangen. Die Kulturen wurden mittels Immunhistochemie auf verunreinigende Zellen, wie z. B. Mikroglia, untersucht und regelmäßig auf gliale Eigenschaften hin überprüft.

Alle Befunde wurden allerdings zuvor an den Zelllinien erhoben, da diese als Modell für native Gliomazellen dienen und auch in den nachfolgenden Experimenten eingesetzt werden sollten. Die verwendeten Gliomazelllinien U343 und U118 zeigten die typischen Eigenschaften von Zelllinien, wie hohe Teilungsrate und konstante Eigenschaften. Auch hier wurden, um zu verifizieren, dass sie ihre glialen Eigenschaften aufgrund zu langer Kultivierung nicht verlieren, regelmäßig immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt.

5.1.2 VEGF-Splicevarianten und –Regulation in Gliomazellen

Nachdem die Zelllinien bezüglich ihrer glialen Eigenschaften ein gutes Modell für *in-vivo*-Bedingungen zu sein schienen, wurde untersucht, ob die Zellen auch bezüglich ihrer VEGF-sezernierenden Eigenschaften den nativen Glioblastomazellen entsprechen.

Die Expression des VEGF in seinen produzierenden Zellen ist durch eine Vielzahl externer Faktoren reguliert. Faktoren, die sonst keinen direkten Einfluss auf Angiogenese haben, können diese durch Modulation der Expression von VEGF in bestimmten Zelltypen beeinflussen, und auf diese Weise einen angiogenetischen oder antiangiogenetischen Effekt erzielen. Solche Faktoren sind z.B. die Wachstumsfaktoren EGF (Epidermal growth factor), PDGF (Platelet derived growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor), wobei letzterer allerdings selbst zu den Angiogenesefaktoren zählt. IL-10 und IL-13 z.B. wirken hingegen inhibitorisch auf die VEGF-Sekretion. Neben Wachstumsfaktoren ist Hypoxie eine sehr häufige Ursache für die Erhöhung der VEGF-Sekretion (Shweiki et al., 1992), wie man z.B. in Retina, (Shima et al., 1995), oder auch an reinen Zellkulturen (Minchenko et al, 1994), beobachten konnte.

Eine Initiierung bzw. Erhöhung der Expression von VEGF geht immer mit der Verstärkung seiner angiogenetischen Wirkung einher. Aber neben der Menge an sezerniertem VEGF ist vor allem von Bedeutung, welche Formen des VEGF-A, also welche der fünf Splicevarianten (VEGF₁₂₁₋₂₀₆) sezerniert werden. Dieses ist gewebeabhängig. In den in dieser Arbeit eingesetzten Gliomazellen konnten jedesmal ausschließlich die Splicevarianten 121 und 165 nachgewiesen werden (Abschnitt 4.1.2.2). Dieses sind die am häufigsten in Tumoren vorkommenden Formen (Neufeld et al., 1996) und sie gelten als diejenigen mit dem höchsten angiogenetischen Potential. Sie sind frei diffusibel und haben keine bis kaum heparinbindenden Eigenschaften, begründet durch das Fehlen des Exons 6 (siehe Abbildung 9, S. 65). Auch in anderen Zellen sind das VEGF 121 und VEGF165 die am häufigsten vorkommenden Formen, häufig begleitet durch die Expression des VEGF 189. In bestimmten Zelltypen konnten fast alle Spliceformen nachgewiesen werden, so z. B. in neonatalen Fibroblasten die Splicevarianten VEGF 121, 165, 189 und 206 (Houck et al., 1991; Bacic et al., 1995). Die Splicevariante 145 bildet eine Ausnahme: Sie ist ausschließlich in nicht-malignem Gewebe zu finden und dort hauptsächlich in reproduktiven Organen des Erwachsenen, wie z. B. in der Placenta und

im Uterus (Poltorak et al., 1997; Charnock-Jones et al., 1993; Cheung et al., 1995). Sie spielt damit in der Onkologie oder bei Erkrankungen des Bewegungsapparates eine untergeordnete Rolle.

Die Expression des VEGF-Genes ist in verschiedenen Mechanismen reguliert. Neben Hypoxie spielen Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. In meiner Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass neben dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) auch der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) in der Lage ist, die VEGF-Sekretion um ein Vielfaches zu erhöhen (Mentlein et al., 2001). VEGF und bFGF sind sehr verwandt in ihren Eigenschaften. Beide haben mitogene und angiogenetische Effekte, unterscheiden sich jedoch dadurch, dass während das VEGF ganz spezifisch auf Endothelzellen wirkt, bFGF ein pleiotropher Faktor ist. Beiden ist dabei gemeinsam, dass sie auf die Angiogenese vor allem durch mitogene Effekte Einfluss nehmen.

Wir fragten uns deshalb, ob –genauso wie bFGF- auch VEGF Einfluss auf seine eigene Regulation nehmen könnte. Durch ELISA-Untersuchungen unter Zuhilfenahme spezifischer Rezeptoragonisten konnte allerdings ein solcher Einfluss in den Gliomazellen nicht nachgewiesen werden. Weder durch Aktivierung des VEGFR-1 (flt-1) mit seinem spezifischen Agonisten PlGF an den Gliomazellen U343 noch durch Stimulation des VEGFR-2 an U118-Zellen mit dem spezifischen Agonisten VEGF-D konnte eine Erhöhung der sezernierten Menge an VEGF-A festgestellt werden. Tatsächlich konnte auch von anderen Arbeitsgruppen ein Einfluss des VEGF auf seine eigene Sekretion bisher nicht festgestellt werden.

Dennoch ist unumstritten, dass andere Wachstumsfaktoren hier große Wirkung zeigen (Frank et al., 1995; Goldman et al., 1993; Brogi et al., 1994).

Den Mechanismus eines solchen Einflusses eines Cytokins auf die VEGF-Sekretion einer Zelle kann man sich auf vielerlei Arten vorstellen. Zunächst ist es möglich, dass eine Hochregulation allein durch das Initiieren einer Wachstumsfaktor-Signalkaskade erfolgt. Wie in Abbildung 28 dargestellt, erfolgt am Ende einer solchen Signalkaskade in der Regel eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. AP-1, Elk-1, etc. Diese Transkriptionsfaktoren sorgen dann entweder für die Expression neuer, spezifischer Transkriptionsfaktoren, oder stimulieren direkt die Transkription eines bestimmten Genes, wie z. B. VEGF. Durch diese nun mehr vorhandene mRNA erfolgt auch eine vermehrte

Translation und somit Produktion des VEGF-Proteins (Transkriptionskontrolle der Zelle). Weitere Möglichkeit des Einflusses besteht in der Erhöhung der Halbwertszeit der VEGF-mRNA (Abbau-Kontrolle), ein verändertes Spleißen des Primärtranskriptes, oder in der Bildung anderer spezifischer Proteine, die z.B. positiv auf den Translationsprozess des VEGF-Proteins- einwirken können. Um diese vielen Möglichkeiten des Regulationsmechanismus etwas eingrenzen zu können, wurde untersucht, ob sich der Einfluss des Wachstumsfktors EGF auf die vermehrte Sekretion von VEGF bereits auf transkriptioneller Ebene feststellen ließ. Mittels eines Northern Blots konnte in diesem Zusammenhang eindeutig ein erhöhtes Vorhandensein von VEGF-mRNA in mit EGF stimulierten U343-Zellen nachgewiesen werden. Eine gleichzeitige Gabe des inhibitorischen Neuropeptids Somatostatin konnte diesen Effekt hemmen. Diese Resultate bestätigten die schon vorher von meiner Arbeitsgruppe erhobenen ELISA-Befunde bezüglich der VEGF-Regulation in Gliomazellen (Mentlein et al., 2001). Zusätzlich kann man nun mit größerer Sicherheit davon ausgehen, dass die Erhöhung der VEGF-Produktion durch die Applikation von Wachstumsfaktoren ein gezielter Mechanismus der Tumorzelle ist.

5.1.3 Nachweis der VEGF-Rezeptoren

Die grundlegende Idee dieser Arbeit war, dass dieser Faktor nicht nur auf seine eigentlichen Zielzellen, die Endothelzellen, wirkt, sondern auch auf andere Zellen seines exprimierenden Gewebes, also auf die Tumorzellen selbst oder auf die infiltrierenden Mikrogliazellen. Voraussetzung für eine solche Wirkung ist das Vorhandensein spezifischer Bindungsstellen für das VEGF, der VEGF-Rezeptoren.

Die Expression der beiden VEGFR-Subtypen 1 und 2 wurde in der Literatur zunächst nur für Endothelzellen beschrieben. Inzwischen ist bekannt, dass auch einige andere Zelltypen beide, oder einen der beiden Rezeptoren exprimieren. So findet man den VEGFR-1 noch in trophoblastischen Zellen (Charnock-Jones et al., 1994), in Monozyten (Barleon et al., 1996) und in renalen Mesangiumzellen (Takahashi et al., 1995). Der VEGFR-2 hingegen ist noch in hämatopoietischen Stammzellen, Megakaryozyten, retinalen Progenitorzellen und Chondrozyten (Katoh et al., 1995; Yang und Cepko, 1996) zu finden. Zusätzlich ist das Vorhandensein von VEGFR-1 oder VEGFR-2 in verschiedenen Tumorzellen bekannt, wie z. B. Melanomzellen (Herold-Mende et al, 1999), Kaposi-Sarkoma-Zellen (Skobe et al,

1999) oder Prostata-Karzinoma-Zellen (Ferrer et al., 1999). Dass Tumoren des ZNS ebenfalls VEGF-Rezeptoren exprimieren, war bei Aufnahme dieser Arbeit nicht bekannt.

Zur Untersuchung von Gliomazellen wurden die zu verwendenden Gliomazelllinien (U343 und U118) und auch einige aus solide Tumoren kultivierte Gliomazellen auf die Expression der VEGFR-1 und -2 untersucht. Dies geschah mittels zweier unterschiedlicher Methoden. Zunächst konnte mittels RT-PCR das Vorhandensein spezifischer Transkripte des VEGFR-1 (U343, A764, 789 und 790) und des VEGFR-2 (U118, A776) in verschiedenen kultivierten Zellen und Zelllinien nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 11, S.69).

