

Aus der chirurgischen Klinik der medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
(Prof. Dr. med. H. T. Knoefel)

Inhibition lymphogener Metastasierung von Prostatakarzinomzellen durch Hemmung der
Synthese des Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGF-C)
mittels Antisense-RNA in vitro

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Stefanie Leschke

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Priv. Doz. Dr. med. Kenko Cupisti
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Friedrich Boege

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Autonomes Zellwachstum – Tumorphathologie	4
1.1.1. Klinisch-biologisches Verhalten von Tumoren	
1.1.2. Kausale und formale Pathogenese	
1.1.3. Klassifikation von Tumoren	
1.2. Tumormetastasierung	7
1.2.1. Metastasierungswege	
1.2.2. Hämatogene Metastasierung	
1.2.3. Lymphogene Metastasierung	
1.3. Die VEGF-Familie und ihre Rezeptoren	10
1.3.1. VEGF-A	
1.3.2. VEGF-B	
1.3.3. VEGF-C	
1.3.4. VEGF-D/VEGF-E	
1.3.5. VEGF-Rezeptoren	
1.4. Aufbau und Funktion des Lymphsystems	19
1.5. Lymphangiogenese durch VEGF-C	20
1.6. VEGF-C und lymphogene Tumormetastasierung	21
1.7. Prostatakarzinomzellen PC 3 mit Luciferase	23
1.8. Antisense-RNA	24

1.9.	Ziele dieser Arbeit	25
2.	Material und Methoden	26
2.1.	Material	26
2.1.1.	Mikroorganismen	
2.1.2.	Chemikalien, Enzyme, Filtermembranen und Reagentiensätze („Kits“)	
2.2.	Methoden	28
2.2.1.	Zellkultivierung	
2.2.2.	RNA-Isolierung	
2.2.3.	Reverse Transkription	
2.2.4.	PCR und DNA-Gelelektrophorese	
2.2.5.	One-Shot-Transformation und Bakterienkultur	
2.2.6.	Plasmid-Präparation	
2.2.7.	Enzymatisch gesteuerter Einbau von PCR-Sequenzen in Plasmide	
2.2.8.	Plasmidtransfektion in PC-3-luc-Zellen	
2.2.9.	CAT-Elisa	
2.2.10.	Western-Blot	
2.2.10.1.	Proteinextraktion aus Zellkulturen	
2.2.10.2.	SDS-Polyacrylamidgel-Präparation	
2.2.10.3.	Protein-Gelelektrophorese	
2.2.10.4.	Protein-Blot	
2.2.10.5.	Coomassie Brilliant Blau-Gelfärbung	
2.2.10.6.	Proteinfärbung	
2.2.10.7.	Protein-Immunodetektion	
2.2.11.	RNA-Isolierung aus transfizierten PC-3-luc-Zellen	
2.2.12.	Northern Blot	
2.2.12.1.	RNA-Gelelektrophorese	
2.2.12.2.	RNA-Blot auf Hybond N+	
2.2.12.3.	DIG-High-Prime-DNA-Markierung	
2.2.12.4.	Hybridisierung von RNA mit einer DIG-markierten DNA-Sonde	

2.2.12.5. Immundetektion von RNA:DNA-Hybriden	
2.2.13. DNA-Präzipitation	
2.2.14. Immunhistochemische Proteinfärbung in vivo	
2.2.14.1. Zellfixation	
2.2.14.2. Proteinfärbung in vivo	
<hr/>	
3. Ergebnisse	52
3.1. VEGF-C-Gen und sein Nachweis in PC-3-luc-Zellen	52
3.2. Antisense-Konstrukt im pCEP4-Plasmid	53
3.3. Plasmidtransfektion und Selektion	55
3.3.1. Ermittlung der für erfolgreiche Transfektion notwendigen DNA-Menge	
3.3.2. Selektion transfizierter PC-3-luc Zellen	
3.3.3. Transfektion von PC-3-luc Zellen	
3.3.4. Untersuchung Antisense-transfizierter PC-3-luc Zellen	
3.3.4.1. PCR	
3.3.4.2. Northern Blot	
3.3.4.3. Western Blot	
3.3.4.4. Immunhistochemie	
<hr/>	
4. Diskussion	65
<hr/>	
5. Zusammenfassung	69
<hr/>	
6. Abkürzungen	70
<hr/>	
7. Literaturverzeichnis	72
<hr/>	
8. Lebenslauf	104

1. Einleitung

1.1. Autonomes Zellwachstum – Tumorpathologie

1.1.1. Klinisch-biologisches Verhalten von Tumoren

Ein Tumor ist eine örtlich umschriebene Zunahme des Gewebevolumens. Im weiteren Sinn bezeichnet der Begriff jede lokalisierte Anschwellung durch Ödem, akute oder chronische Entzündung oder aneurysmatische Erweiterung (= benigner Tumor). Maligne Eigenschaften erhält ein Tumor durch enthemmtes, autonomes und irreversibles Überschusswachstum (=Neoplasie). Dies ist in der Regel mit unterschiedlich stark ausgeprägtem Verlust spezifischer Zell- und Gewebefunktionen verbunden. Eine Neoplasie ordnet sich weder strukturell noch funktionell in das Normalgewebe ein und wächst auch dann noch weiter, wenn der auslösende Reiz nicht mehr wirksam ist (Riede, Walch, Wiestler 2004).

Benigne Tumoren wachsen lokal und umschrieben. Meist ist eine Kapsel vorhanden, entweder aus Bindegewebe oder aus komprimiertem benachbarten Stromagewebe (Pseudokapsel), wodurch der Tumor verschieblich und chirurgisch einfach zu entfernen ist. Das Wachstum erfolgt langsam und auf expansive Weise. Klinisch sind gutartige Tumoren meist stumm. Symptome treten auf, wenn die Funktion des Ursprungsgewebes überschießend kopiert wird (z. B. Hormonproduktion). Bei anatomisch ungünstiger Lage können sie benachbarte Strukturen komprimieren und somit Organfunktionen beeinträchtigen. Histologisch ist das Gewebe ausgereift und dem Ursprungsgewebe sehr ähnlich. Benigne Tumoren weisen einen niedrigen Zellgehalt bei einheitlicher Zellgröße auf. Die Zellkerne sind monomorph, das Chromatin ist homogen verteilt, der DNA-Gehalt ist regelrecht und euploid und die Kern-Plasma-Relation ist unauffällig. Die Mitoserate ist nicht erhöht. Zellatypien fehlen.

Maligne Tumoren wachsen schnell, infiltrieren und destruieren benachbarte Strukturen und sind makroskopisch unscharf begrenzt. Sie neigen dazu, sich entlang histologischer Leitstrukturen (z. B. Nervenscheiden) auszubreiten und in Blut- oder Lymphgefäße

einzubrechen (=Invasion) (Riede, Walch, Wiestler 2004). Dies begünstigt die Zellverschleppung in andere Organe. Somit bekommt der Tumor die Fähigkeit zur Metastasierung, d.h. zur Tumorabsiedlung in andere Organe (Siewert, Wittekind, Schakert 2006). Damit der gesteigerte Nährstoffbedarf des erhöhten Zellumsatzes gedeckt werden kann, findet durch pathologisch gesteigerte Vaskulogenese (vollständige Neubildung von Gefäßen) und Angiogenese (Bildung neuer aus im Gewebe vorbestehenden Gefäßen) eine Neovaskularisation im Tumor statt (Seeber, Schütte et al. 2003; Riede et al. 2004; Yoo 2006). Histologisch ist malignes Tumorgewebe heterolog und unreif. Es zeigt sich eine hohe Zelldichte mit unterschiedlich großen Zellen. Auch die Zellkerne sind polymorph aufgrund der unregelmäßigen Chromatinverteilung und des vermehrten bzw. aneuploiden DNA-Gehaltes. Die Kern-Plasma-Relation ist zugunsten des Kernes verschoben. Es finden sich häufig Mitosen als Zeichen gesteigerter Wachstumstendenz.

Semimaligne Tumoren haben die histologischen Kennzeichen maligner Tumoren und wachsen lokal infiltrierend und destruierend, jedoch setzen sie in der Regel keine Metastasen. Sie neigen bei lokal unzureichender chirurgischer Exzision zu Rezidiven (z. B. Basaliome der Haut) (Riede et al. 2004; Siewert et al. 2006).

1.1.2. Kausale und formale Pathogenese

Eine maligne Tumorerkrankung lässt sich als genetisch bedingte Krankheit definieren. Sie beruht auf Mutationen, durch die Onkogene und/oder Regulatorproteine inadäquat aktiviert und/oder Tumor-Suppressorgene oder deren Genprodukte inaktiviert werden (Hanahan, Weinberg 2000; Riede, Walch, Wiestler 2004). Daraus resultiert eine Differenzierungsstörung der Zelle. Möglich ist neben einer Entdifferenzierung von spezialisierten Zellen auch eine ungehemmte Proliferation unreifer (Vorläufer-) Zellen (vgl. einige Formen der Leukämie oder Blastome wie z. B. Wilms-Tumor). Mediatoren dieser Proliferationsenthemmung sind Wachstumsfaktoren, (Proto-)Onkogene, Cycline und Tumorsuppressorgene.

Chemische Karzinogene schädigen die DNA und induzieren dabei Mutationen oder beeinflussen die interzelluläre Kommunikation. Hierdurch werden die Zellen gegenüber ihrer Umgebung unabhängig und können sich aus dem Zellverband herauslösen (Estler, Schmidt 2007).

Physikalische Noxen, wie z. B. ionisierende Strahlen, verursachen DNA-Strangbrüche und Strangvernetzungen. Sie können auch immunsuppressiv wirken und die körpereigene Tumorabwehr behindern (Riede, Walch, Wiestler 2004).

Viren sind an der Tumorphathogenese ebenfalls beteiligt. Durch Integration ihrer DNA in das Wirtsgenom wird die Expression benachbarter Wirtsgene beeinflusst. Viren sind teilweise selbst Träger von Onkogenen. Beispiele hierfür sind das humane Papillomavirus (Zervixkarzinom) oder das Epstein-Barr-Herpesvirus (Burkitt-Lymphom). Weiterhin wirken Viren immunsuppressiv (z. B. HIV-inuzierte Kaposi-Sarkome oder Non-Hodgkin-Lymphome) (Riede et al. 2004).

Eine maligne Zelltransformation läuft in vier Phasen ab. Bei der Initiation wird in der Zelle ein genetischer Schaden gesetzt, der durch zelleigene Reparaturmechanismen noch behoben werden kann. Wird dieser Schaden in der Promotionsphase jedoch durch Zellproliferation auf die Tochterzellen übertragen und somit etabliert (= präkanzeröse Läsion), kann er nach einer beliebig langen Latenz irreversibel zur Proliferation eines Zellklons führen. Es entsteht ein Tumorknoten, der sich anfangs benigne (Dysplasie), später jedoch maligne verhält und durch Metastasierung im Körper disseminiert (Riede, Walch, Wiestler 2004).

1.1.3. Klassifikation von Tumoren

Tumoren werden nach Bestimmungen der WHO (World Health Organisation) und der UICC (Union International Contre le Cancer) klassifiziert. Das schafft die Voraussetzung für eine differenzierte histologie- und stadiengerechte Therapie. Vergleiche im Hinblick auf diagnostische sowie therapeutische Ergebnisse werden möglich und liefern letztendlich auch Daten zur Prognoseabschätzung individueller Befunde.