Diese Ergebnisse sollten bezüglich der Zelllinien mittels immunhistochemischer Färbungen nachvollzogen werden, um auch das Vorhandensein des vollständig exprimierten Rezeptorproteins zu demonstrieren. In diesen Färbungen wurden Antikörper verwendet, die das jeweilige VEGF-Rezeptorprotein spezifisch im intra- oder extrazellulären Bereich binden, und mittels einer nachfolgenden Immunreaktion sichtbar gemacht werden konnten. Ein entsprechender positiver Nachweis konnte im Falle der U343-Zellen für den VEGFR-1 und im Falle der U118-Zellen für den VEGFR-2 erfolgen. Sowohl mittels RT-PCR, als auch mit den immunhistochemischen Ergebnissen konnte somit eindrucksvoll das Vorhandensein zweier verschiedener VEGF-Rezeptoren an den Gliomazelllinien und auch an Gliomazellen einiger Tumoren nachgewiesen werden. Ein vergleichbares Ergebnis konnten Herold-Mende und Mitarbeiter 1999 publizieren. Sie untersuchten eine große Zahl verschiedener Tumorgewebe und Tumorzellkulturen und fanden unter anderem, dass zwei von vier untersuchten Gliomazelllinien den VEGFR-1 exprimierten, und in 6 von elf Gliomazellkulturen konnten sie den VEGFR-1 bzw. den VEGFR-2 nachweisen. Dabei erfolgten die Nachweise ebenfalls mittels RT-PCR oder immunhistochemischer Reaktionen.

Das Vorhandensein von VEGF-Rezeptoren an Glioblastoma- und anderen Tumorzellen mag in ihren Regulationswegen begründet sein. In vivo konnte nachgewiesen werden, dass wie auch beim VEGF, die Expression beider Rezeptoren durch Hypoxie hochreguliert wird, wenn auch auf unterschiedlichem Wege (TUDER et al., 1995, GERBER et al., 1997) Außerdem ist VEGF selbst auch in der Lage, die Expression seiner Rezeptoren hochzuregulieren. So wird z.B. in Endothelzellen in vitro durch VEGF sowohl der VEGFR-2 (Shen et al., 1998), als auch der VEGFR-1 (Barleon et al., 1997)

verstärkt exprimiert. Beide Faktoren, Hypoxie sowie das VEGF-Peptid, sind Charakteristika solider Tumoren und mögen deshalb -initiiierend oder nur unterstützend- auf die Expression der VEGFR einwirken.

Der Nachweis der VEGF-Rezeptoren in Gliomazellen ist somit eindrucksvoll gelungen, ohne jedoch Aussagen über ihre Funktionalität machen zu können. Dieses wurde in den nachfolgenden Experimenten hinsichtlich möglicher autokriner Effekte des VEGF durchgeführt.

5.1.4 Autokrine Effekte des VEGF

Die Wirkungen und Effekte des VEGF, die durch seine Rezeptoren vermittelt werden, sind in vielen Studien an verschiedenen Zelltypen untersucht und beschrieben worden. Nachdem die VEGF-Rezeptoren ursprünglich als Endothelzell-spezifisch galten, wurden hauptsächlich endotheliale Zellen bezüglich ihrer Funktion und vermittelten Effekte untersucht. Zunächst zeigte ein Ausschalten der Gene bereits im embryonalen Stadium („gene-Targeting“) im Mausmodell, dass ein Fehlen von nur einem der beiden Rezeptoren zum Tode des murinen Embryos führte, hervorgerufen durch Defekte in Angiogenese und Vaskulogenese. (Shalaby et al., 1995; Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Beide Rezeptoren sind also essentiell für den Organismus und auch funktionell aktiv. Speziellere Studien zeigten dann, dass endotheliale Zellen nach Transfektion mit einem Plasmid, das für den VEGFR-2 kodiert, mitogen und chemotaktisch auf VEGF reagieren. Transfiziert man dieselben Zellen mit einem Plasmid für den VEGFR-1, so bleiben diese Reaktionen aus (Waltenberger et al., 1994; Seetharam et al., 1995). Andere Arbeitsgruppen hingegen konnten einen über den VEGFR-1 vermittelten chemotaktischen Effekt nachweisen (Waltenberger et al., 1994). Übereinstimmend werden dem VEGFR-2 (KDR/ flk-1) die mitogenen Effekte des VEGF zugeschrieben. Gerber et al. (1998) fanden außerdem heraus, dass der VEGFR-2 antiapoptotische Signale in transfizierten murinen Fibroblasten vermitteln kann.

Die beiden in den Zelllinien nachgewiesenen Spliceformen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ werden –zusammen mit dem VEGF₁₈₉- für die proliferative Wirkung des VEGF auf Endothelzellen verantwortlich gemacht (Houck et al., 1991). Die Vermutung, dass sie

deshalb auch die Proliferation von Tumorzellen beeinflussen können, welche die VEGF-Rezeptoren exprimieren, lag nahe, und wurde in dieser Arbeit untersucht. Dabei konnte weder an den VEGFR-1 noch den VEGFR-2 exprimierenden Zellen ein proliferativer Einfluss festgestellt werden (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Bei Literaturvergleich war dieses Ergebnis für die den VEGFR-1 exprimierenden U343-Zellen zu erwarten gewesen. Die Mehrheit der publizierten Arbeiten schreiben die proliferativen Wirkungen des VEGF ausschließlich dem VEGFR-2 zu. (Waltenberger et al., 1994; Zachary et al., 2001, Ferrara, 1999). Ein mitogener Einfluss des VEGFR-1 konnte bislang nie nachgewiesen werden. Vielmehr geht man im allgemeinen davon aus, dass der VEGFR-1 negativ regulierend auf die Proliferation einwirkt, und zwar in der Art, dass er durch Bindung von VEGF dieses dem VEGFR-2 vorenthält, und somit kein mitogenes Signal gesendet werden kann. An U118-Zellen ist der VEGFR-2 exprimiert, aber dennoch konnte kein positiver Effekt des VEGF auf diese Zellen festgestellt werden. Der proliferative Effekt des VEGF wurde hauptsächlich an Endothelzellen beschrieben, die ja sowohl den VEGFR-1 als auch den VEGFR-2 exprimieren. Es ist vorstellbar, dass der VEGFR-2 und der VEGFR-1 gemeinsam wirken. So fanden Waltenberger et al. (1994) heraus, dass während der VEGFR-2 in seiner Gesamtheit essentiell ist, vom VEGFR-1 hauptsächlich die extrazelluläre, VEGF-bindende Domäne von Bedeutung zu sein scheint. Während nämlich ein transgenes Tier, das vollständig defizient für den VEGFR-1 ist, bereits im embryonalen Stadium zu Grunde geht, ist ein Tier, bei dem lediglich die Tyrosinkinasedomäne des VEGFR-1 entfernt wurde, überlebensfähig. Diese Befunde stützten die bereits oben erwähnte Theorie, dass der VEGFR-1 das VEGF lediglich für den VEGFR-2 „bereithält“. Denkbar ist auch, dass die Rezeptoren Heterodimere bilden müssen, um auf diese Weise ganz spezielle Signale transduzieren zu können, wie z. B. ein mitogenes Signal.

Nachdem bislang keine Effekte des VEGF auf die Gliomazellen festgestellt werden konnten, sollte durch Untersuchung intrazellulärer Signalsequenzen überprüft werden, ob ein eventuell durch Bindung von VEGF initiiertes Signal in der Zelle transduziert, oder inhibiert wird.

5.1.5 VEGF-Signaltransduktion

Die überwiegende Anzahl der bisher zitierten Untersuchungen zu Effekten des VEGF und seiner Rezeptoren wurden an transfizierten endothelialen Zellen durchgeführt. Effekte an anderen Zellarten sind wenig erforscht. Zusätzlich ist nicht vollständig bekannt, welche intrazellulären Prozesse diesen vorausgehen, und auch hier gibt es nahezu ausschließlich Untersuchungen an Endothelzellen.

Man konnte z. B. in Endothelzellen aus der Rinderaorta nach Stimulation mit VEGF die Phosphorylierungen von mindestens 11 verschiedenen Proteinen nachweisen (Guo et al., 1995). Die sich daran anschließenden Effekte und Wirkungen der beiden Rezeptoren sind unterschiedlich und teilweise widersprüchlich, wie vielfältige Studien zeigen. In humanen Endothelzellen (HUVEC) konnten Blum et al. 2001 einen aktivierenden Einfluss des VEGF auf die MAP-Kinasen p38 und ERK-1/ -2 (extrazellulär signal regulated Kinase 1 / 2) feststellen, fanden aber gleichzeitig einen inhibierenden Einfluss auf den PI3-Kinase-Weg. Eine Aktivierung der ERK fanden auch Landgren et al (1998) für den VEGFR-1 und Takahashi und Shibuya (1997) für den VEGFR-2. Die Ergebnisse von Seetharam et al. (1995) hingegen, können die Aktivierung durch den VEGFR-1 nicht bestätigen, sie stellten stattdessen einen Einfluss auf die Phospholipase C fest.

ERK und p38 sind Vertreter der sogenannten MAP-Kinasen (Mitogen aktivierte Kinasen), Signalmolekülen, die häufig an der Transduktion von Signalen von Tyrosinkinaserzeptoren beteiligt sind. Abbildung 28 zeigt schematisch einen solchen Signaltransduktionsweg, ausgehend von einem Tyrosinkinaserzeptor und unter Beteiligung der MAP-Kinase ERK:

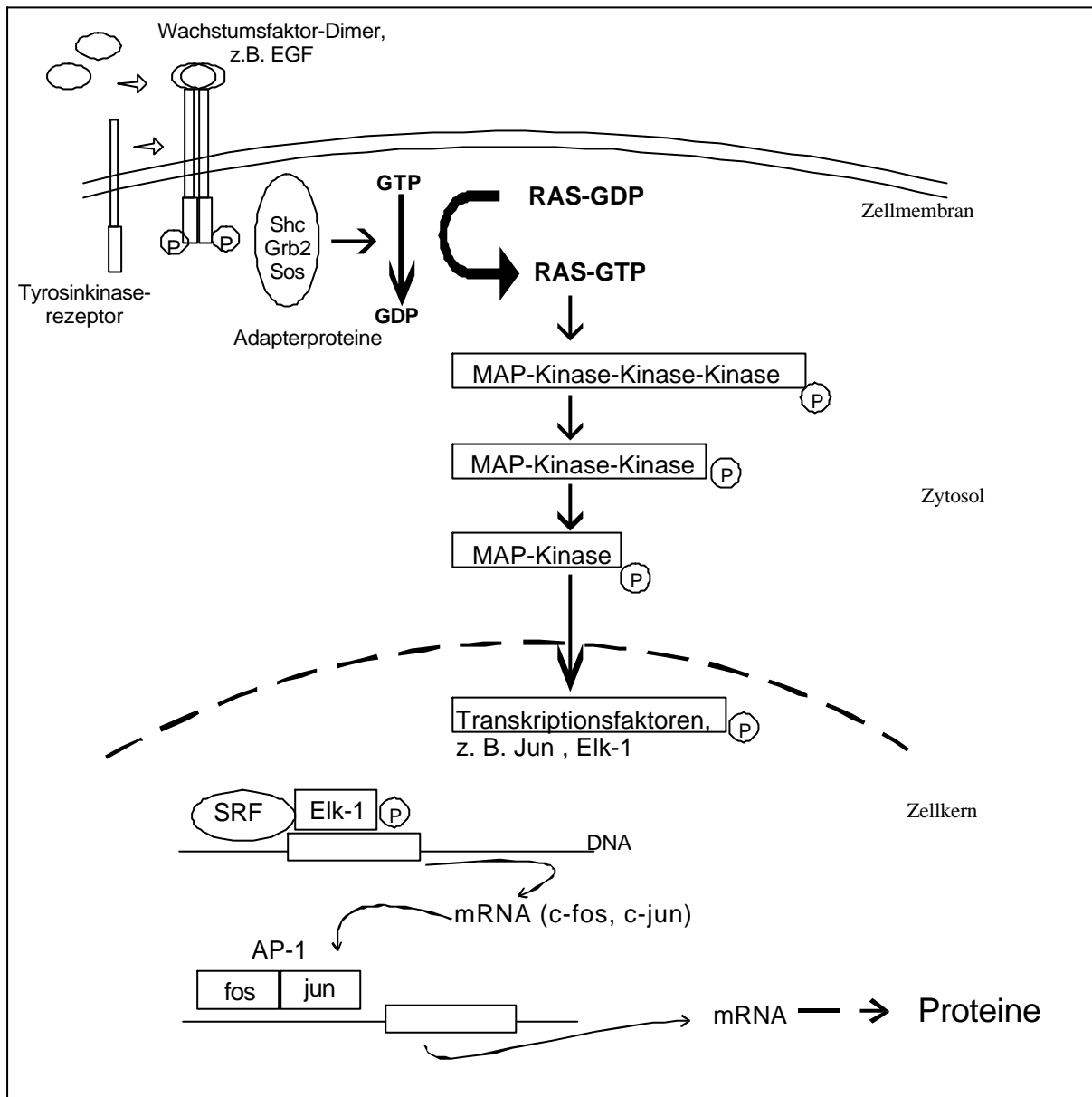


Abb. 28: Darstellung einer typischen Signalkaskade von Tyrosinkinase-Rezeptoren

Durch Bindung eines Wachstumsfaktor-Dimers, dimerisieren die Rezeptoren und phosphorylieren sich daraufhin gegenseitig im intrazellulären Bereich. Diese Phosphorylierung aktiviert nun sogenannte Adapterproteine, wie z. B. „Shc“, die ihrerseits das Phosphorylierungssignal weitergeben durch eine Kette von Signalmolekülen. Eine wichtige Funktion in dieser Kaskade spielen die MAP-Kinasen (z. B. die ERK1/2, bzw. „Extracellular signal regulated kinase“ 1/ 2). Sie sind in der Lage, das Phosphorylierungssignal in den Zellkern „weiterzutragen“ und dort die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu initiieren. Transkriptionsfaktoren, wie z.B. „Elk-1“ sorgen

daraufhin für die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren (z.B. fos und jun, bzw. AP-1), die dann wiederum die Transkription spezifischer Gene, wie z. B. des VEGF bewirken. Neben ERK1/ 2 gibt es noch weitere MAP-Kinasen, die in vergleichbaren Kaskaden wirken. Abbildung 29 zeigt noch zwei weitere typische Signalwege.

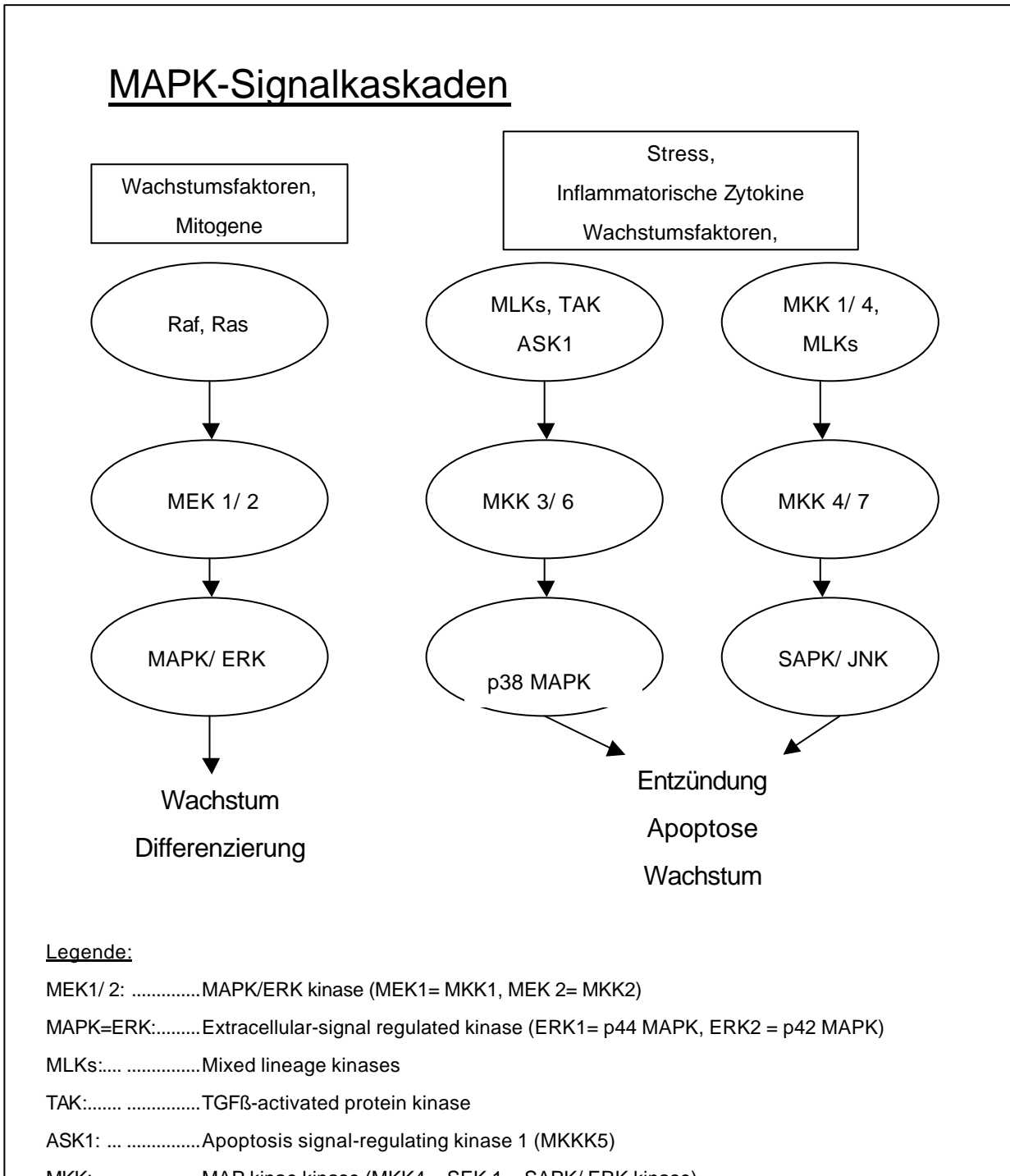


Abb. 29: Skizzierung der drei „klassischen“ MAP-Kinase-Signalkaskaden

Die darin wirkenden MAP-Kinasen sind, neben ERK, die Kinasen „p38“ und „SAPK/JNK“ (=stress activated protein kinase/ cjun amino terminal kinase). Auch sie werden in der Regel innerhalb einer durch extrazellulären Stimulus, wie Wachstumsfaktoren oder Stress initiierten Signalkaskade aktiviert, in der ein Phosphorylierungssignal durch andere Kinasen (z.B. MEK, MLK, etc.) zu ihnen „befördert“ wird.

Man kann die Initiierung und den Fortgang einer solchen Signalkaskade auf jeder in Abbildung 28 bzw. 29 angedeuteten Stufe überprüfen. Mit Hilfe von Antikörpern, die gegen den phosphorylierten Abschnitt des jeweiligen Signalmoleküls gerichtet sind, kann im Western-Blot-Verfahren deren Aktivierung untersucht und quantifiziert werden.

Auf diese Weise konnte ich zeigen, dass in den U343-Zellen eine Phosphorylierung des VEGFR-1 nach VEGF-Applikation erfolgte. Bei der Überprüfung der MAP-Kinasen ERK und p38 konnte keine Effekte festgestellt werden. Dieselben Untersuchungen in den U118-Zellen brachten ebenfalls kein Ergebnis hervor. Dennoch sollte zusätzlich überprüft werden, ob ein Effekt auf Transkriptionsfaktoren zu verzeichnen war. Die hierfür durchgeführten Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) zeigten ebenfalls keinen aktivierenden Einfluss des VEGF auf Gliomazellen.

Diese Untersuchungen der Signalkaskaden bestätigen die Ergebnisse bezüglich Regulation und Proliferation. Das VEGF scheint keinen Einfluss auf seine produzierenden Zellen, die Gliomazellen zu haben. Obwohl –übereinstimmend mit der Literatur (Herold-Mende et al., 1999)- beide VEGF-Rezeptoren an den hier untersuchten Gliomazellen nachgewiesen werden konnten, sind sie offensichtlich nicht funktionell aktiv. Die übereinstimmend in der Literatur festgestellte mitogene Wirkung des VEGFR-2 konnte nicht nachvollzogen werden. Ein möglicher Grund dafür ist, dass alle bisher erhobenen Befunde an transfizierten Zellen erhoben wurden. Transfizierte Zellen enthalten das entsprechende Protein meist in sehr hoher, in der Natur kaum vorkommender Menge. Daher kann es sein, dass in Zellen mit „natürlicher“ Expression ein transduziertes Signal zu schwach ist, und deshalb nicht nachgewiesen werden kann. Außerdem stammen die bisherigen Erkenntnisse über die Signaltransduktion des VEGF nahezu ausschließlich aus endothelialen Zellen. Die Eigenschaften bezüglich Stoffwechsel und Signaltransduktion variieren von Zelltyp zu Zelltyp, weshalb auch die Effekte eines Zytokins an Gliomazellen und Endothelzellen nicht identisch sein müssen. Hinzu kommt, dass Gliomazellen eine Vielzahl von Mutationen enthalten. Solche Mutationen könnten zum

einen Signalmoleküle jedweder Art betreffen, wodurch eine initiierte Kaskade inhibiert werden könnte. Zum anderen könnten die nachgewiesenen Rezeptoren selbst mutiert und dadurch nicht mehr funktionell aktiv sein.

Um vollständigen Aufschluss über die Ursachen für das Nicht-Vorhandensein von VEGF-Effekten an Gliomazellen zu erhalten müsste man eine Vielzahl weiterer Untersuchungen durchführen. Man müsste zunächst die exprimierten Rezeptoren sequenzieren um dann weitere Signalmoleküle zu überprüfen.