Zur Klassifikation werden Tumoren nach geweblicher Herkunft (Typing), Differenzierungsgrad (Grading) und Ausbreitung (Staging) beschrieben. Die Stadieneinteilung (= Staging) richtet sich im TNM-System nach Größe und Ausdehnung des Primärtumors (T = Tumor), Tumorbefall regionärer Lymphknoten (N = Nodus) und Vorliegen von Fernmetastasen (M = Metastasen). Das Grading teilt Neoplasien in vier Gruppen von hochdifferenziert (= G1) bis anaplastisch (= G4) nach histo- und zytologischen Kriterien ein. Postoperativ wird durch die R-Klassifikation die Größe des Residualtumors (keiner - mikroskopisch erkennbarer - makroskopisch sichtbarer Resttumor) als bedeutender Faktor für die Prognose des Patienten beschrieben (Siewert, Wittekind, Schackert 2006).

1.2. Tumormetastasierung

Die Fähigkeit eines Tumors, Metastasen zu setzen, ist ein eindeutiges Kriterium für seine Malignität (Siewert et al. 2006). Es gibt viele Faktoren, die es Krebszellen ermöglichen, von ihrem Primärtumor abzuwandern.

Durch Mutation von Zelladhäsionsmolekülen (Integrine) verlieren die Zellen den Kontakt zum Zellverband. Chemokine, die vom Tumor selbst gebildet werden, steigern die Bewegungsfähigkeit der einzelnen Zellen. Unter dem Einfluß verschiedener Wachstumsfaktoren, z. B. Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und Transforming Growth Factor β (TGF- β), bilden die Zellen Proteasen, welche Kollagen, Laminin und Fibronectin, also extrazelluläre Matrix, aufspalten. Dies ermöglicht es den Zellen, in Gewebsspalten vor- und in Lymph- und Blutgefäße einzudringen.

Nicht jede Zelle, die sich auf diese Weise in den Körper tragen lässt, wird zu einer Metastase. Der überwiegende Anteil aller im Blut befindlichen Tumorzellen geht zugrunde. Zur Metastasierung gehören Arrest der Tumorzellen im Kapillarbett, Adhärenz an Gefäßwände, Extravasation und Tumorzellproliferation mit Neovaskularisierung („Seed-and-soil“-Hypothese) (Jussila, Alitalo 2002; Fidler 2003; Pantel, Brakenhoff 2004; Siewert 2006).

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Tumor Metastasen bildet, nimmt proportional zu lokaler Tumorausbreitung, zunehmender Infiltrationstiefe ins umgebende Gewebe und Tumormasse zu (Byrne 2005; Roskoski 2007). Das führt zur Einschränkung der chirurgischen Resektabilität. Mit der Metastasierung wird die Tumorerkrankung eine systemische Krankheit. In der Regel verhält sich die Aussicht auf Heilung der Tumorerkrankung umgekehrt proportional zum Ausmaß der Metastasierung (Pepper et al. 2003).

1.2.1. Metastasierungswege

Je nach anatomischer Struktur, innerhalb derer die Metastasierung erfolgt, unterscheidet man:

- lymphogene Metastasierung
- hämatogene Metastasierung
- Metastasierung durch Implantation: - intrakavitär (in Pleura- oder Peritonealhöhle, Liquorraum, Perikard)
 - intraluminal (Gastrointestinaltrakt, ableitende Harnwege)
 - iatrogen (lokoregionäre Tumorzell dissemination intraoperativ)

1.2.1.1. Hämatogene Metastasierung

Bei der hämatogenen Metastasierung werden Tumorzellen auf dem Blutweg verschleppt. Dies ermöglicht ihnen ein An- und Weiterwachsen an anderen Körperstellen. Besonders das kleinzellige Bronchialkarzinom, das follikuläre Schilddrüsenkarzinom, das Osteosarkom sowie Karzinome von Nieren, Brust und Prostata bilden frühzeitig hämatogene Metastasen. Bei anderen Tumoren tritt hämatogene Metastasierung erst dann auf, wenn der Primärtumor lokal bereits weiter fortgeschritten ist oder aber die Tumorzellen über den lymphogenen Weg Anschluß an Blutgefäße finden (Siewert, Wittekind, Schakert 2006).

Zunächst wächst der Tumor direkt in kleine präkapilläre Gefäße ein. Einzelne Tumorzellen verklumpen miteinander und werden von einem schützenden Fibrinmantel umgeben, ohne den sie sonst innerhalb der nächsten 24 Stunden durch körpereigene Immunabwehr zerstört würden. Bleibt der Tumorembolus in präkapillären Arteriolen stecken, lösen sich Zellen aus dem Embolus und gelangen über das postkapilläre Venolenbett in den Blutkreislauf. Durch Adhäsionsfaktoren docken sie an Blutgefäßen von Zielorganen an und dringen in dieses ein. Mit Hilfe eigener oder induzierter Angiogenesefaktoren aus der FGF-Familie baut sich in dem Organ ein neues Gefäßsystem auf, welches es der Tumorzelle ermöglicht, zu einer Tochtergeschwulst heranzuwachsen (Riede et al. 2004). Unter den Angiogenesefaktoren lassen sich z. B. der Acidic und der Basic Fibroblast Growth Factor (aFGF und bFGF), Transforming Growth Factor α und β (TGF- α und TGF- β), Hepatozyten Growth Factor, Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), Angiopoietin, Ephrin und Interleukin 8 (IL-8) finden (Ferrara, Davis-Smyth 1997, Ristimäki et al. 1998, Ferrara 2001).

Je nach Lokalisation des Primärtumors und der Art des lokalen venösen Abflusses unterscheidet man hämatogene Metastasierung nach folgenden Typen:

- Hohlvenentyp (Abfluß über die V. cava, erste Metastasenmanifestation in der Lunge)
- Pfortadertyp (Abfluß über die V. portae, erste Metastasenmanifestation in der Leber)
- Wirbelvenentyp (Abfluß über den Plexus venosus, erste Metastasen in der Wirbelsäule oder in den Schädelknochen)
- arterieller Typ (Abfluß über die Lungenvenen, Metastasen im großen Blutkreislauf)

1.2.1.2. lymphogene Metastasierung

Die lymphogene Metastasierung folgt anatomischen Gegebenheiten. Durch entsprechende Lymphabflusswege werden zunächst die dem Primärtumor am nächsten gelegenen Lymphknoten befallen, erst danach die weiter entfernt liegenden. Ein Überspringen von Lymphknotenstationen, also metastasenfremde tumornahe Lymphknoten bei metastasenträgenden tumorfernen Lymphknoten, findet nur selten statt. Dies führte in der Tumorchirurgie zum Prinzip des Sentinel-Lymphknotens (Wittekind 2000; Nathanson 2003). Besonders Karzinome der Brust, der Lunge und des Gastrointestinaltraktes metastasieren frühzeitig lymphogen.

Im Randgebiet eines Tumors können einzelne Zellen leicht in ortsständige Lymphgefäße eindringen, da diese unter der dünnen Endothelzellschicht keine Basalmembran aufweisen und die Zellen durch einfache End-zu-End-Zellkontakte verbunden sind. Außerdem fehlen Lymphgefäßen unterstützende Zellen, wie z. B. Perizyten oder glatte Muskelzellen (Karpanen, Alitalo 2001; Karpanen et al. 2006). Unterstützt durch den intratumoralen Gewebsdruck werden Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäße gestreut (Hashizume, Baluk, Morikawa et al. 2000; Chang et al. 2000). Im Gefäß proliferieren die Zellen, verstopfen es und wachsen an ihm entlang. Diesen Zustand bezeichnet man als Lymphangiosis carcinomatosa. Werden die Zellen durch den Lymphstrom bis zum nächsten Lymphknoten verschleppt, siedeln sie sich hier zunächst im subkapsulär gelegenen Randsinus ab. Nach Durchwachsen des Lymphknotens gelangen die Tumorzellen über das Vas efferens zur nächsten Lymphknotenstation. Über die großen Lymphgefäße wandern die Zellen schließlich in den Ductus thoracicus bzw. in den Ductus lymphaticus dexter und weiter über den linken bzw. rechten Venenwinkel in die Blutbahn (Riede et al. 2004; Siewert et al. 2006). Auf diesem Weg führt die lymphogene Metastasierung zu einer Möglichkeit für den Tumor, auch hämatogen zu streuen.

1.3. Die VEGF-Familie und ihre Rezeptoren

Die Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) gehören zu einer Gruppe von strukturell und funktionell verwandten Faktoren, die viele physiologische Funktionen von Endothelzellen modulieren. Dazu gehören neben den bisher beschriebenen fünf Typen von VEGF auch der Placenta Derived Growth Factor (PlGF) und die Platelet Derived Growth Factors A und B (PDGF A, PDGF B) (Claus 2000).

Als Rezeptoren für die Proteine der VEGF-Gruppe sind bisher drei verschiedene Tyrosinkinasen identifiziert worden, die jeweils spezifisch auf den entsprechenden Endothelzellen exprimiert werden können (Karkkainen, Petrova 2000; Lohela et al. 2003).

1.3.1. VEGF-A

VEGF-A ist der am längsten bekannte und am besten untersuchte Faktor aus der VEGF-Familie und hat somit den historisch bedingten ursprünglichen Namen VEGF. Zuerst entdeckt wurde er 1983 als ein Faktor, der die Gefäßpermeabilität in Tumoren steigert (Senger, Galli, Dvorak et al. 1983; Kekk et al. 1989, Dvorak 2002).

Beim Menschen liegt das Gen auf dem Chromosom 6p21.3 (Tischer et al. 1991). Es ist in acht Exons aufgeteilt, die durch sieben Introns aufgespalten sind (Ferrara, Davis-Smyth 1997). Durch alternatives Splicing der Exons werden sechs verschiedene Klone von VEGF produziert, die sich in der Anzahl der Aminosäuren unterscheiden (VEGF-121, VEGF-145, VEGF-165, VEGF-183, VEGF-189, VEGF-206) (Leung et al. 1989, Ng et al. 2001; Robinson, Stringer 2001; Lohela et al. 2003). Alle Isoformen binden an und aktivieren die Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 (de Vries et al. 1992; Millauer et al 1993; Shibuya 1995; Ferrara 2001; Claesson-Welsh 2006). Die vorwiegend produzierte Isoform von VEGF, VEGF-165, ist ein basisches, Heparin-bindendes, homodimeres Glykoprotein von 45kDa. Durch proteolytische Spaltprozesse entsteht ein bioaktives Fragment von etwa 34kDa Masse. Heterodimere von VEGF und PlGF werden *in vivo*, vor allem in vaskulären Endothelzellen, als auch in Tumorzellen, nachgewiesen (DiSalvo, Bayne et al. 1995; Cao, Chen et al.1996; Ferrara, Davies-Smith 1997).

VEGF erfüllt vielfältige Aufgaben im Bereich der physiologischen und pathologischen Angiogenese (Ferrara et al. 2003; Ruhrberg 2003). Es induziert die Expression von Serinproteasen wie Urokinase- und Gewebsplasminogen-Aktivator sowie von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor und deren Rezeptoren. Damit nimmt es am Prozess von Zellbewegung und Gewebsaufbau teil. VEGF erhöht die Gefäßpermeabilität, da es in kleinen Venen und Kapillaren eine Fenestrierung am Endothel hervorruft (Dvorak et al. 1995; Ferrara, Carver-Moore et al. 1996; Neufeld et al. 1999; Bates et al. 2002). VEGF ist ein potentes Mitogen für die Endothelien von Arterien, Venen und Lymphgefäßen. Es beeinflusst die Gefäßproliferation bei Wundheilungsprozessen, während der Embryonalentwicklung und beim Tumorwachstum (Ferrara, Davis-Smyth 1997; Alitalo, Carmeliet 2002; Drake 2003; Hoeben et al. 2004; Bohnsack, Hirsch 2004). VEGF moduliert an Monozyten deren Migrationsverhalten und blockiert die Weiterdifferenzierung zu dendritischen Zellen. Somit wird in einem Tumor möglicherweise die Immunabwehr durch Unterdrückung Antigen-

präsentierender Zellen geschwächt (Gabilovich et al. 1996; Clauss 2000). VEGF fördert im Rahmen von Proliferationsprozessen die Energiebereitstellung im Gewebe durch Steigerung des Hexose-Transports in Zellen.

Reguliert wird die VEGF-Expression unter anderem über das Sauerstoffangebot im Gewebe. Hypoxie, der wichtigste Stimulator der Angiogenese, erhöht die Transkriptionsrate (Holmes, Zachary 2005; Yoo et al. 2006). Zytokine wie Epidermal Growth Factor (EGF), TGF α und TGF β , Interleukine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6), TNF- α und Prostaglandine (PGE-2) verstärken ebenfalls die Synthese von VEGF (Ferrara, Davis-Smyth 1997; Ristimäki, Narko et al. 1998; Niu et al. 2002; Ferrara 2003).

1.3.2. VEGF-B

VEGF-B wurde 1995 in der DNA der Maus als ein VEGF-verwandtes Peptid entdeckt. Das VEGF-B-Gen befindet sich auf dem Chromosom 11q13 neben dem Gen von Cyclin D1, welches in einer Reihe von Karzinomen vermehrt exprimiert wird (Paavonen et al. 1996; Olofsson, Pajusola, Kaipainen et al. 1996).

Das Gen für VEGF-B umspannt etwa 4kB und besteht aus sieben Exons, getrennt durch sechs Introns. Die mRNA hat verglichen mit den anderen Mitgliedern der VEGF-Familie die längste Halbwertszeit (Olofsson, Pajusola, v. Euler et al. 1996; Enholm et al. 1997). Durch alternatives Splicing werden die beiden bekannten Isoformen gebildet: VEGF-B-167 und VEGF-B-186 (Holmes, Zachary 2005). Die Molekülmassen dieser beiden Proteine betragen 21kDa und 32 kDa. Beide Formen können nach Sekretion aus der Zelle ein durch Disulfidbindungen verbundenes Heterodimer mit VEGF bilden und somit die Bioverfügbarkeit von VEGF kontrollieren. VEGF-B-167 ist zu 42.7%, VEGF-B-186 zu 33% mit VEGF-165 identisch. Beide Isoformen sind hauptsächlich in embryonalen und adulten Muskelgeweben (Herz- und Skelettmuskel) zu finden (Joukov et al. 1997).

VEGF-B bindet wie VEGF-A an die gleiche Domäne von VEGFR-1, die Bindung ist jedoch schwächer. Dies induziert ein mitogenes Signal für endotheliale Zellen. Diese Wirkung ist jedoch vergleichsweise schwach, wie Versuche mit Mäusen, die einen Mangel an VEGF-B

hatten, gezeigt haben: ihre Entwicklung, Fertilität, Gefäßentwicklung oder Lebenserwartung zeigte keine deutlichen Abweichungen von normalen Individuen (Li, Eriksson 2001). VEGF-B beeinflusst Endothelzellen, indem es Plasminogenaktivator (u-PA), ein Wachstumsfaktor für Endothelzellen, und Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI) freisetzt und aktiviert (Olofsson, Korpelainen et al. 1998). Die Aktivierung von VEGFR-1 moduliert die Monozytenaktivität (Clauss 2000).

Die Expression von VEGF-B ist nicht abhängig von Hypoxie, anderen Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Hormonen oder Onkogenen (Li, Eriksson 2001).

1.3.3. VEGF-C

Der Vascular Endothelial Growth Factor C wurde erstmals 1996 aus der cDNA von menschlichen Prostata-Adenokarzinomzellen, der PC-3-Zellreihe, geklont (Joukov, Pajusola, Kaipainen et al. 1996; Lee et al. 1996).

Es besteht eine molekulare Ähnlichkeit zu anderen Wachstumsfaktoren: 30% zu VEGF-165, 27% zu VEGF-B-167, 25% zu PIGF-1, 22-24% zu PDGF A und B. Das Gen für VEGF-C mit über 40kB Größe ist das größte aus der VEGF-Familie und liegt auf dem Chromosom 4q34 in direkter Nachbarschaft zur Aspartylglucosaminidase (Paavonen, Horelli-Koitunen et al. 1996; Chilov et al. 1997).

Das Protein wird vor allem in Herz, Plazenta, Muskel, Ovar, Dünndarm, Lunge, Niere und Schilddrüse sowie in verschiedenen Tumorzelllinien gebildet. Hirngewebe, Leber und Thymus synthetisieren ebenfalls VEGF-C, jedoch quantitativ geringe Mengen (Eriksson, Alitalo 1999).

Stimulatoren der VEGF-C-Synthese sind PDGF, EGF, TGF α und TGF β , IL-1 α , IL-1 β , FGF-2, HGF und TNF α (Enholm 1997; Ristimäki, Narko, Enholm et al. 1998; Enholm 2001; Scavelli et al. 2004; Chang et al. 2004; Kajiya et al. 2005). VEGF-C selbst stimuliert die Freisetzung von Stickoxid (NO), einem potenten Mediator der Vasodilatation und Gefäßpermeabilität (Witzenbichler et al. 1998).

VEGF-C bindet an die Rezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3 und bewirkt deren Autophosphorylierung. Im Vergleich zu VEGF bindet VEGF-C an VEGFR-2 etwa 50mal schwächer (Lee et al. 1996; Kukk et al. 1996; Joukov et al. 1997). Die Rezeptoraktivierung folgt einem parakrinen Sekretionsmechanismus. VEGF-C stimuliert über VEGFR-2 die Migration von Kapillarzellen im Kollagengel und wirkt angiogen. Während der Embryogenese induziert VEGF-C die Entwicklung von Venen und Lymphgefäßen (Kukk, Lymboussaki et al. 1996). Die Wirkung auf Lymphgefäße bleibt im adulten Organismus erhalten. VEGF-C erhöht über Bindung an VEGFR-2 die Gefäßpermeabilität (Joukov et al. 1996; Lee et al. 1996; Jeltsch, Kaipanen et al. 1997; Joukov et al. 1998). Der Einfluß der VEGF-C/Rezeptor-Interaktion für die Endothelzeldifferenzierung wird anhand von Versuchen mit transgenen Mäusen deutlich. Während bei der Mutation VEGF $-/-$ die Endothelzeldifferenzierung verspätet stattfindet, ist bei VEGFR-2 $-/-$ sowohl die Hämatopoese als auch die Endothelzellentwicklung massiv eingeschränkt. Daraus folgt, daß VEGF-C über die VEGFR-2-Wirkung in diese Prozesse eingreift (Shalaby et al. 1995; Carmeliet et al. 1996; Ferrara et al. 1996). Eine Überexpression von VEGF-C in der Haut transgener Mäuse führt zu lymphatischer, nicht zu vaskulärer Proliferation. Der Durchmesser dieser neugebildeten Lymphgefäße wird überdurchschnittlich groß (Jeltsch et al. 1997, Saaristo 2002; Jussila, Alitalo 2002).

Hauptsächlich wird eine RNA von 2.4kB nachgewiesen. Es gibt auch eine 2.0kB große RNA. In Tumorzellen herrscht die 2.4kB-Form vor (Joukov, Pajusola et al. 1996; Joukov, Kaipainen, Jeltsch et al. 1997). Die cDNA besteht aus sieben Exons. Homologien zu VEGF liegen in den Exons drei und vier. Der Transkriptionsstart liegt 523 Basenpaare vor dem Translationsinitiationskodon ATG. Eine TATA-Box existiert nicht. Im Promotor sind Bindungsstellen für Sp-1 (ein ubiquitäres nukleäres Protein, welches die Transkription von TATA-losen Genen initiiert), AP-2 (ein Transkriptionsfaktor, der durch cAMP-abhängige Kinasen und TGF α aktiviert wird) und NF- κ B (ein Transkriptionsfaktor, wichtig im Lymph- und Immunsystem, wird durch IL-1 und TNF α stimuliert) zu finden (Ristimäki et al. 1998). Die Bildung von mRNA wird durch fetales Kälberserum und Phorbol ester in der Zellkultur gesteigert. Synthesesteigernd wirken auch PDGF, EGF, TGF- β (Chilov, Kukk et al. 1997; Enholm et al. 1997). Prinzipiell kodiert die cDNA ein Protein bestehend aus 419 Aminosäuren mit einer prädiktiven Masse von 46.9kDa. Dies ist in vivo nicht der Fall. VEGF-C unterliegt einem ausgedehnten posttranslationalen proteolytischen Processing, aus dem veränderte Rezeptor-Spezifität bzw. -Aktivität, Bioverfügbarkeit, Stabilität und Fähigkeit

zur Dimerbildung resultieren (Scavelli et al. 2004). Nur komplett proteolytisch gespaltenes VEGF-C aktiviert VEGFR-2. Das Splicing erhöht auch die Bindungsfähigkeit an VEGFR-3, die bei der 21kDa-Form am stärksten ausgebildet ist. Im gereiften Zustand bindet VEGF-C mit einer Bindungskonstante von $KD = 135pM$ an VEGFR-3 und mit der Konstante von $KD = 410pM$ an VEGFR-2. Die erste nachweisbare Form von VEGF-C ist ein Precursor von 58kDa Größe, welcher zu einem Paar von 58/58 dimerisiert. Die Bildung eines Precursor-Proteins findet auch bei anderen Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF β , IL-1 α und β , Nerve-GF und Hepatozyten-GF statt. Anschließend wird VEGF-C weiter prozessiert, hauptsächlich entsteht dabei ein über Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer 29/31. Dieses wird weiter zu Peptiden von 15 und 21 kDa Größe geteilt, die jedoch ausschließlich extrazellulär nachweisbar sind. In kleinen Mengen findet man auch Peptide von 58kDa und 43kDa Größe extrazellulär. Die verschiedenen Peptidarten bilden untereinander Dimere. Es gibt Tetramere von 2x29/31, Trimere aus 21/29/31, Dimere aus 15/29, 15/21 und 31/31. Die Peptide von 15kDa und 31kDa Größe sind dem N-Terminal des Precursors zuzuordnen, während die 29kDa-Form dem C-Terminal entspricht. Die Peptide 21kDa und 31kDa enthalten die VEGF-homologen Regionen. Die Abbildung 1 verdeutlicht den Vorgang des Processings. Die Proteolyse läuft in verschiedenen Zelltypen gleichartig ab. Dies stellt möglicherweise einen Mechanismus zu Regulation der VEGF-C-Aktivität dar, zumal VEGF-C über das C-Terminal an Bestandteile der Extrazellulärmatrix (Fibrillin, Laminin, Tenascin) gebunden werden kann (Joukov, Sorsa et al. 1997; Wong et al. 2005).

Abb. 1:

Schematisches Modell des proteolytischen Processings von VEGF-C (Joukov et al. 1997).