Zunächst sollte aber untersucht werden, ob auch andere, den Tumor aufbauende Zellen VEGF-Rezeptoren exprimieren, und somit Zielzellen für das VEGF darstellen können. Deshalb wurden Effekte des VEGF an Mikrogliazellen untersucht.

5.2 Mikrogliazellen

In Gliomen finden sich neben Glioma- und Endothelzellen und vor allem Zellen der Mikroglia/ Makrophagen –Linie neben einzelnen Neuronen.

Mikrogliazellen sind eine Art differenzierter Makrophagen und repräsentieren die immunkompetenten Zellen des Gehirns. Man findet Anhäufungen von Makrophagen in beinahe jeder Erkrankung des ZNS, so auch bei den Gliomen. So fanden Shinonga et al. 1988 und noch einige weitere Autoren (Übersicht: Badie und Schartner, 2001), dass durchschnittlich 48% Mikroglia/Makrophagen in Glioblastomen zu finden sind. Paulus et al. (1992) konnten dies spezifizieren. Sie fanden durch Untersuchungen an 72 soliden Gliomen heraus, dass neben wenigen Makrophagen des Gehirns und perivaskulären Makrophagen eine bedeutende Menge ruhender ramifizierter und amöboider aktivierter Mikrogliazellen in den Tumoren zu finden waren. Darüberhinaus stellten sie fest, dass bei steigendem Malignitätsgrad auch die Gesamtzahl der Mikroglia anstieg. Die exakte Quelle der Mikroglia in dem Tumor bleibt unbekannt. Viele aktuelle Arbeiten lassen vermuten, dass ein aktiver Prozess der Tumor-Zellen Ursache für die massive Präsenz der Mikrogliazellen im Tumorgewebe sein muss (Badie und Shartner, 2001). Die Vermutung liegt nahe, dass die Tumorzellen teilhaben könnten an Aktivierung, Migration und sogar Zellteilung der Mikrogliazellen. Die Frage, ob das von den Gliomen sezernierte VEGF in diesen Prozess eingebunden sein könnte, sollte in dem zweiten Teil dieser Arbeit beantwortet werden.

Um obenstehende Fragen untersuchen zu können, wurden Mikrogliazellen in Kultur genommen. Aus bereits erörterten Gründen (siehe Abschnitt 5.1.1) sollten die Experimente hauptsächlich an einer Zelllinie durchgeführt werden. Mir stand die murine Zelllinie BV-2 zur Verfügung, die auch für sämtliche durchgeführten Versuche eingesetzt wurde.

5.2.1 Nachweis der VEGF-Rezeptoren

Es sollte überprüft werden, ob das von den Gliomazellen sezernierte VEGF einen parakrinen Effekt auf die den Tumor üblicherweise infiltrierenden Mikrogliazellen haben kann und somit, ob er für ihre Infiltration in das Tumorgewebe verantwortlich gemacht werden kann. Dazu wurde zunächst überprüft, ob Bindungsstellen für das VEGF, also VEGF-Rezeptoren von den Mikrogliazellen exprimiert werden.

Die Expression der VEGF-Rezeptoren wurde mit Hilfe zweier verschiedener Methoden untersucht: (1) mittels RT-PCR sollte zunächst überprüft werden, ob Transkripte von VEGF-Rezeptor-mRNA in den Mikrogliazellen nachzuweisen waren. Mittels für das Maus-VEGF-Gen spezifische Primer konnte nachgewiesen werden, dass ausschließlich das für den VEGFR-1 kodierende Gen in den Maus-Mikroglia transkribiert wird, nicht jedoch mRNA für den VEGFR-2. Um die Relevanz dieses Ergebnisses für *in vivo* Bedingungen zu bestätigen, wurde dieses Experiment an mRNA von frisch isolierten Mikroglia junger Wistarratten (postnatal Tag 3-6) wiederholt. Die Isolierung dieser Mikroglia erfolgte nach einer speziellen Methode (Giulian und Baker, 1986; Gerbicke-Haerter et al., 1989), die eine mehr als 98% reine Mikroglia-Kultur hervorbringt. Bevor die Zellen für eine RNA-Präparation und anschließende RT-PCR eingesetzt wurden, wurde ihre Reinheit durch eine immunhistochemische Reaktion gegen Mikroglia-spezifische Marker überprüft. Die PCR zur Untersuchung der Expression von VEGF-Rezeptoren erfolgte mit Primern, die spezifisch die jeweiligen Ratten-Gene codieren. Die PCR-Bedingungen wurden zuvor an cDNA Ratten-Lungengewebe optimiert. Das Ergebnis der PCR bestätigte die Befunde der Zelllinie. Auch die nativen Ratten-Mikrogliazellen exprimieren ausschließlich den VEGFR-1 (flt-1). Eine Expression des VEGFR-2 wurde ebenfalls überprüft und konnte in keinem Fall in den Mikrogliazellen nachgewiesen werden.

Um das Ergebnis der VEGFR-1-Expression an Mikrogliazellen zu verifizieren wurde ein zweite Methode hinzugezogen. Ebenso wie bei den Untersuchungen an den Gliomazellen, sollte mit Hilfe einer immunhistochemischen Reaktion die Expression des VEGFR-1-Proteins nachvollzogen werden, nachdem ja eine RT-PCR lediglich ein Transkript, nicht aber ein vollständig exprimiertes Protein nachweist. Die immunhistochemische

Untersuchung erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen das humane Rezeptorprotein flt-1 (VEGFR-1) gerichtet ist. Laut Angaben des Herstellers sollte er mit Ratten- und Maus-Analoga kreuzreagieren, und tatsächlich konnte eine positive Reaktion auf den VEGFR-1 verzeichnet werden.

Sowohl die RT-PCR als auch die Immunhistochemie bewiesen also eindeutig die Expression des VEGFR-1 an Mikrogliazellen. Die zusätzliche Untersuchung an den nativen Mikroglia aus Rattengehirnen bestätigte die Vermutung, dass auch *in vivo* die Expression des Rezeptors zu finden ist.

Eine Expression des VEGFR-1 in Mikrogliazellen ist bisher nicht beschrieben worden, allerdings fanden andere Arbeitsgruppen ihn zuvor schon in anderen Vertretern der Monozyten-Familie, wie in Makrophagen (Hiratsuka, 1998) und in Dendritischen Zellen (Oyama, 1998). Barleon et al identifizierten den VEGFR-1 als erste in Monozyten selbst (1996). Diese Arbeitsgruppe konnte auch nachweisen, dass der Rezeptor in den Zellen funktionell aktiv ist und dies nach Disposition von VEGF über den VEGFR-1 zur Migration angeregt werden können.

Die Migration ist die einzige Funktion die dem VEGFR-1 übereinstimmend zugeschrieben wird. Neben Barleon et al. (1996) konnten auch Hiratsuka (1998) dies in einer beeindruckenden Untersuchung belegen, die die von VEGF vermittelte Migration von Makrophagen in flt1 - defizienten Mäusen vermissen ließ.

Auf Grund dieser Ergebnisse erschien es sinnvoll, die Funktionalität des VEGFR-1 in den kultivierten Mikrogliazellen zu untersuchen.

5.2.2 Funktionelle Effekte des VEGF auf Mikrogliazellen

Stellt man nun Überlegungen an, welche Funktionen der VEGFR an Mikrogliazellen übernehmen kann, so drängen sich zwei Punkte auf.

Zum einen ist Chemotaxis eine für Monozyten typische Fähigkeit. Auch Mikrogliazellen, als Monozyten-Abkömmlinge, werden im Allgemeinen von Wachstumsfaktoren und Chemokinen im Gehirn zur Migration angeregt (Nolte et al., 1997, Peterson et al, 1997). Schon 1989 konnte ein Chemokin der C-C-Familie aus einer Gliomazelllinie isoliert werden, dass chemotaktisch und aktivierend auf Monozyten wirkt (Yoshimura et al. 1989).

Es wird als „monocyte chemotactic protein“ (MCP-1) bezeichnet und wird als verantwortlich gemacht für die Infiltration von Monozyten in Tumorgewebe. Tatsächlich gibt es einen positiven Zusammenhang zwischen der Stärke der MCP-1-Expression und der Anzahl der infiltrierenden Makrophagen innerhalb eines Tumors (Leung et al., 1997). Ein ebensolcher Effekt des auf Mikrogliazellen liegt nahe, konnte aber durch Experimente von Badie et al. (1999) nahezu ausgeschlossen werden, die durch einen MCP-1-neutralisierenden Antikörper den chemotaktischen Effekt von Gliomazellen auf Mikroglia nicht inhibieren konnten. Ein anderer von Gliomen sezernierter Faktor muss also für die Migration verantwortlich sein. Da VEGF, vermittelt durch den VEGFR-1, chemotaktische Eigenschaften hat, die auch schon für Monozyten nachgewiesen wurden, lag es nahe, diese für die Mikrogliazellen zu überprüfen.

Zum anderen scheint aber die Chemotaxis nicht allein die Ursache für das massive Vorhandensein von Mikroglia-Infiltraten in nativen Tumoren zu sein. So konnten Badie et al. (2000) ein ausgeprägtes Zellteilungsverhalten von Mikrogliazellen in Ratten-Tumorgewebe nachweisen und vermuteten dafür einen von den Gliomazellen sezerniertes Cytokin als verantwortlichen Faktor.

In dieser Arbeit wurden deshalb diese beiden möglichen Einflüsse des VEGF, diejenigen auf das proliferative Verhalten der Mikroglia zum einen und die auf ihre Migration zum anderen, überprüft. Tatsächlich konnte beiden Fällen ein Effekt des VEGF verzeichnet werden. Nach zweitägiger Stimulation mit murinem rekombinanten VEGF zeigten die Mikrogliazellen ein signifikant erhöhtes Zellteilungsverhalten (Abschnitt 4.3.4.1). Es war mit dem durch den mitogenen Faktor IL-3, einem bekannten Mitogen für Monozyten (Chen und Clark, 1986), herbeigeführten Wachstumsverhalten vergleichbar.

Ebenso konnte ein Effekt auf das Wanderungsverhalten der Zellen mit Hilfe eines Chemotaxis-Assays festgestellt werden. Dieser, durchgeführt in einer Chemotaxiskammer nach Boyden, zeigte einen deutlich positiven Einfluss auf die Migration der Mikroglia.

Dieses zweite Ergebnis fügt sich gut in die Ergebnisse anderer Publikationen ein. Ebenso wie bei Monozyten induziert VEGF die Wanderung von Mikrogliazellen, und auch hier offensichtlich vermittelt durch den VEGF-Rezeptor 1. Dabei war schon vorher vermutet worden, dass Monozyten, Makrophagen und Mikroglia ein verschiedenens Wanderungsverhalten aufzeigen mussten.