Signalsequenz: schwarzer Balken; VEGF-A-homologe Domäne: grauer Balken; N-terminales Ende des Propeptides: gepunkteter Balken; C-terminales Ende des Propeptides: weißer Balken; die Zahlen beschreiben die molekulare Masse (kDa); Disulfidbrücken sind als -S-S-, nicht-kovalente Bindungen als gestrichelte Linie markiert; mögliche Bindungsstellen der C-terminalen Domäne an die Extrazellulärmatrix (EZM) und vermutete Strukturen von alternativ prozessiertem VEGF-C sind mit einem Fragezeichen markiert.

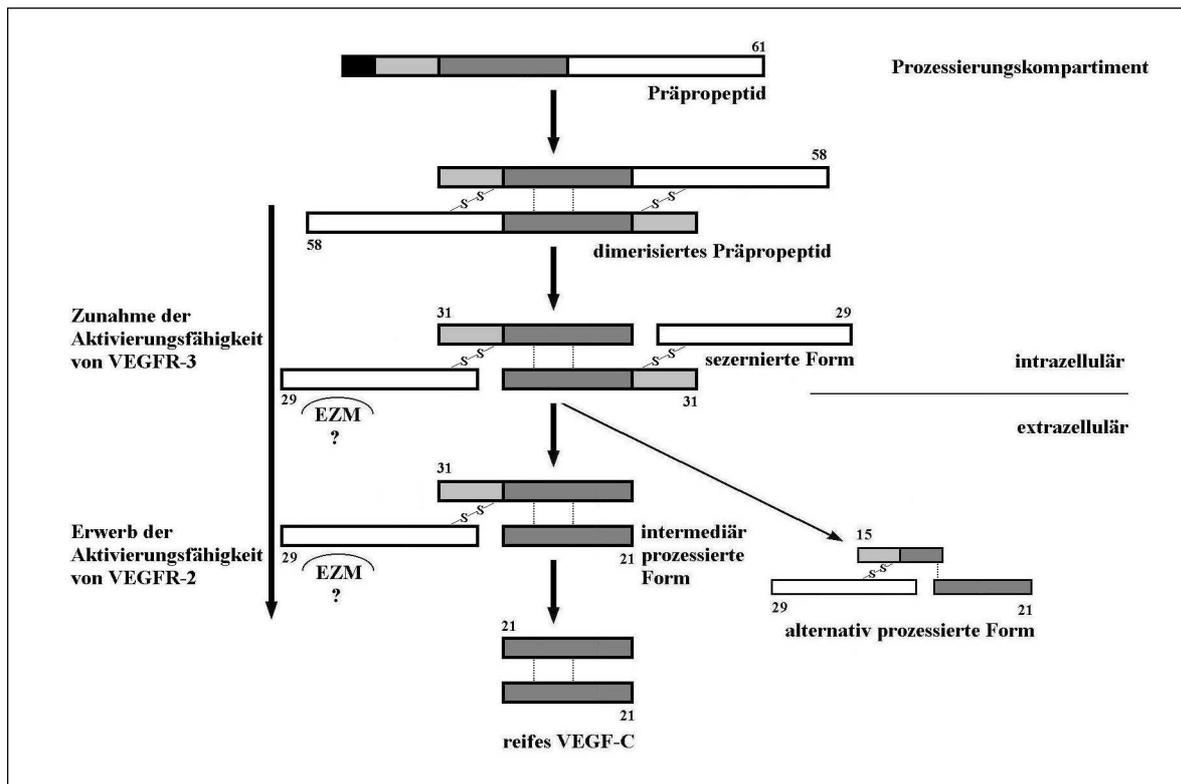


Abb. 1

1.3.4. VEGF-D/VEGF-E

VEGF-D gehört wie VEGF-E zu den erst später entdeckten Mitgliedern der VEGF-Familie.

VEGF-D wurde zunächst als ein c-fos-induzierter Wachstumsfaktor beschrieben und dies führte initial zu dem Namen FIGF (Orlandini, Marconcini et al. 1996; Yamada et al. 1997; Achen et al. 1998). C-fos ist ein Protoonkogen. Das humane VEGF-D-Gen liegt auf dem Chromosom Xp22.31. Die cDNA codiert ein Protein aus 354 Aminosäuren (zu etwa 40% identisch mit VEGF-165), welches nach proteolytischem Splicing als nicht-kovalentes Dimer aus dem N- und C-terminalem Abschnitt sezerniert wird (Stacker, Stenvers, Caesar 1999; Baldwin et al. 2001; Jussila, Alitalo 2002). Es bindet wie VEGF-C an VEGFR-2 und VEGFR-3 und ist ein Mitogen für Endothelien. Es stimuliert sowohl die Angiogenese (Marconcini et al. 1999; Stacker, Stenvers et al. 1999; Clauss 2000; Li, Eriksson 2001) als auch die Lymphangiogenese (Achen et al. 1998, Veikkola et al. 2001) in adulten bzw. in entzündlich veränderten Geweben, bei der Gewebsregeneration und nach Gewebstraumata (Karpanen et al. 2006). VEGF-D wird vor allem in adulten Geweben synthetisiert, hauptsächlich in Lunge, Herz, Skelettmuskel, Colon, Dünndarm und Haut (Partanen 2000;

Baldwin, Roufail, Halford et al. 2001; Baldwin, Catimel et al. 2001; Achen et al. 2001). VEGF-D unterstützt neben VEGF-C die lymphogene Metastasierung von Tumoren (Stacker, Caesar et al. 2001; Scavelli et al. 2004).

VEGF-E wird durch den Parapox-Orf-Virus NZ-7 codiert. Dieser Virus ruft bei Ziegen und Schafen Hautveränderungen hervor (Lyttle et al. 1994; Ogawa et al. 1998; Wise et al. 1999). In den Hautläsionen findet man eine exzessiv gesteigerte Angiogenese kleiner Gefäße sowie fibröse Verkapselungen. Das stützt die Hypothese, dass Endothelzellproliferation und Gefäßpermeabilität gesteigert sind (Clauss 2000; Savory et al. 2000; Byrne et al. 2005). VEGF-E bindet und aktiviert VEGFR-2 und den Neutropilin-1-Rezeptor (Meyer et al. 1999; Wise et al. 1999; Shibuya 2003; Holmes, Zachary 2004).

1.3.5. VEGF-Rezeptoren

VEGF-Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Domäne, die VEGF spezifisch bindet, einer transmembranösen Domäne und aus einer intrazellulären Region, welche eine Tyrosinkinase enthält (Alitalo, Carmeliet 2002; Morabito et al. 2006).

VEGFR-1 ist eine Tyrosinkinase, die Bindungsstellen für VEGF, VEGF-B und PlGF besitzt (Rahimi 2006). Dieser Rezeptor ist auf vaskulären Endothelzellen, Monozyten, Osteoblasten, Makrophagen, Perizyten, glatten Gefäßmuskelzellen und Trophoblastzellen nachweisbar (Eichmann 1993; Gluzman-Poltorak et al. 2001; Zachary, Glikli 2001; Ishida et al. 2001). Auch bekannt als fms-like Tyrosinkinase 1 (Flt-1), besteht VEGFR-1 wie die anderen VEGF-Rezeptoren aus sieben extrazellulär gelegenen Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Gluzman-Poltorak et al. 2001). Bei VEGFR-1 sind die Schleifen zwei und drei in engem Kontakt, wobei VEGF an Schleife zwei bindet. Bei der Ligandenbindung wird eine Autophosphorylierung des Rezeptors induziert. Intrazellulär findet dann die Signaltransduktion statt (Neufeld et al. 1999; Clauss 2000). VEGFR-1 ist nicht nur in der Embryonalentwicklung für die Blutgefäßentwicklung verantwortlich. Es wurde gezeigt, dass VEGFR-1 die Mitoserate in Blutgefäßendothelien steigert. Dies gilt auch für Angiogenesevorgänge in Tumoren, bei der Wundheilung, bei reproduktiven Funktionen und Erkrankungen wie bei diabetischer Retinopathie, rheumatoider Arthritis oder Endometriose

(Fong, Rossant et al. 1995; Hiratsuka et al. 2001; Luttun et al. 2002; Wey et al. 2005). Es gibt auch eine nicht-membrangebundene Form des Rezeptors. Dort bindet VEGF, ohne jedoch die Signalkaskade in Gang zu setzen. Dadurch wird eine überschießende VEGF-Wirkung bei starker Expression verhindert und Überproliferation der Endothelien vermieden (Fong, Zhang et al. 1999; Kearny et al. 2004; Rahimi 2006). Wie auch bei VEGF steigert Hypoxie die Expressionsrate des Rezeptors (Fong et al. 1995; Ferrara, Davis-Smyth 1997; Clauss 2000).

VEGFR-2 kann VEGF, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E binden (Tamela et al. 2005). VEGFR-2, auch als Flk-1 (fetal liver kinase) oder KDR (kinase insert domain-containing receptor) bekannt, weist die gleiche Schleifenstruktur wie VEGFR-1 auf. Dieser Rezeptor wird ebenfalls auf Endothelien in Blutgefäßen exprimiert (Shibuya 2006). Auf der embryonalen Chorionplatte mit Amnionmembran wird der Rezeptor auch in lymphatischen Gefäßen nachgewiesen (Oh et al. 1997). In seiner Funktion verhält sich VEGFR-2 wie VEGFR-1. Die Aktivierung von VEGFR-2 führt zur Auflösung der Basalmembran, Endothelzellproliferation und Endothelzellmigration (Neufeld et al. 1999; Carmeliet 2003). Die Gefäßpermeabilität wird gesteigert (Eliceiri et al 1999). VEGFR-2 beeinflusst die Entwicklung hämatopoetischer Zellen (Asahara et al. 1999; Yamashita, Itoh et al. 2000; Lyden et al. 2001). Eine Blockade der VEGFR-2-Wirkung führt zum Ausbleiben der Angiogenese und unterbindet die Blutzelldifferenzierung (Shalaby et al. 1997). Die Synthese von mRNA für das Rezeptorprotein wird durch IL-1 β gesteigert (Ristimäki et al. 1998).

Flt-4 (fms-like tyrosine kinase 4) ist der Rezeptor VEGFR-3. Er wird hauptsächlich in fetalen venösen und lymphatischen Endothelien gebildet. In adultem Gewebe ist er spezifisch auf Lymphgefäßendothelien und Monozytenvorläuferzellen nachweisbar (Kaipainen et al. 1995; Paavonen et al. 1996; Fitz et al. 1997; Partanen 2000). VEGFR-3 ist als molekularer Marker für Lymphgefäßendothelien nutzbar (Jussila, Valtola et al. 1998; Scavelli et al. 2004; Kreuger et al. 2006). Es sind zwei Isoformen des Rezeptors bekannt: der kurze VEGFR-3s und der lange VEGFR-3l. Beide Formen entstehen durch alternatives Splicing (Jussila, Alitalo 2002). Die molekulare Struktur unterscheidet sich von VEGFR-1 und VEGFR-2 dadurch, dass VEGFR-3 extrazellulär proteolytisch in 2 Disulfid-verbundene Polypeptide gespalten wird (Joukov et al. 1996). An diesen Rezeptor binden VEGF-C und VEGF-D und bewirken die Tyrosin-Phosphorylierung (Jussila, Alitalo 2000; Makinen, Veikkola et al. 2001; Tamela et al. 2005). Die intrazelluläre Signalkaskade induziert Zellwachstum und Lymphgefäßentwicklung (Kaipainen et al. 1995; Paavonen et al. 2000; Veikkola et al. 2001). Wird die Bindung von

VEGF-C und VEGF-D am membranständigen VEGFR-3 unterbunden, kommt es zur Ausbildung eines Lymphödems (Irrthum et al. 2000, Mäkinen et al. 2001). Durch Hemmung von VEGFR-3 kann die lymphogene Tumormetastasierung beeinträchtigt werden (Karpanen et al. 2001; He et al. 2002; Persaud et al. 2004; Roberts et al. 2006).

1.4. Aufbau und Funktion des Lymphsystems

Lymphgefäße beginnen in peripheren Organen als blind endende Kapillaren (Jussila, Alitalo 2002, Scavelli, Weber et al. 2004). Mit Ausnahme von Knorpel, Milzpulpa, Nervensystem, Knochenmark, Thymus, Cornea, Augenlinse und oberflächlichen Hautschichten besitzen alle Bestandteile des Körpers Lymphgefäße (Skobe, Detmar 2000; Junqueira, Carneiro, Gratzl 2005; Schmidt, Thews 2005). Die Lymphkapillaren gehen zentralwärts in netzförmige Leitgefäße über. Diese vereinigen sich zu Transportgefäßen, die über die großen Lymphstämme schließlich in die großen Venen des Körperkreislaufs münden (Pepper, Skobe 2003; Olivier et al. 2004). Lymphgefäße bilden einen Parallelweg zum venösen Schenkel des Körperkreislaufs, stellen aber kein eigenständiges Kreislaufsystem dar. Als Teil des Immunsystems befinden sich Lymphknotenstationen im Lymphgefäßsystem. Es münden jeweils mehrere kleine Lymphgefäße als Vasa afferentia in einen Knoten ein. Im Lymphknoten „gefilterte“ Lymphe wird durch das Vas efferens im Hilus weitergeleitet (Schiebler 2005). Lymphgefäße nehmen proteinreiche Gewebsflüssigkeit auf, die als Summe aus den Kräften von arteriellem Blutdruck und osmotischem Proteindruck zwischen der arteriellen und der venösen Seite der Körperkapillaren resultiert und sich im interstitiellen Raum sammelt (Witte et al. 1997, Scavelli et al. 2004). Zelluläre Bestandteile der Lymphe sind Monozyten und Lymphozyten aber niemals Erythrozyten. Die Rückresorption von gewebeängigen Plasmaproteinen erfolgt über den Lymphstrom (Olivier 2004). Im intestinalen Bereich nimmt Lymphe reichlich resorbierte Lipide auf (Oliver, Alitalo 2005). Fremdkörper wie Bakterien, Staub- oder Kohleteilchen können auch in Lymphgefäße gelangen (Schmidt, Thews 2005). Im Vergleich zu Blut hat Lymphe einen höheren Wassergehalt. Lymphe enthält Fibrinogen und ist gerinnungsfähig. Ein gesunder Erwachsener bildet täglich etwa 2l Lymphflüssigkeit (Junqueira et al. 2005; Schmidt, Thews 2005). Lymphkapillaren haben verglichen mit Blutkapillaren ein größeres Lumen und sind unregelmäßig geformt. Lymphendothelzellen sind stark abgeflacht. Durch Kollagenfasern, die

in Basallaminaresten verankert sind, werden die Lymphkapillaren aufgespannt und das Lumen offen gehalten (Gerli et al. 2000; Jeltsch et al. 2003). Das Endothel überlappt sich dachziegelartig an den Rändern. Stellenweise gibt es Zellkontakte zwischen den Endothelzellen, aber richtige Zonulae occludentes fehlen (Jackson 2001; Scavelli et al. 2004). Kleinen Lymphgefäßen fehlt die Basallamina. Perizyten sind nur vereinzelt vorhanden. Zwischen den Endothelien tauchen zeitweise Lücken auf. Dies ermöglicht in der Füllungsphase den Einstrom eiweißhaltiger Gewebsflüssigkeit (Casley-Smith 1980, Scavelli, Weber et al. 2004). Durch zunehmenden Füllungsdruck legen sich die Endothelzellränder aneinander und die Lymphe wird zentralwärts weitergeleitet. Taschenklappen in den Gefäßen verhindern einen Rückstrom (Trzewik 2001; Karpanen et al. 2006). Wie im Blutkreislauf sorgen die Klappen und die Kompression der Lymphgefäße durch angrenzende Muskeln für einen zentripetal gerichteten Lymphabfluß. Größere Lymphgefäße sind von einer dünnen muskulären Media überzogen (Scavelli et al. 2004). Innerviert werden diese vegetativ. Die großen Trunci und der Ductus lymphaticus ähneln in ihrem Aufbau dünnwandigen weiten Venen (Rauber, Kopsch 1987).

1.5. Lymphangiogenese durch VEGF-C

Die embryonale Lymphangiogenese ist anhand der Avian-Chorioallantoic-Membran nachvollziehbar (Ribati et al. 2001). Mittels in-situ-Hybridisierung von VEGF-C mRNA in Mausembryonen ist eine organbezogene Zuordnung der Proteinsynthese möglich. Die mRNA von VEGF-C wird bei 8,5 Tage alten Embryonen im nichtneuralen Kopfmesenchym, entlang der Somiten und an der Schwanzregion nachgewiesen. Extraembryonal wird sie im Allantois gebildet. Ein identisches Verteilungsmuster zeigt die in-situ-Hybridisierung von VEGFR-3-mRNA. Gleiches gilt für 12,5 Tage alte Embryonen. Hier sind prominente mRNA-Spiegel im Mesenchym um die wachsende Nachniere und in der Jugularregion nachweisbar. In späteren Stadien der Entwicklung werden diese beiden Proteine, VEGF-C und VEGFR-3, vor allem im Mesenterialbereich gebildet (Kukk et al. 1996; Lymboussaki 1999). Das Mesenterium des Erwachsenen ist daher besonders reich an Lymphgefäßen. Neurales Gewebe bleibt frei von Lymphgefäßen (Wilting 1999; Wilting 2001). Auffällig ist, dass Transkripte von VEGF-C bereits am 7. Tag post conceptionem gesehen werden, während VEGFR-3-mRNA erst an Tag 8,5 p. c. nachweisbar ist. Der zweite Rezeptortyp, an den VEGF-C binden kann, VEGFR-2,

ist zu diesem frühen Zeitpunkt bereits nachweisbar. Die VEGF-C/VEGFR-2-Interaktion bildet möglicherweise die Grundlage für die nachfolgende Lymphangiogenese (Byrne et al. 2005). Dies stützt die Hypothese, dass sich Lymphgefäße ursprünglich aus venösen Gefäßen entwickeln (Sabin 1902; Wigle, Harvey et al. 2002, Hong et al. 2004, Tammela et al. 2005). Dass die VEGF-C/VEGFR-3-Interaktion essentiell und ursächlich für die Lymphangiogenese ist (Clauss 2000, Detmar 2000), wird bei Blockade dieser Interaktion bzw. Überexpression der Proteine verdeutlicht. Transgene Mäuse, die einen nicht-membrangebundenen VEGFR-3 bilden können, zeigen eine Regression ihrer Lymphgefäße während der Embryonalentwicklung, da der Wachstumsfaktor VEGF-C bereits vor Aktivierung des membranständigen Rezeptors abgepuffert wird. Blutgefäße werden in ihrer Entwicklung nicht beeinträchtigt und zeigen einen normalen Aufbau. Fällt die hemmende Wirkung des löslichen VEGFR-3 weg, bilden sich auch im adulten Organismus neue Lymphgefäße aus (Mäkinen 2001). Fehlt Mäusen das VEGF-C-Protein, so differenzieren sich deren Endothelzellen auch zu lymphatischen Endothelien, es unterbleibt jedoch die Aussprossung und Formierung von Lymphgefäßen (Karkkainen et al. 2004). Wird in Knock-out-Mäusen VEGFR-3 vollkommen blockiert, sind die Individuen nicht lebensfähig und sterben. Vaskulo- und Angiogenese finden statt, aber eine Ausdifferenzierung zu Lymphgefäßen bleibt aus. Durch ubiquitären Lymphstau kommt es zur tödlichen Herzbeutelamponade (Dumont 1998). Chorionmembranen sind bereits physiologisch von einem dichten Lymphgefäßnetz überzogen. Lokale Applikation von VEGF-C-Protein bewirkt ortsspezifisch eine weitere Zunahme der Lymphgefäßdichte. Die Anzahl neugebildeter Lymphgefäße verhält sich proportional zur Menge applizierten Proteins (Oh et al. 1997; Cao, Linden et al. 1998). Überexpression von VEGF-C in transgenen Mäusen führt nicht nur zur Endothelzellproliferation und Vermehrung von Lymphgefäßen, sondern auch zu einer Größenzunahme des Lumens dieser Gefäße (Jeltsch 1997).

1.6. VEGF-C und lymphogene Tumormetastasierung

Eine Reihe von Untersuchungen zeigte, dass eine Vielzahl von Tumoren VEGF-C exprimiert (He, Karpanen et al. 2004). Dazu gehören Karzinome von Brust (Salven et al. 1998; Kurebayashi et al. 1999; Valtola et al. 1999; Skobe et al. 2001), Kolon (Andre 2000, Akagi, Ikeda, Miyazaki et al. 2000, Wang et al. 2005, Xu et al. 2006), Lunge (Niki, Iba et al. 2000;

Ohta et al. 2000, Arinaga et al. 2003, Tamura et al. 2003), Prostata (Tsurusaki 1999; Li 2004; Zeng et al. 2004; Wong et al. 2005; Kaushal et al. 2005; Roma et al. 2006), Schilddrüse (Fellmer et al. 1999; Bunone, Vigneri et al. 1999; Shushanov 2000), Pankreas (Tang 2001; Mandriota et al. 2001) und Magen (Yonemura, Endo, Fujita et al. 1999; Yanai et al. 2001; Liu et al. 2004; Kondo et al. 2007). Teilweise ist im Ursprungsgewebe dieser Tumoren die Menge an gebildetem VEGF-C niedrig, während sie im Tumor stark erhöht ist (Mandriota 2001; Karkainen et al. 2002; He et al. 2005). Im lymphatischen Endothel in der Umgebung dieser Tumoren ist eine gesteigerte Bildung von VEGFR-3 nachweisbar (Pytowski et al. 2005). Dort, wo hohe Level von VEGF-C mRNA nachgewiesen werden, korreliert die lymphogene Metastasierungsrate mit der Menge detektierter mRNA (Fellmer et al. 1999; Kurebayashi, Otsuki et al. 1999; Bunone et al. 1999; Yonemura 1999; Akagi et al. 2000; Ohta et al. 2000; Karpanen, Alitalo 2001). Auch beim Prostatakarzinom ist der Level von VEGF-C mRNA in der Gruppe Lymphknoten-positiver Patienten signifikant höher als in der Gruppe Lymphknoten-negativer (Tsurusaki 1999). Vergleicht man VEGF-C überexprimierende Brusttumorzellreihen mit Kontrolltumoren, so bewirkt die VEGF-C-Überexpression eine Erweiterung peritumoraler Lymphgefäße und eine gesteigerte Proliferation intratumoraler Lymphgefäße. Dadurch steigt die Metastasierungsrate in regionale Lymphknoten um mehr als 60% (Skobe, Hawighorst et al. 2001; Padera, Kadambi et al. 2002; Hoshida, Isaka, Hagendoorn et al. 2006). Durch einen Marker spezifisch für Lymphendothelien, LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor) (Banerji 1999; Pepper 2001; Prevo 2001), kann gezeigt werden, dass sich in diesen neugebildeten intratumoralen und erweiterten peritumoralen Lymphgefäßen lose Tumorzellen befinden (Skobe et al. 2001; Karpanen 2001, Padera et al. 2002). Es ist nachgewiesen, dass bei Patienten mit Magenkarzinomen eine hohe Expression von VEGF-C die Prognose im Gegensatz zu niedriger Expression signifikant verschlechtert (Wang et al. 2007). Nach Invasionstiefe und Lymphknotenstatus rangiert der VEGF-C-Level auf Rang drei als unabhängiger Risikofaktor für die Prognose des Magenkarzinoms (Yonemura et al. 1999). Eine ähnliche Prognoseverschlechterung bewirkt ein hoher VEGF-C-Gewebespiegel beim kleinzelligen Lungenkarzinom (Kajita et al. 2001). Wird die VEGF-C-Wirkung durch einen löslichen VEGFR-3-Antikörper blockiert, so sind Tumoren nicht mehr in der Lage, sich mit Lymphgefäßen zu versorgen (Makinen, Jussila et al. 2001; Mattila et al. 2002; He et al. 2002; Roberts et al. 2006). Es resultiert eine Unterdrückung des Tumorwachstums, ohne dass die normale Lymphgefäßfunktion im Umgebungsgewebe beeinträchtigt wird (Achen et al. 2006). Daraus folgt, daß vor allem die Neuentwicklung von Lymphgefäßen im Rahmen der Embryogenese und

Tumorneolymphangiogenese abhängig von der VEGFR-3-Ligandenfunktion ist (Kubo, Fujiwara, Jusila 2000; Mäkinen et al. 2001; Karkkainen, Mäkinen et al. 2002; Achen 2005; Karpanen et al. 2006).