Das Ergebnis des Proliferationstestes allerdings ist neu. Zwar ist VEGF ein klassischer Wachstumsfaktor, der über seine Tyrosinkinase-Rezeptoren proliferierend wirkt, jedoch wurde seine mitogene Wirkung bisher nur an Endothelzellen beschrieben (Waltenberger et al., 1994, Albini et al., 1996)). Zusätzlich war man bisher der Auffassung, dass diese mitogene Wirkung ausschließlich über den VEGFR-2 vermittelt wird (Ferrara, 1999). Lediglich Landgren et al. (1998) konnten einen mitogenen Effekt des VEGFR-1 nachweisen, vermittelt durch seinen Agonisten PlGF.

Um nun die Wirkungsweise des VEGFR-1 an den Mikrogliazellen näher zu beleuchten, wurden Studien über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden durchgeführt.

5.2.3 Signaltransduktion

Bei der Überprüfung der intrazellulären Effekte des VEGF an Mikrogliazellen wurde auf eine Überprüfung der Autophosphorylierung des Rezeptors verzichtet, da ja bereits funktionelle Effekte zu beobachten waren. Vielmehr sollte die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden überprüft werden. Zum einen war natürlich, wie auch schon bei den Gliomazellen, der klassische Signalweg der Tyrosinkinase-Rezeptoren, um den es sich ja bei VEGFR-1 handelt, zu überprüfen (siehe die Ausführungen in Abschnitt 3.1.5). Hier sollte die Überprüfung der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 Aufschluss über die Aktivierung dieses Signalweges geben. Außerdem sollte die Phosphorylierung der p38-Kinase geprüft werden, die ebenfalls zu den häufig in Tyrosinkinase-Rezeptor-Signalkaskaden involvierten MAP-Kinasen gehört (siehe Abb. 28). Die Kinase „SAPK/JNK“ (siehe Abb. 29) wurde nicht untersucht, weil sie üblicherweise hauptsächlich durch Stress, und weniger durch Cytokine aktiviert wird (Kyriakis et al., 1995). In der Literatur findet man bezüglich der über den VEGFR-1 vermittelten Aktivierung von MAP-Kinasen widersprüchliche Angaben. Während Landgren et al. (1998) eine starke Aktivierung der ERK, vermittelt durch flt-1 (VEGFR-1) feststellen konnten, verzeichneten Seetharam et al. (1995) lediglich eine sehr schwache Induktion eben dieser Kinase, hingegen eine deutliche Aktivierung der PLC (Phospholipase C). Waltenberger et al. fanden keinerlei Aktivierung von MAP-Kinasen in mit dem VEGFR-1 transfizierten Endothelzellen.

Aufgrund von Veröffentlichungen von Cunningham et al. (1995) und Gerber et al. (1998), die einen Einfluss beider VEGF-Rezeptoren (1 und 2) auf den PI3-Kinase/Akt-Signalweg aufzeigten, sollte auch eine mögliche Aktivierung dieses Signalweges überprüft werden. Der Signalweg der Akt-Kinase (auch: Proteinkinase B oder PKB) ist eng verwandt mit dem in Abbildung 2 beschriebenen Signalweg der MAP-Kinasen. Die PI3-Kinase bindet mit ihrer p85- Untereinheit an einen Tyrosinkinase-rezeptor und überträgt die Phosphorylierung auf membranassoziierte Kinasen, wie z.B. die PDK1/2, PDK („3-phosphoinositide-dependent protein kinase) und Akt. Akt gibt dann von der Zellmembran aus die Phosphorylierung weiter an cytosolische Kinasen (z. B. GSK3, einer ubiquitär exprimierten Serin/ Threonin-Kinase, siehe z. B. LIT), vergleichbar mit den MAP-Kinasen in obigem Schaubild. Anders als in Abbildung 2 allerdings, in der ein mitogener Signalweg dargestellt ist, inhibiert die Akt-Aktivierung häufig den programmierten Zelltod, die Apoptose, und wirkt somit nur indirekt aktivierend auf die Zellen (siehe Abb. 30).

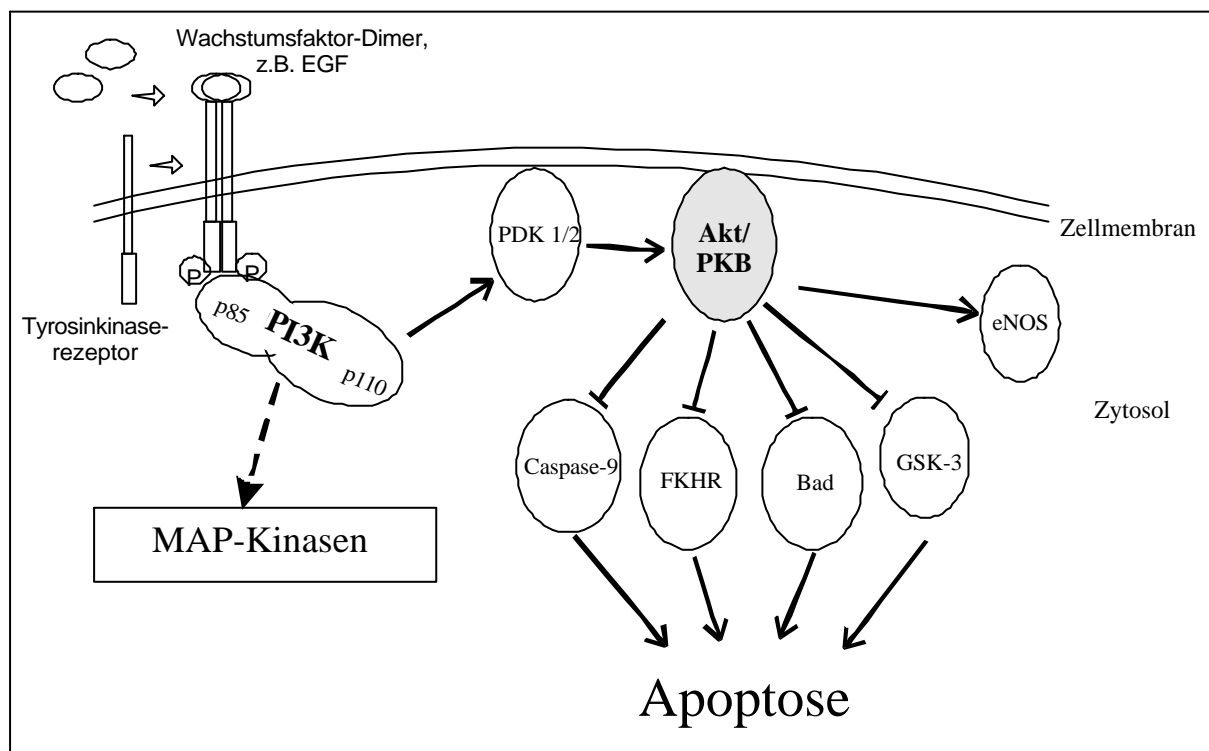


Abb. 30: Darstellung des PI3-Kinase/ PKB-Signalweges

Die Überprüfung aller Signalwege erfolgte mit der Western-Blot-Methode (siehe Abschnitt 4.3.4.3). Es konnte jedoch keine Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK oder p38 nachvollzogen werden. Offensichtlich werden diese Signalwege auch in Mikrogliazellen

über den VEGFR-1 nicht aktiviert. Allerdings gelang es, einen Einfluss auf den PI3-Kinase-Signalweg zu zeigen (siehe Abschnitt 4.3.4.3.2). Nach Applikation von 10ng/ ml VEGF für verschiedene Zeiten, konnte mehrfach eine Inhibierung der Kinase „Akt“ bewiesen werden.

Verglichen mit den Ergebnissen der Proliferations- und Migrations-Assays, in denen eine Aktivierung der Zellen durch VEGF zu beobachten war, erscheint dies erstaunlich. Kann die Inhibierung eines Signalweges zu einer erhöhten Aktivität führen? Der Akt-Signalweg beschreitet in manchen Zellen tatsächlich einen inhibierenden Zweig, allerdings in der Weise, dass sie durch Phosphorylierung bestimmter Proteine, wie „Bad“ und „Caspase 9“, die durch sie induzierte Apoptose verhindern kann und somit als Überlebensfaktor gilt (Brunet et al., 1999). Der PI3-Kinase/ Akt-Signalweg gilt als einer von vielen Signalwegen, die unterhalb von Wachstumsfaktorrezeptoren ablaufen könnten, wie z. B. auch die die Ras/ Raf/ MEK/ ERK- oder die IKK/ NF κ B-Kaskade (siehe auch Abb. 28, 29). Bis vor kurzem glaubte man, dass alle diese Wege als isolierte Vorgänge zu betrachten sind, wie in Abbildung 31, A angedeutet.

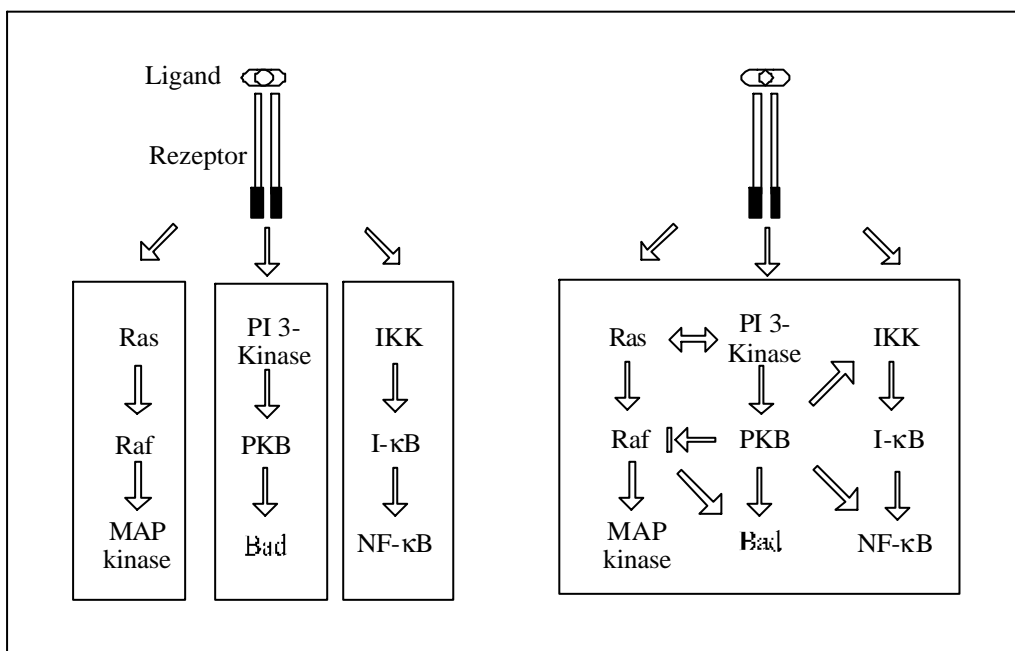


Abb.31: Darstellung einiger von Wachstumsfaktoren initiierten Signalkaskaden. A) Man vermutete ursprünglich, dass diese Kaskaden isoliert ablaufen. B) Heute hat man Kenntnis über vielfältige Verzweigungen der Kaskade, hier unter besonderer Berücksichtigung der Kinase Akt/ PKB

Neueren Publikationen zufolge ist es aber wahrscheinlich, dass alle Signalwege miteinander interagieren. So konnten Zimmermann et al. (1999) beobachten, dass in humanen Brust-Krebs-Zellen eine Interaktion zwischen den einzelnen Kaskaden stattfindet. Dabei phosphoryliert Akt die Kinase Raf und verhinderte damit eine Aktivierung der Raf/ MEK/ ERK-Kaskade und konnte somit die Zellantwort von Zellzyklusarrest auf Proliferation umschalten. Eine ähnliche Interaktion von Akt auch mit anderen Signalwegen konnten auch andere Arbeitsgruppen beobachten (Rommel et al., 1999, Romashkova et al., 1999), sie sind in Abbildung 4B zusammengefasst dargestellt. Um also die durch VEGF herbeigeführte Inhibierung der Kinase Akt in Mikroglia genau interpretieren zu können, müsste eine Überprüfung weiterer Signalmoleküle erfolgen, wie z. B. Raf oder IKK. In jedem Fall konnte ein eindeutiger Einfluss des VEGF auf die Signaltransduktion in Mikrogliazellen gezeigt werden, der gleichzeitig die weitläufig vermutete Assoziation des VEGFR-1 mit der PI3-Kinase bestätigen konnte.