1.7. Prostatakarzinomzellen PC 3 mit Luciferase

Das Prostatakarzinom ist ein maligner Tumor, der meist von den Epithelien der peripheren Drüsenanteile ausgeht. Betroffen sind Männer vor allem in höherem Alter. Das Prostatakarzinom ist nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste Krebstodesursache des Mannes (Parke et al. 1996; Lara et al. 2004; Society of American Cancer 2005; Hautmann, Huland 2006). Zu 98% entsteht das Prostatakarzinom aus dem Drüsenepithel und ist demnach ein Adenokarzinom. Es tritt meist multifokal auf. Die Lymphknoten der Fossa obturatoria sind bei der Metastasierung als erste betroffen, später auch juxtaregionäre Lymphknoten (Wong, Haack, Crowley et al. 2005). Der Tumor metastasiert bevorzugt lymphogen (Tsurusaki et al. 1999; Karpanen, Alitalo 2001). Erst später streut er auch hämatogen. Häufig bilden sich osteoblastische Skelettmetastasen im Lendenwirbel-/Kreuzbeinbereich sowie im Becken (Reynolds, Kyprianou 2006). Diagnostisch wertvoll sind die transrektale Tast- und Sonographieuntersuchung mit eventuell kombinierter Biopsieentnahme. Als Tumormarker bietet sich das prostataspezifische Antigen (PSA) an. Therapeutisch finden chirurgische Resektion und antiandrogene Therapien Anwendung; Bestrahlung und Chemotherapie sind nicht ausreichend wirksam (Riede, Böcking 2004; Hautmann, Huland 2006).

Die Zelllinie PC-3 stammt vom humanen androgen-unabhängigen Prostataadenokarzinom ab. Sie verursacht lokale als auch lymphogen-metastatisch entstandene Tumoren nach orthotopischer Implantation in die Prostata von Nacktmäusen (Stephenson et al. 1992). Aus der PC-3-Zelllinie wurde 1996 erstmals das VEGF-C-Protein isoliert und dessen cDNA kloniert (Joukov et al. 1996). Seitdem ist diese Zelllinie ein wichtiger Bestandteil in der Erforschung der biologischen Aufgaben von VEGF-C und VEGFR-3 (Tsurusaki et al. 1999; Zeng et al. 2004).

Luciferase ist ein Enzym, welches bei Leuchtkäfern gefunden wurde. Es katalysiert die Oxidation von Luciferin unter Verbrauch von Adenosintriphosphat und Coenzym A. Dabei

entstehen Licht und Sauerstoff. In Säugetierzellen ist das Enzym nicht nachweisbar. In einem Chemilumineszenz-Assay mit sehr lichtsensitiven Instrumenten kann Luciferase ab einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-19}$ mol/l nachgewiesen werden. Im pRC/CMV-luc-Plasmid steht das Luciferase-Gen des *Photinus pyralis* unter transkriptionaler Kontrolle des Cytomegalievirus-Promotors. Durch stabile Transfektion dieses Plasmids in PC-3-Zellen entsteht eine menschliche Karzinomzelle, die kontinuierlich Luciferase bildet. Das Licht einer lumineszenten Tumorzelle ist unter 10^7 unmarkierten PC-3-Zellen nachweisbar. Das ermöglicht die Detektion einer einzigen metastatisch versprengten Prostatakarzinomzelle in einem Lymphknoten (Rubio et al. 1998; Rubio et al. 2000). Andere derart sensitive Methoden zum Nachweis von Tumorzellen, z. B. die PCR-gestützte Detektion tumorspezifischer mRNA oder repetitiver DNA-Sequenzen, sind wesentlich aufwändiger, störanfälliger und kosten- bzw. zeitintensiver.

1.8. Antisense-RNA

Die Idee, dass kurze Segmente synthetisch hergestellter Nucleinsäureketten (DNA oder RNA) als spezifische Inhibitoren der Genexpression nutzbar sind, wurde 1967 publiziert (Belikova et al. 1967). In Prokaryonten wurden natürliche Inhibitoren der Genexpression in Form von RNA-Molekülen nachgewiesen (Mizuno 1984; Jorgensen 1990; Fire et al. 1998). Um in die natürliche Verarbeitung genetischer Informationen einzugreifen, bringt man synthetisch hergestellte Nucleinsäuresequenzen mit Hilfe eines Vectors in die Zielzelle ein. Als Vector kann ein Plasmid (= ringförmiges DNA-Molekül) genutzt werden (Mercola 1995). Von einem mRNA-Molekül der „therapeutischen“ Nucleinsäurefrequenz des Vector werden bis zu 5000 Proteinkopien hergestellt. Daraus resultiert eine effiziente Möglichkeit der Beeinflussung des Zellstoffwechsels (Popescu 2005).

Als Vektor dient in dieser Arbeit das Plasmid pCEP4. Die „therapeutische“ Nucleinsäuresequenz ist zur natürlichen mRNA komplementär, wie es bei zwei DNA-Strängen, die sich nach dem Prinzip der Watson-Crick-Basenpaarung zu einer Doppelhelix verbinden, der Fall ist (Dallas, Vlassov 2006). Ist das Plasmid in die Zelle gelangt, wird diese Antisense-Sequenz transkribiert. Es entsteht eine Antisense-mRNA, die mit der natürlichen mRNA hybridisiert und durch die Bildung einer Doppelhelix die Translation der Ziel-mRNA

verhindert (Ho 1997). In dieser Arbeit richtet sich die Antisense-Sequenz gegen die mRNA, die das Protein VEGF-C kodiert. Zusätzlich zur Translationsunterbrechung bewirkt die doppelsträngige RNA eine Aktivierung von RNase III, die diese Helices spaltet und damit beide RNA-Typen zerstört (Zhang 1996; Popescu 2005; Dallas, Vlassov 2006).

Die Methode, eine Antisense-RNA zu benutzen um verschiedene Zielproteine zu treffen, kann besonders in der Onkologie genutzt werden. Geeignete Zielproteine sind Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sowie Substanzen, die für das invasive Potential der Tumorzellen verantwortlich sind, bzw. Proteine, die direkt in den Ablauf des Zellzyklus eingreifen (Weiss, Davidkova 1999, Liekens et al. 2001).

1.9. Ziele dieser Arbeit

Die embryonale Lymphangiogenese ist abhängig von der VEGF-C/VEGFR-3-Interaktion. In Tumoren und deren Lymphknotenmetastasen wird eine überhöhte Expression von VEGF-C und von VEGFR-3 nachgewiesen. Die Lymphangiogenese in Tumoren wird wie bei der Embryonalentwicklung durch VEGF-C gesteuert. Bildet ein Tumor viel VEGF-C, so nimmt die Zahl intra- und peritumoraler Lymphgefäße zu. Der Tumor entwickelt also ein eigenes Lymphgefäßnetz und findet mit dessen Hilfe Anschluß an das körpereigene Gefäßsystem, um auf diesem Weg zu metastasieren.

Das Prostatakarzinom gehört zu den lymphogen metastasierenden Tumoren. Die Zelllinie PC-3 wird in dieser Arbeit mit einem Plasmid transfiziert, durch das Antisense-RNA für VEGF-C-kodierende RNA in die Zellen gelangt. Es soll in vitro gezeigt werden, in welchem Ausmaß durch die Antisense-Methode die Bildung des VEGF-C-Proteins unterdrückt wird. Gelingt laborexperimentell der Nachweis der VEGF-C-Hemmung, ist eine Übertragung des Modells auf die in-vivo-Situation möglich. Folge der VEGF-C-Hemmung sollte nach oben genannter These ein Stop der lymphogenen Metastasierung sein. Durch Messung der Luciferaseaktivität könnte das Verteilungsmuster und somit die Metastasierungsrate der Tumorzellen in vivo sehr sensitiv beurteilt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Mikroorganismen

PC-3-luc-Zellen (Prostatakarzinomzellen mit dem Plasmid pRC/CMV-luc), bezogen über
Dr. J. Blanco, Department of Cell Biology, Institut Recerca Oncologica,
Hospital Duran i Reinal, Autovia Castelldefels Km. 27,
L'Hospitalet del Llobregat, 08907 Barcelona, Spanien

PC-3-Zellen (Prostatakarzinomzellen), bezogen über Dr. J. Blanco

HEK-293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen), bezogen über Dr. W. Dirks,
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen,
Braunschweig

E. coli-Bakterien, enthalten im Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (*Fa. Invitrogen*)

2.1.2. Chemikalien, Enzyme, Filtermembranen und Reagentiensätze („Kits)

Fa. Amersham pharmacia biotech (Uppsala, Schweden): EBV-Reverse-Primer, Gel-Elektrophorese-Apparat 100, First Strand cDNA Synthesis Kit, ECL Western blotting detection reagents und analysis System, Hybond ECL Membran, Hybond N Membran, Hybond NX Membran, Full Range Rainbow RPN 800, pCEP-Forward-Primer, G3PDH-Forward-Primer, G3PDH-Reverse-Primer, VEGF-C-18-Forward-Primer, VEGF-C-18-Reverse-Primer, VEGF-C-19-Forward-Primer, VEGF-C-19-Reverse-Primer, VEGF-C-22-Forward-Primer, VEGF-C-22-Reverse-Primer

Fa. Bio-Rad Laboratories (München): Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, SmartSpec 3000-Spectrometer, Power Pac 3000, Protein-Assay

Fa. Boehringer (Mannheim): Geneticin G 418, DNase I (RNase-frei), RNase (DNase-frei), Restriktionsendonuclease Kpn I, T4-DNA-Ligase

Fa. Clontech Laboratories (Paolo Alto, USA): Human, Rat, Mouse G3PDH (0,45kb) Control Amplimer Set

Fa. Gibco BRL (Karlsruhe): 1 Kb Plus DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder, DMEM, Nutrient-Mixture F-12 (Ham), FCS, Trypsin-EDTA, Agarose