Die Ergebnisse bezüglich der Mikrogliazellen sind beeindruckend. Zum ersten Mal konnte die Expression eines VEGF-Rezeptors an Mikrogliazellen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte seine Funktionalität und Wirkung mit Hilfe eines Chemotaxis-Assays gezeigt werden. Verglichen mit der Literatur liegt die Vermutung nahe, dass der VEGFR-1 ein möglicher Verursacher der Infiltration von Mikrogliazellen in Tumorgewebe sein kann. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass mit steigender Malignität von Gliomen gesteigerte Produktion von VEGF und auch vermehrtes Vorhandensein von Mikrogliazellen innerhalb des Tumors zu finden ist. Vielleicht liegt ein ähnlicher Zusammenhang vor, wie er von Leung et al. (1997) für das von Gliomen produzierte Chemokin MCP-1 und die massive Makrophageninfiltration in Tumoren festgestellt wurde. Ein gleichzeitiger proliferativer Einfluss des VEGF ist ebenfalls wahrscheinlich.

Obwohl die Gliomazellen offensichtlich aktiv unter Vermittlung von VEGF die Mikrogliazellen anlocken, ist der Grund hierfür schwer zu erkennen. Schließlich sind sie eigentlich immunkompetente Zellen und daher eher als Gefahr für die Tumorzellen zu sehen. Eine mögliche Erklärung ist, dass das ZNS durch Rekrutierung der Mikroglia versucht, die neoplastischen Tumorzellen zu zerstören. Da dies offensichtlich nicht gelingt, denn es ist keinerlei Abwehr der Tumorzellen zu erkennen sondern vielmehr ein fortgesetztes Wachstum derselben, muss eine Inaktivierung der Mikrogliazellen durch die

Gliomazellen erfolgen. Ist das VEGF und der gemeinhin als inhibitorisch wirksam geltender Rezeptor flt-1 (VEGFR-1) für diesen Effekt verantwortlich? Die inhibitorischen Effekte des VEGF auf die PKB sprächen für diese Theorie.

Eine andere Erklärung für die massive Mikroglia-Infiltration in den Tumoren könnte so begründet werden, dass der Tumor selbst- und nicht das ZNS- die Mikroglia aktiv anlockt, um sich durch deren Fähigkeit bezüglich Sekretion einer Vielzahl von mitogenen Cytokinen einen Wachstumsvorteil zu verschaffen. Auch hier wäre ein Rolle des VEGF als Chemokin und Mitogen durchaus denkbar.

6 Zusammenfassung

VEGF ist ein Glykopeptid, dessen Wirkung bislang auf Endothelzellen eingegrenzt wurde, in denen VEGF mitogene und chemotaktische Effekte hervorruft. Diese Wirkungen werden dabei über zwei Rezeptoren vermittelt, den VEGFR-1 (flt-1) und den VEGFR-2 (KDR/ flk-1). VEGF wirkt vorwiegend im embryonalen Stadium eines Individuums, wird aber in pathologischen Prozessen, wie in Tumoren, reexprimiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden auto- und parakrine Effekte des Angiogenesefaktors VEGF in den hochmalignen Gehirntumoren Glioblastoma multiforme *in vitro* untersucht. Der Fokus lag dabei auf den Tumorzellen selbst, den Gliomazellen, und den immunkompetenten Zellen des ZNS, den Mikrogliazellen, die sich in hohem Anteil in den Gliomen finden.

Im Gegensatz zu nicht-malignen Gliazellen sezernieren Gliome VEGF, welches Endothelzellen anlockt und die neuen Blutgefäße induziert. Auf diese Weise wird eine Versorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen erreicht.

Durch Expressionsanalyse verschiedener Gliome und Gliomazelllinien konnte ich jedoch feststellen, dass auch Gliomazellen selbst VEGF-Rezeptoren exprimieren. Von zwei untersuchten Gliomazelllinien exprimierte eine den VEGFR-1 und die andere den VEGFR-2. Darüberhinaus konnte ich in drei aus Tumoren gewonnenen Gliomazell-Kulturen den VEGFR-1 und in einer den VEGFR-2 nachweisen. Keine der untersuchten Zellen exprimierten beide Rezeptoren.

Alle untersuchten Tumoren sezernierten die VEGF-Splicevarianten 121 und 165, die als diejenigen mit dem größten angiogenetischen Potential hochaffin an beide VEGF-Rezeptoren binden. Für die nachfolgenden Untersuchungen zu Effekten und zur Signaltransduktion des VEGF wurde deshalb rekombinantes VEGF165 eingesetzt. Dabei konnte weder ein autokriner Einfluss des VEGF auf die Proliferation der Zellen noch auf die Sekretion des VEGF-Proteins festgestellt werden. Die Untersuchungen von intrazellulären Signalkaskaden zeigte zwar eine Phosphorylierung des VEGFR-1, eine Aktivierung nachgeschalteter Signalmoleküle, wie den MAP-Kinasen ERK und p38, oder den Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B zu induzieren, war hingegen nicht möglich. Diese Untersuchungen an zwei Gliomazelllinien, von denen eine ausschließlich den

VEGFR-1 und die andere den VEGFR-2 exprimieren, zeigten, dass diese zwar offensichtlich das angebotene VEGF binden, dies aber zu keiner Signaltransduktion oder zu funktionellen Änderungen führt.

An kultivierten Mikrogliazellen konnte ich nachweisen, dass diese den VEGFR-1, nicht jedoch den VEGFR-2 exprimieren. Untersuchungen der Effekte von VEGF zeigten, dass VEGF₁₆₅ sowohl mitogen auf Mikroglia wirkt, als auch chemotaktische Wirkung auf sie hat. Bei Untersuchung der diesen Effekten zugrunde liegenden intrazellulären Signalkaskaden konnte ein intrazellulärer Effekt auf die Kinase „Akt/ PKB“ festgestellt werden.

Während trotz nachgewiesener Expression von Rezeptoren das VEGF einen eher geringen Einfluss auf Gliomazellen hat, sind die Effekte auf Mikrogliazellen beachtenswert. Vor dem Hintergrund, dass bisher keine Ursache für das massive Vorhandensein von Mikroglia in Tumorgewebe bekannt war, weist dieser Befund auf einen möglichen, von Gliomazellen freigesetzten Faktor hin, der diese Infiltration induziert.

7 Literaturverzeichnis

ALGIRE GH, CHALKLEY HW (1945) Vascular reactions and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* **6**: 73-85.

ALVAREZ JA, BAIRD A, TATUM A, DAUCHER J, CHORSKY R, GONZALEZ AM, STOPA EG (1992) Localization of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human neoplasms. *Mod Pathol* **5** (3): 303-7.

BACIC M, EDWARDS NA, MERRILL MJ (1995) Differential expression of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) forms in rat tissues – Short Communication. *Growth Factors* **12**: 11-15.

BADIE B AND SCHATNER J (2001) Role of Microglia in Glioma Biology *Microsc Res. Tech* **54**: 106-113.

BADIE B AND SCHATNER J (2000) Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. *Neurosurg* **46**: 957-61.

BADIE B, SCHATNER J, KLAVER J, VORPAHL J (1999) In vitro modulation of microglia motility by glioma cells is mediated by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Neurosurgery* **44**: 1077-1082; discussion 1082-1073.

BANATI RB, GEHRMANN J, SCHUBERT P, KREUTZBERG GW (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* **7**: 111-8.

BARLEON B, SIEMEISTER G, MARTINY-BARON G, WEINDEL K, HERZOG C, MARME D (1997) Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Res* **57**: 5421-5425.

BARLEON B, SOZZANI S, ZHOU D, WEICH HA, MANTOVANI A, MARME MA (1996) Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* **87**: 3336-3343.

BLUM S, ISSBRUKER K, WILLUWEIT A, HEHLGANS S, LUCERNA M, MECHTCHERIAKOVA D, WALSH K, VON DER AHE D, HOFER E, CLAUSS M (2001) An inhibitory role of the phosphatidylinositol 3-kinase-signaling-pathway in vascular endothelial growth factor-induced tissue factor expression. *J Biol Chem* **276**: 33428-34.

BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.

BROGI E, WU T, NAMIKI A, SNER JM (1994) Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* **90**: 649-652.

BRUNET A, BONNI A, ZIGMOND MJ, LIN MZ, JUO P, HU LS, ANDERSON MJ, ARDEN KC, BLENIS J, GREENBERG ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96** (6): 857-68.

BURCHARDT T, BURCHARDT M, CHEN MW, BUTTAY R, DE LA TAILLE A, SHABSIGH A, SHABSIGH R (1999) Expression of VEGF splice variants 144/145 and 205/206 in adult male tissues. *IUBMB life* **48**: 405-408.

CARMELIET P, FERREIRA V, BREIER G, POLLEFEYT S, KIEKENS L, GERSTENSTEIN M, FAHRIG M, VANDENHOECK A, HARPAL K, EBERHARDT C, DECLERQ C, PAWLING J, MOONS L, COLLEN D, RISAU W, NAGY A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**: 435-439.

CHARNOCK-JONES SD, SHARKEY AM, RAJPUT-WILLIAMS J, BURCH D, SCHOFIELD JP, FOUNTAIN SA, BOOCOCK C, SMITH SK (1993) Identification and localization of alternatively spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod.* **48**: 1120-1128.