Fa. Invitrogen (Carlsbad, USA): TOPO TA Cloning, pCEP4, Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Top10F One Shot Kit, pCEP4/CAT

Fa. Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA): Peroxidase-conjugated AfiniPure Rabbit Anti-Goat IgG

Fa. Macherey-Nagel (Düren): Nucleospin RNA II

Fa. Millipore (Bedford, USA): Immobilon P Transfer Membran

Fa. Nunc (Naperville, USA): Lab-Tek Chamber Slides

Fa. Promega (Madison, USA): Nuclease-Free Water

Fa. Qiagen (Hilden): QIAprep Miniprep, Superfect Transfection Reagent, Qiaquick Spin für PCR Purification und Gel Extraktion, Qiagen Plasmid Midi und Maxi, Taq PCR Master Mix, SuperFect Transfection

Fa. Roche (Mannheim): CAT Elisa, DIG-High-Prime-DNA-Labeling

Fa. Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg): VEGF-C (N-19) sc-7133, VEGF-C (H-190) sc-9047, anti-rabbit IgG-HRP, anti-goat IgG-HRP, Aktin (I-20) sc-8536

Fa. Serva (Heidelberg): Depex

Fa. Sigma (Saint Louis, USA): Triton, DOC, Gel Loading Solution, Lysozym

Fa. Stratagene (La Jolla, USA): kb DNA ladder, Lambda/Hind III- Φ X174/Hae III Marker

Fa. Tetenal Photowerk (Norderstedt): Röntgenfilmentwickler, Röntgenfilmfixierer

Fa. Vector Laboratories (Burlingame, USA): Vectastain ABC Kit

Fa. Zymed Laboratories (San Francisco, USA): Rabbit anti-VEGF-C , Rabbit anti-VEGF-C Inhibitor Peptid

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultivierung

Das Kulturmedium (Lagerung bei 4°C) für HEK-293-Zellen bestand aus:

- 45% DMEM
- 45% Nutrient-Mixture F-12
- 10% FCS (wurde zuvor bei 56°C im Wasserbad für 30min inaktiviert)

Für eine 50ml große Kulturflasche (Fa. Nunc) wurden 4ml dieses Mediums im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Bei jedem Mediumwechsel (je nach Konfluenzgrad der Zellen alle 24 Stunden bis zu drei Tagen) wurden die am Flaschenboden adhärenen Zellen einmal mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das vorgewärmte Kulturmedium zugefügt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

Das Kulturmedium für PC-3-luc-Zellen enthielt weiterhin Geneticin, dessen Resistenzgen durch das Plasmid pRC/CMV codiert war, zur Kontaminationsprophylaxe durch Bakterien in einer Konzentration von 500µg/ml.

Dem Kulturmedium für PC-3-luc-Zellen, die mit dem Plasmid pCEP4 oder pCEP4/CAT transfiziert waren, wurde zur Selektion Hygromycin B in einer Konzentration von 150µg/ml zugefügt. Vergleiche hierzu Abschnitt 2.2.8. und 3.3.1.

Zur Aufteilung konfluent bewachsener Kulturflaschen wurden die Zellen zwei Mal mit PBS-Puffer gewaschen. Nach fünf Minuten Inkubation mit 1ml 37°C warmer Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen in 11ml frischem Medium suspendiert und auf drei neue Kulturflaschen aufgeteilt.

Zur Lagerung bei -80°C wurde ein durch Zentrifugation gewonnenes Zellpellet in 70% Medium, 20%FCS (inaktiviert) und 10% DMSO resuspendiert.

2.2.2. RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA erfolgte nach den Anweisungen des RNeasy Mini-Kits (Protokoll für tierische Zellen) (*Fa. Qiagen*). Aus einer Zellsuspension, vgl. Kapitel 2.2.1., wurde durch Zentrifugation ein Zellpellet gewonnen und in 350µl RLT-Puffer mit 5µl β-Mercaptoethanol aufgelöst. Mehrmaliges Aufziehen der Zellsuspension durch eine 22G Kanüle bewirkte die vollständige Lyse der Zellen und Scheren der DNA. Nach Zugabe von 350µl 70% Ethanol gab man die Mischung auf eine RNeasy Mini Spinsäule und zentrifugierte sie bei 8000g eine Minute. Die jetzt an das Austauscherharz der Säule gebundene RNA wurde bei 8000g eine Minute mit 700µl RW 1-Puffer gewaschen. Danach wurden 500µl RPE-Puffer (mit nach Kit-Anweisung zugemischtem 100% Ethanol) zugegeben und wiederum wurde eine Minute bei 8000g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt mit einer Zentrifugationszeit von zwei Minuten, um die Membran der Säule zu trocknen. Die RNA konnte nun mit 50µl RNase-freiem Wasser bei 8000g für eine Minute in ein autoklaviertes Eppendorf-Tube eluiert werden. Die RNA-Konzentration der Probe wurde im Photometer bei 260 und 280nm gemessen.

2.2.3. Reverse Transkription

Die Reverse Transkription mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion stellt eine einfache Methode dar, mRNA qualitativ und teilweise auch quantitativ zu bestimmen.

Eine Reverse-Transkriptase synthetisiert aus den Nukleotiden dATP, dCTP, dGTP, dTTP und einem Primer ein zu einem mRNA-Einzelstrang komplementären Strang. Das Ergebnis ist ein RNA:cDNA-Doppelstrang.

Nach den Anweisungen des First-strand cDNA Synthesis Kit von *Amersham Pharmacia Biotech* wurde 1µg RNA in 8µg Rnase-freiem Wasser gelöst und zehn Minuten bei 65°C denaturiert. Durch schnelle Kühlung auf Eis blieben die linearen Einzelstränge der RNA erhalten. Für die Transkription wurde eine Reverse-Transkriptase aus dem Retrovirus Moloney murine leukemia Virus genutzt. Als Primer bediente man sich eines Poly-Thymidin-Primers, der am Poly-A-Schwanz der mRNA inseriert. Die Reaktion lief bei 37°C in einem für das Enzym optimalen Puffer.

Reaktionsansatz für Reverse Transkription:

- 5µl Bulk First-Strand Reaction Mix
- 1µl Not I-d(T)₁₈ (5µg)
- 1µl DTT (200mM in wässriger Lösung)
- 8µl der hitzedenaturierten RNA

Das Produkt wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.2.4. PCR und DNA-Gelelektrophorese

Die Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt mit Hilfe einer thermostabilen PCR-Polymerase und einem spezifischen Primerpaar eine gewünschte Sequenz eines einsträngigen DNA-Stückes. Dies ist sowohl mit DNA in cDNA-, als auch mit DNA in Plasmid-Form möglich. Das Ergebnis ist ein doppelsträngiges DNA-Stück, welches einer genauen Kopie der ursprünglichen Matrix entspricht; die Endbereiche spiegeln die Sequenz der eingesetzten

Primer wider. Durch Denaturierung werden die Doppelstränge erneut getrennt und dienen als Vorlage für eine neue Kopie.

Die hier genutzte Taq-PCR-Polymerase übersteht die hohen Temperaturen (bis 95°C) nahezu unbeschadet. Es reichen 30-35 Zyklen dieser Kettenreaktion aus, um eine ausreichende DNA-Menge zu synthetisieren.

Die PCR wurde mit Hilfe des Qiagen Master Kits durchgeführt.

Reaktionsansatz für PCR:

- 25µl Taq PCR Master Mix
- 0,5µl Primer Forward (entspricht 20pmol)
- 0,5µl Primer Reverse (entspricht 20pmol)
- 23µl destilliertes Wasser
- 1µl Template-DNA

Dieser Ansatz wurde in einem Eppendorf-Tube gut gemischt und mit 50µl Mineralöl überschichtet, um eine Verdunstung zu verhindern. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne Template-DNA, um eine Reaktion der Primer untereinander oder DNA-Kontaminierung auszuschließen. Im PCR-Cycler wurde die PCR bei folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturation: 4min bei 94°C

PCR-Zyklus: 35 Wiederholungen: -Denaturation: 1min bei 94°C

-Primeranlagerung: 0.5min bei 55°C

-Synthese: 0.5min bei 72°C

Abschließende Verlängerung: 10min bei 72°C

Das Produkt wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde in einem Agarosegel über Größenanalyse im Vergleich zu einem DNA-Basenpaarstandard überprüft. Für Fragmente größer als 1000 Basenpaare wurde ein 2%iges, für Fragmente, die aus weniger als 1000 Basenpaaren bestanden, ein 1%iges Agarosegel benutzt. Dazu wurde Agarosepulver in entsprechender

Menge einfacher TBE-Lösung gekocht und nach Zugabe von 1µg Ethidumbromid/ml auf den Elektrophoreseschlitten gebracht. Nach dem Abkühlen konnten 5µl der PCR-Probe gemischt mit 2,5µl Gel Loading Solution neben dem Standard aufgetragen und im elektrischen Feld bei 100V aufgetrennt werden. Dabei lagerte sich Ethidiumbromid an die DNA an, leuchtete unter UV-Licht auf und ermöglichte eine Analyse der aufgetrennten DNA entsprechend des Standards.

2.2.5. One-Shot-Transformation und Bakterienkultur

Unter Transformation versteht man das Überführen von Plasmiden in „kompetente“ Bakterien. Die hier verwendete Methode nennt sich Heat-Shock-Transformation. Bei jeder Zellteilung der Bakterien wird das Plasmid wie ein Chromosom verdoppelt.

Zu einem Aliquot kompetenter *E. coli* aus dem Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Top 10) (*Fa. Invitrogen*) fügte man 2µl 0.5M β-Mercaptoethanol sowie 0.5µg Plasmid hinzu und kühlte 30min auf Eis. Danach erfolgte der „Heat-Shock“ für 30 Sekunden bei 42°C. Es folgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis. Mit 250µl zimmerwarmen SOC-Medium wurden die Bakterien eine Stunde im Rotationsinkubator bei 37°C und 300rpm kultiviert. Dann hatten die Bakterien das Plasmid in ausreichender Menge aufgenommen und in ihren Zellstoffwechsel integriert. In einem Selektionsmedium, welches Ampicillin in einer Konzentration von 50mg/l enthielt, wurden nur plasmidtragende *E. coli* kultiviert, da mit dem Plasmid eine Ampicillinresistenz übertragen worden war. Als Negativkontrolle dienten Bakterien, denen anstelle von Plasmidlösung im Heat-Shock-Experiment nur Wasser zugefügt wurde. Diese Bakterien zeigten auf dem Ampicillin-Agar kein Wachstum.

Der Selektionsagar bestand aus 32g LB-Agar auf 1l Wasser. Er wurde durch Autoklavieren sterilisiert und nach Zugabe von 50mg Ampicillin auf Agar-Platten ausgegossen. Zur Selektion eines Bakterienklones von den Agarplatten wurde dieser in einem Flüssigmedium aus 20g LB Broth Base und 50mg Ampicillin auf 1l Wasser über Nacht im Rotationsinkubator bei 37°C und 300rpm kultiviert. Zur Konservierung wurde ein Teil dieser Lösung mit einem Aliquot Glycerol gemischt und bei -80°C gelagert.

2.2.6. Plasmid-Präparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Die Methode des „Boiling-Prep“ (Maniatis et al. 1982) diente dem Screening von Bakterienkolonien, ob sie das gewünschte Plasmid enthielten. Der Plasmid Midi Kit (Fa. Qiagen) wurde benutzt, um größere Mengen bekannten Plasmids für weitere Anwendungen zu gewinnen.