CHARNOCK-JONES SD, SHARKEY AM, BOOCOCK C, AHMED A, PLEVIN R, FERRARA N, SMITH SK (1994) Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod* **51**: 524-530.

CHEN BD, CLARK CR (1986) Interleukin 3 (IL-3) regulates the in vitro proliferation of both blood monocytes and peritoneal exudates macrophages: synergism between a macrophage lineage-specific colony-stimulating factor (CSF-1) and IL-3. *J Immunol* **137**: 536-70.

Cheung CY, Singh M, Ebaugh MJ, Brace RA (1995) Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* **173**: 753-759.

CHIRGWIN JJ, PRZBYLA AE, MACDONALD RJ, RUTTER WJ (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 5294.

CHOMCZYNSKI P, SACCHI N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanat-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

CLAUSS M, GERLACH M, GERLACH H, ET AL. (1990) Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* **172**: 1535-1545.

CONNOLLY DT, OLANDER JY, HEUVELMAN D ET AL.(1989) Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem* **264**: 20017-20024.

COX RA (1968) The use of Guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* **12**: 120-129.

CULLINAN-BOVE K, KOOS RD (1993) Vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increase in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* **133**: 829-837.

CUNNINGHAM SA, WAXHAM MN, ARRATE PM, BROCK TA (1995) Interaction of the flt-1 tyrosine kinase receptor with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. Mapping of a novel site involved in binding. *J Biol Chem* **270**: 20254-20257.

DELIDOW BD, LYNCH, JP, PELUSO JJ, WHITE, BA (1993): *Polymerase chain reaction - basic protocols*, in White, B.A. (Editor) *Methods in molecular biology* Vol. 15: PCR Protocols: Current methods and applications, Human Press Inc., Totowa, NJ, 1-29.

ECKHART L, BAN J, BALLAUN C, WENINGER W, TSCHACHLER E (1999) Reverse transcription-polymerase chain reaction products of alternatively spliced mRNAs form DANN heteroduplexes and heteroduplexes complexes. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 2613-2615.

FERRARA N (1999) Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* **77**: 527-543.

FERRARA N, DAVIS-SMYTH T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* **18**: 4-25.

FERRARA N, HENZEL WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* **161**: 8510-8518.

FERRER FA, MILLER LJ, LINDQUIST R, KOWALCZYK P, LAUDONE VP, ALBERTSEN PC, KREUTZER DL (1999) Expression of vascular endothelial growth factor receptors in human prostate cancer. *Urology* **54**: 567-72.

FINE HA, FIGG WD, JAECKLE K, WEN PY, KYRITSIS AP, LEOFFLER JS, LEVIN VA, BLACK PM, KAPLAN R, PLUDA JM, ET AL. (2000) Phase II trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas. *J. Clin Oncol.* **18**: 708-715.

FOLKMAN J, MERLER E, ABERNATHY E, WILLIAMS G (1971) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* **133**: 275-88.

FOLKMAN J, KLAGSBRUN M (1987) Angiogenic Factors. *Science* **28**: 442-447.

FOLKMAN J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1**: 27-31.

FONG DH, ROSSANT J, GERSENSTEIN M, BREITMAN ML (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66-70.

FRANK S, HUBNER G, BREIER, G, LONGAKER MT, GREENHALG DG, WERNER S (1995) regulation of VEGF expression in cultures keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* **270**: 12607-12613.

FREI K, PIANI D, MALIPIERO UV, VAN MEIR E, DE TRIBOLET N, FONTANA A (1992) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) production by glioblastoma cells. Despite the presence of inducing signals GM-CSF is not expressed in vivo. *J. Immunol* **148**: 3140-3146.

GERBER HP, VU TH, RYAN AM, KOWALSKI J, WERB Z, FERRARA N (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* **5**: 623-628.

GERBER HP, CONDORELLI F, PARK J, FERRARA N (1997) Differential transcriptional regulation of the two VEGF receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/ KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* **272**: 23659- 23667.

GERBER HP, McMURTREY A, KOWALSKI J, YAN M, KEYT BA, DIXIT V, FERRARA N (1998) Vascular endothelial Growth factor Regulates Endothelial Cell Survival through the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/ Akt Signal Transduction Pathway. *J Biol Chem* **273** (46): 30336-30343.

GERBICKE-HAERTER PJ, BAUER J, SCHOBERT A, NORTHOFF H (1989) Lipopolysaccharide-free conditions in primary astrocyte cultures allow growth and isolation of microglial cells. *J Neurosci* **9**: 183-194.

GITAY-GOREN H, HALABAN R, NEUFELD G (1993) Human Melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 702-709.

GIULIAN D, BAKER TJ (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* **6**: 2163-2178.

GLISIN V, CRKVENJAKOW R, BYUS C (1973) Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* **13**: 2633.

GOLDMAN C, KIM J, WONF WL, KING V, BROCK T, GILLESPIE Y (1993) Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by malignant glioma cells. A model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell* **4**: 121-133.

GOLDMAN CK, KENDALL RL, CABRERA G, SOROCEANU L, HEIKE Y, GILLESPIE GY, SIEGAL GP, MAO X, BETT AJ, HUCKLE WR, THOMAS KA, CURIEL DT (1998) Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8795-8800.

GUO D, JIA Q, SONG HY, WARREN RS, DONNER DB (1995) Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* **273**: 6729-6733.

HELD-FEINDT J, KRISCH B, MENTLEIN R (1999) Molecular and functional analysis of the somatostatin receptor subtype 2 (sst2) in human glioma cells. *Mol Brain Res* **64**, 101-107.

HEROLD-MENDE C, STEINER HH, ANDL T, RIEDE D, BUTTLER A, REISSER C, FUSENIG NE, MUELLER MM (1999) Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. *Lab Invest.* **79** (12): 1573-82.

HIRATSUKA S, MINOWA O, KUNO J, NODA T, SHIBUYA M (1998) Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9349-9354.

HOUCK KA, FERRARA N, WINER J, CACHIANES G, LI B, LEUNG DW (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* **5**: 1806-1814.

ISNER JM, LOSORDO DW (1999) Therapeutic angiogenesis for heart failure. *Nat Med* **5**: 491-492.

KATOH O, TAUCHI H, KAWAISHI K, KIMURA A, SATOW Y (1995) Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res.* **55**, 5687-5692.

Kawasaki E (1989): Amplifikations of RNA sequences via complementary DNA (cDNA). *Amplifications* **3**, 4

KECK PJ, HAUSER SD, KRIVI G, SANZO K, WARREN T, FEDER J, CONOLLY DT (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **246**: 1309-1312.

KLEIHUES P, CAVANEE WK (2000) *World Health Organisation classification of tumours of the nervous system*. IARC/ WHO, Lyon.

KOCH AE, HARLOW L, HAINES GK, AMENTO EP, UNEMORI EN, WONG W-L, POPE RM, FERRARA N (1994) Vascular endothelial growth factor: a cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol* **152**: 4149-4156.

KONG HL, HECHT D, SONG W, KOVESDI I, HACKETT NR, YAYON A, CRYSTAL RG (1998) Regional suppression of tumor growth by in vivo transfer of a cDNA encoding a secreted form of the extracellular domain of the flt-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Hum Gene Ther* **9**: 823-833.

Koochekpur S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineburg E, Hudson EA, Resau JH, Vande Woude GF (1997) Met and hepatocyte growth factor /scatter factor expression in human gliomas. *Acta Neuropathologica* **93**: 518-527.

LANDGREN E, SCHILLER P, CAO Y, CLAEISSON-WELSH L (1998) Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity, but not phospholipase C- γ and migration of endothelial cells expressing Flt-1. *Oncogene* **16**: 359-367.

LEONHARDT, H (1985) *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen* (7. Auflage), G. Thieme Verlag, Stuttgart.

LEUNG DW, CACHIANES G, KUANG WJ, GOEDEL DV, FERRARA N (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**: 1306-1309.

LEUNG SY, WONG MP, CHUNG LP, CHAN AS, YUEN ST (1997) Monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in gliomas. *Acta Neuropathologica* **93**: 518-527.

Lindl T, Bauer J, (1994) *Zell- und Gewebekultur – Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und ihre Anwendungen* (3. Auflage), G. Fischer Verlag, Stuttgart.

LOUGHNA S, SATO TN (2001) Angiopoietin and Tie Signaling pathways in vascular development. *Matrix Biol* **20**: 319-25.

MENTLEIN R, ECHLER O, FORSTREUTER F, HELD-FEINDT J (2001) Somatostatin inhibits the production of vascular endothelial growth factor in human glioma cells. *Int J Cancer* **15**: 545-50.

MILANINI J, VINALS F, POUSSEGUR J, PAGES G (1998) p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *J Biol Chem* **273**: 18165-18172.

MINCHENKO A, BAUER T, SALCEDA S, CARO J (1994) Hypoxic Stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. *Lab Invest* **71**: 374-379.

MULLIS KB, FALLONA FA (1987): Specific Synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**, 335-350.

NEUFELD G, COHEN T, GENGRINOVITCH S, POLTORAK Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB* **13**: 9-13.

NEUFELD G, COHEN T, GTAY-GÖREN H ET AL. (1996) Similarities and differences between the vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants. *Cancer Metastasis Rev* **15**: 153-158.

NOLTE C, KIRCHHOFF F, KETTENMANN H (1997) Epidermal Growth factor is a motility factor for microglial cells in vitro: evidence for teh EGF receptor expression. *Eur J Neurosci* **9**: 1690-8.

OGAWA S, OKU A, SAWANO A, YAMAGUSHI S, YAZAKI Y, SHIBUYA MA (1998) Novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* **273**: 31273-31282.

OKAMOTO N, TOBE T, HACKETT SF, OZAKI H, VINOES MA, LA-ROCHELLE W, ZACK DJ, CAMPOCHIARO PA (1997) Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *Am J Pathol* **151**: 281-291.

OYAMA T, RAN S, BHIDA T, NADAF S, KERR L, CARBONE DP, GABRILOVICH DI (1998) Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J. Immunol* **160**: 1224-1232.

PALEOLOG EM, YOUNG S, STARK AC, MC CLOSKEY RV, FELDMANN M, MAINI RN (1998) Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **41**: 1258-1265.

PARK JE, CHEN H, WINER J, HOUCK KA, FERRARA N (1994) Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/ KDR. *J Biol Chem* **269**: 25646-25654.

PAULUS W, ROGGENDORF W, KIRCHNER T (1992) Ki-M1P as a marker for microglia and brain macrophages in routinely processed human tissues. *Acta Neuropathologica* **84**: 538-544.

PETERSON PK, HU S, SALAK-JOHNSON J, MOLITOR TW, CHAO CC (1997) Differential production of and migratory response to beta chemokines in human microglia and astrocytes. *J Infect Dis* **175**: 478-81.

PHILLIPS HS, HAINS J, LEUNG DW, FERRARA N (1990) Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology* **127**: 965-967.

PLATE KH, BREIER G, WEICH HA, RISAU W (1992) Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* **359** (6398): 845-8.

POLTORAK Z, COHEN T, SVAN R, KANDELIS Y, SPIRA G, MLODAVSKY I, KESHET E, NEUFELD G (1997) VEGF₁₄₅ : a secreted VEGF form that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* **272**: 7151-7158.

RAFF MC, FIELDS KL, HAKOMORI S, MRSKY R, PRUSS RM, WINTER J (1979) Cell-type specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res.* **174**: 283-308.

RAVINDRANATH N, LITTLE-IHRIG L, PHILLIPS HS, FERRARA N, ZELEZNIK AJ (1992) Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology* **131**: 254-260.

ROGGENDORF W, STRUPP S, PAULUS W (1996) Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. *Acta Neuropathologica* **74**: 269-277.

ROMASHKOVA JA, MAKAROV SS (1999) NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature* **401**: 86-90.

ROMMEL C, CLARKE BA, ZIMMERMANN S, NUNEZ L, ROSSMANN R, REID K, MOELLING K, YANCOPOULUS GD, GLASS DJ (1999) Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* **286**:1738-41.

ROSSI ML, HUGHES JT, ESIRI MM, COAKHAM HB, BROWNELL DB (1987) Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. *Acta Neuropathol* **74**: 269-277.

RYUTO M, ONO M, IZUMI H, YOSHIDA S, WEICH HA, KOHNO K, KUWANO M (1996) Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem* **271**: 28220-28228.

SAIKI RK, GELFAND, DH, STOFFEL, S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, EHRLICH AH (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

SAMBROOK JE, FRITSCH EF, MANIATIS, T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.

SEETHARAM L, GOTOH N, MARU Y, NEUFELD G, YAMAGUSHI S, SHIBUYA MA (1995) Unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene* **10**: 135-147.

SENGER DR, GALLI SJ, DVORAK AM, PERRUZZI CA, HARVEY VS, DVORAK HF (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**: 983-5

SHALABY F, ROSSANT J, YAMAGUCHI TP, GERSTENSTEIN M, WU XF, BREITMAN ML, SCHUH AC (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**: 62-66.

SHAPIRO WR, GREEN SB, BURGER PC, MAHALEYMS, SELKER RG, VANGILDER JC, ROBERTSON JT, RANSOHOF J, MEALEY J, STRIKE TA ET AL., (1989) Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens in post-operative treatment of malignant glioma. Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001. *J Neurosurg* **71**: 1-9.

SHEN BQ, LEE DY, GERBER HP, KEYT BA, FERRARA N, ZIONCHECK TF (1998) Homologous up-regulation of KDR/ Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J Biol Chem* **273**: 29979-29985.

SHIMA DT, ADAMIS AP, FERRARA N, YEO KT, YEO TK, ALLENDE R, FOLKMAN J, D'AMORE PA (1995) Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor as the mitogen. *Mol Med* **1**: 182-193.

SHINONAGA M, CHANG CC, SUZUKI N, SATO M, KUWABARA T (1988) Immunohistological evaluation of macrophage infiltrates in brain tumors. Correlation with peritumoral edema. *J. Neurosurg* **68**: 259-265.

SHWEIKI D, ITIN A, SOFFER D, KESHET E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* (London) **367**: 576-579.

SKOBE M, BROWN LF, TOGNAZZI K, GANJU RK, DEZUBE BJ, ALITALO K, DETMAR M (1999) Vascular endothelial growth factor -C (VEGF-C) and its receptors KDR and flt-4 are expressed in AIDS-associated Kaposi's Sarkoma. *J Invest Dermatol* **113**: 1047-53.

STAVRI GT, ZACHARY IC, BASKERVILLE PA, MARTIN JF, ERUSALIMSKY JD (1995) Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic action with hypoxia. *Circulation*; **92**: 11-14.

TAKAHASHI T, SHIBUYA M (1997) The 230-kDa mature form of KDR / Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 cells. *Oncogene* **14**: 2079-2089.

TAKAHASHI T, SHIRASAWA T, MIYAKE K, YAHAGI Y, MARUYAMA N, KASAHARA N, KAWAMURA T, MATSUMURA O, MTARAI T, SAKAI O (1995) Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: FLT-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **209**: 218-226.

TERMAN BI, DOUGHER VERMAZEN M, CARRION ME, DIMITROV D, ARMELLINO DC, GOSPODAROWICZ D, BOHLEN P (1992) Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 1579-1586

TUDER RM, FLOOK BE, VOELKEL NF (1995) Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/ Flk-1 and Flt in lungs exposed to acute or chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* **95**: 1798-1807.

VRIES DE C, ESCOBEDO JA, UENO H, HOUCK K, FERRARA N, WILLIAMS LT (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**: 989-991.

WALTENBERGER J, CLAESSION WELSH L, SIEGBAHN A, SHIBUYA M, HELDIN CH (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **269**: 26988-26995.

WOLLMER MA, LUCIUS R, WILMS H, HELD-FEINDT J, SEEVERS J, MENTLEIN R (2001) ATP and adenosine induce ramification of microglia in vitro. *J Neuroimmunol* **115**(1-2): 19-27.

YANG XJ, CEPKO CL (1996) Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. *J Neurosci* **16**: 6089-6099.

YOSHIMURA T, ROBINSON EA, TANAKA S, APPELLA E, KURATSU J, LEONARD EJ (1989) Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med* **169**: 1449-1459.

ZACHARY I, GLIKI G (2001) Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* **49**: 568-581.

ZACHARY I, MATHUR A, YLA- HERTTUALA S, MARTIN JF (2000) Vascular protection: a novel, non-angiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* **20**: 1512-1520.

ZIMMERMANN S, MOELLING K (1999) Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* **286** (5445): 1741-4.

8 Verzeichnis der Abkürzungen

AP-1	“Activator Protein 1”; Transkriptionsfaktor
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Reaktion
APS:	Ammoniumperoxosulfat
bp:	Basenpaare
BSA:	bovines Serumalbumin
bFGF:	basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
cDNA:	complementary DNA, bzw. copy-DNA
DEPC:	Diethylpyrocarbonat
DMEM:	Dulbecco’s modified Eagle’s Medium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DNase:	Desoxyribonuklease
dNTP:	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DTT:	Dithiothreitol
EDTA:	Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
EGF:	Epidermal Growth Factor
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FKS:	fötales Kälberserum
Flk-1:	fetal liver kinase 1 = VEGFR-1
Flt-1:	fms-like tyrosine kinase 1 = VEGFR-1
g:	Normwert der Schwerebeschleunigung $g_n=9,80665 (2,81^m/s)$
GFAP:	glial fibrillary acidic protein
h:	human
HEPES:	h-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase = Meerrettich-Peroxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
kDa:	Kilo Dalton
KDR:	Kinase insert domain containing receptor (VEGFR-2 = Flk-1)

M:	Molar
m:	murin bzw. Maus
MAPK:	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MOPS:	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA:	messenger RNA
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS:	Phosphate-buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction= Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF:	Platelet Derived Growth Factor
PMSF	Phenyl-Methan-Sulfonylfluorid
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
R:	Rezeptor
r:	Ratte
RNA:	Ribonukleinsäure
RNase:	Ribonuklease
SDS:	Sodium-(Natrium)-Dodecylsulfat
SK	Subkultur
SRIF:	Somatotropin release inhibiting factor = Somatostatin
SSC:	Sodium chlorid / sodium citrat (buffer)
Taq-Polymerase:	Thermus aquaticus Polymerase
TBE:	Tris Borat EDTA
TBST:	: Tris-buffered saline tween
TEMED:	: N, N, N', N' -Tetramethylethylendiamin
TK:	: Tyrosinkinase
Tris:	: Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
VEGF:	: vascular endothelial growth factor
VEGFR:	: VEGF-Rezeptor
WHO:	World Health Organisation

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rolf Mentlein für die interessante Themenstellung, für die Bereitstellung der notwendigen Arbeitsmittel und die Betreuung der Arbeit.

Darüberhinaus danke ich Frau PD Dr. Janka Held-Feindt für ihre Unterstützung und die vielen technischen und freundschaftlichen Ratschläge.

Die Arbeit konnte am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt werden, wo mir großzügig die Räumlichkeiten und Geräte zur Verfügung gestellt wurden. Hierfür gilt dem Direktorium mein Dank.

Ich danke auch ganz besonders den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, Martina Burmester, Dagmar Freier, Miriam Lemmer und Ulla Prange, die mir stets hilfreich und freundlich zur Seite standen, für die technische Hilfestellung und das äußerst nette Arbeitsklima.

Dem Anatomischen Institut in Kiel und seinen Mitarbeitern danke ich für die freundliche Aufnahme und die hilfreiche Unterstützung.

Ganz besonders erwähnen möchte ich Dorothee Wittke und Dr. Thomas Pufe, mit denen ich das Büro teilen durfte. Danke für eine immer freundschaftliche Atmosphäre und die nette gemeinsame Zeit!

Ich danke von Herzen meinen Eltern und meinen Geschwistern Claudia und Frank für ihr Vertrauen, ihre Geduld und für ihre finanzielle und seelische Unterstützung; all dies hat mir sehr geholfen.

10 Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Frauke Forstreuter
Wohnhaft: Alsenstr. 19
24118 Kiel
Geburtstag: 18.10.1970
Geburtsort: Neustadt in Holstein
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

Mai 1990: Zuerkennung der allgemeinen Hochschulreife

Studium:

September 1990: Immatrikulation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Studiengang: Chemie

Diplomprüfung: April 1995

Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. W. Tochtermann im Institut für Organische Chemie
der CAU Kiel. Thema: „Synthese von Hexadecadien- und Heptadecadienoliden“

Ausstellung des Diplomzeugnisses Oktober 1996

Promotion:

Seit dem 1.11.1998 Anfertigung der Dissertation am Anatomischen Institut der Christian-
Albrechts-Universität zu Kiel

Sonstiges:

Vom 1.2. 1997 bis 31.10. 1998 Hospitanz am Pathologischen Institut der Medizinischen
Universität zu Lübeck

Im Sommersemester 1998 und Wintersemester 98/ 99 Wissenschaftliche Hilfskraft im
Praktikum „Chemie für Mediziner“ an der MU zu Lübeck bei Herrn Prof. Dr. T. Peters

Im Wintersemester 2000/2001 Lehrauftrag am Biochemischen Institut der CAU zur
Betreuung des Praktikums „Biochemie für Mediziner“

(Frauke Forstreuter)

11 Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Diese Arbeit hat weder in gleicher, noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Mit der Einstellung dieser Arbeit in die Fachbibliothek Biologie-Zentrum sowie in die Universitätsbibliothek der Christian-Albrechts-Universität bin ich einverstanden.

Kiel, 20. Dezember 2001

(Frauke Forstreuter)