Für den Boiling-Prep wurde jeweils eine Kolonie in 2ml LB-Medium aufgenommen und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10.000rpm für 10min wurde das Bakterienpellet vom Überstand getrennt und in 350µl STET-Puffer und 25µl Lysozymlösung gelöst.

STET-Puffer:

- 0.1M Natriumchlorid
- 10mM Tris-Cl (pH 8.0)
- 1mM EDTA (pH 8.0)
- 5% Triton X-100

Die Lysozymlösung setzte sich aus 10mg Lysozym gelöst in 1ml 10mM Tris-Cl (pH 8.0) zusammen und lagerte bei -20°C.

Die Zellsuspension wurde für 40 Sekunden im Wasserbad gekocht und bei 12.000rpm 10min zentrifugiert. Nun wurde das Pellet, bestehend aus verdauten Zellresten, verworfen. Im Überstand gelöstes Plasmid wurde mit 40µl 2,5M Natriumacetat (pH 5.2) und 420µl Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 4°C für 5min bei 12.000rpm wurde das Plasmid-enthaltende Pellet isoliert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50µl TE-Puffer (pH 8.0) resuspendiert.

Im Plasmid Midi Kit wurde die gewünschte plasmidtragende E. coli-Kolonie in 100ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 300rpm inkubiert und bei -4°C bei 4000rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Bakterienpellet in 4ml P1-Puffer des Kits inklusive RNase A gelöst. Durch Zugabe von 4ml P2-Puffer wurden die Bakterien bei 21°C in 5min lysiert. Dann präzipitierten 4ml P3-Puffer bei 4°C für 15min Proteine und

Zelltrümmer. Mit Hilfe eines Papierfilters wurden diese abgetrennt und das Eluat auf einen mit QBT-Puffer äquilibrierten Qiagen-Tip gebracht. Während des Durchflusses banden sich DNA-Plasmide an den Anionentauscher in der Säule. Nach zweimaligem Waschen mit je 10ml QC-Puffer konnte DNA mit 5ml QF-Puffer eluiert werden. Die Zugabe von 3,5ml Isopropanol präzipitierten die Plasmide bei 1500rpm für 30min in der 4°C kalten Zentrifuge. Nach Entfernen des Überstands konnte das Pellet mit 2ml 70%Ethanol gewaschen werden. Erneute Zentrifugation (10min 15000rpm). Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 200µl TE-Puffer (pH 8.0) gelöst. Die Konzentration der Probe konnte im Spectrometer bei 260nm und 280nm ermittelt werden.

Gelagert wurde die Probe bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C.

2.2.7. Enzymatisch gesteuerter Einbau von PCR-Sequenzen in Plasmide

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die in der Lage sind, eine bestimmte Abfolge von Nukleotidpaaren auf einer Doppelstrang-DNA zu erkennen und diese in einer spezifischen Art zu trennen. Das pCEP4-Plasmid der Firma *Invitrogen* besitzt DNA-Sequenzen, an denen die Restriktionsendonucleasen Bam HI und Kpn I ansetzen und schneiden können. Diese liegen zwischen dem Transkriptionsstart initiiert durch den pCEP Forward Primer und dem EBV Reverse Primer. Vergleiche hierzu Abbildung 2 und Abbildung 3.

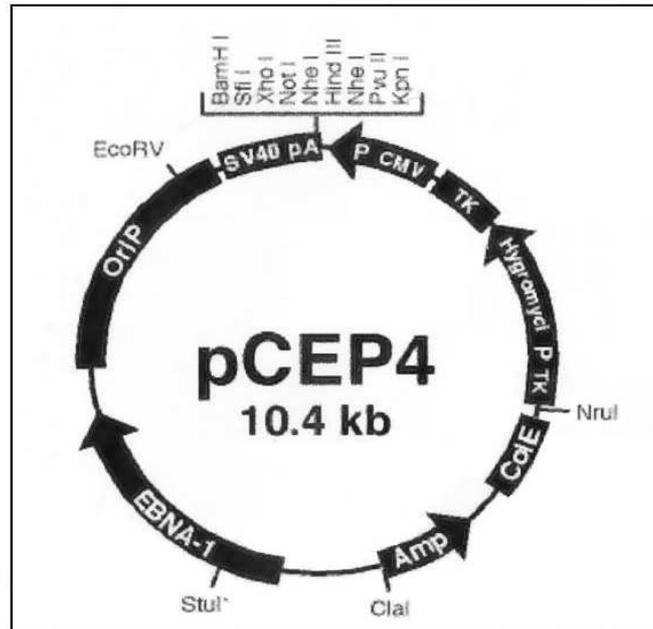


Abb. 2

Abb. 2:

Schematische Darstellung des Plasmids pCEP4 (*Fa. Invitrogen*).

Der Klonierungsbereich des Plasmids (Basen 406 bis 466) befindet sich zwischen dem SV 40-Poly-A-Signal (Basen 7 bis 405) und dem CMV-Promotor (Basen 467 bis 1311). Ausserdem enthält pCEP4 Resistenzgene gegenüber den Antibiotika Hygromycin (Basen 1844 bis 2893) und Ampicillin (Basen 3635 bis 5526).

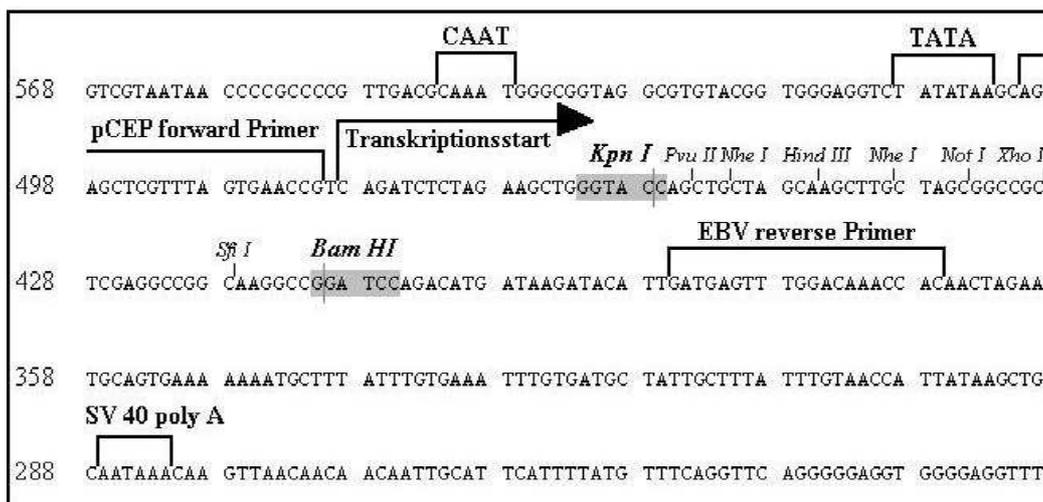


Abb. 3

Abb. 3:

Lineare Darstellung des Plasmids pCEP4 von Base 568 bis Base 219 (*Fa. Invitrogen*).

Zu erkennen sind die Angriffssequenzen der Restriktionsenzyme Kpn I und Bam HI sowie die Bindungsstellen für die Primer pCEPForward und EBV Reverse.

Bam HI reagiert mit der Basensequenz (5')G'GATC_C(3') und Kpn I mit (5')G_GTAC'C. Das kreisförmige Plasmid wird durch einen Restriktionsendonukleasenverdau linearisiert, es entsteht also eine Lücke. Dazu passend fügen sich Primer für das VEGF-C-Gen ein, die an ihrem 5'-Ende einige Nukleotide haben, die durch Bam HI bzw. Kpn I erkannt werden können. So ist es möglich, durch eine PCR DNA-Doppelstränge zu synthetisieren, die an beiden Enden durch Bam HI oder Kpn I erkannt und so geschnitten werden können, dass die Enden genau zu den überhängenden Enden des verdauten Plasmids passen (vergleiche Abbildung 6 in Kapitel 3.2).

Eine DNA-Ligase verbindet DNA-Sequenzen miteinander, wenn deren überhängende Enden komplementäre Basenabfolgen aufweisen. Ein durch Restriktionsendonukleasen passend zurechtgeschnittenes DNA-Stück wird so z.B. in die lineare Doppelstrangstruktur eines zuvor ebenfalls zerschnittenen Plasmids eingefügt. Es entsteht erneut ein kreisförmiges Plasmid mit inokuliertem gewünschtem Teilstück, welches beispielsweise einer durch PCR gewonnenen Gensequenz entspricht. Damit wird eine gewünschte DNA-Sequenz in den Zellstoffwechsel dauerhaft integriert. Die hier benutzte Ligase ist das Enzym T4 der Firma Boehringer.

Jeweils 20U der Restriktionsenzyme und 100µg/ml Bovines Serum Albumin wurden mit 10µg Plasmid in einem Puffer gemischt, der für beide Enzyme eine optimale Zusammensetzung bot (L-Puffer der Firma Boehringer). Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C wurde zur Kontrolle des Verdau und zur Abscheidung nicht-verdauter Elemente eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Das Plasmid pCEP4/CAT, welches zwischen den Bindungsstellen von Bam HI und Kpn I das 780 Basenpaar lange CAT-Gen trägt, diente als Positivkontrolle.

Vorbereitend zum Restriktionsverdau wurden die PCR-Produkte der VEGF-C-Gensequenzen gereinigt (Qiagen Qiaquick PCR Purification Kit), um freie Nukleotide, Primersequenzen, Salze und die Polymeraseenzyme zu entfernen. Nach Protokollanweisung wurden 5 Volumina PB-Puffer zu 1 Volumen PCR-Mix gegeben. Diese Mischung trug man auf eine Qiaquick Spin Säule auf und zentrifugierte 60s bei 10.000rpm. Die an den Ionentauscher gebundene DNA wurde bei gleicher Geschwindigkeit 1min mit 750µl PE-Puffer gewaschen und zum Trocknen eine weitere Minute bei 15.000rpm zentrifugiert. Mit 50µl EB-Puffer wurde die gereinigte PCR-DNA bei 10.000rpm 1min eluiert. Der anschließende Restriktionsverdau

erfolgte entsprechend des o.g. Protokolls. Zur Positivkontrolle wurde der gesamte Reaktionsansatz im Vergleich zu einem Basenpaarstandard auf ein Agarosegel aufgetragen.

Nach Anweisung des Qiagen Gel Extraktion Kits wurden die elektrophoretisch regelrecht aufgetragenen DNA-Sequenzen aus dem Agarosegel herausgelöst. Unter UV-Licht-Sicht wurden die entsprechenden DNA-Banden mit dem Skalpell en bloc aus dem Gel herausgetrennt und gewogen. Pro Gramm DNA-haltigen Gels fügte man drei Volumina QG-Puffer hinzu, inkubierte 10min bei 50°C unter leichtem Rütteln, bis das Gel sich auflöste. Die resultierende Flüssigkeit zentrifugierte man bei 10.000rpm 1min durch eine QIAquick-Säule. Zum Waschen wurden 750µl PE-Puffer durch die Säule zentrifugiert, bevor agarosefreie DNA mit 50µl EB-Puffer bei 15.000rpm eluiert wurde.

Äquivalente Proben des verdauten und gereinigten Plasmids sowie der verdauten und gereinigten PCR-Sequenzen wurden auf ein 1.5% Agarosegel aufgetragen. Nach Auftrennung im elektrischen Feld verglich man anhand der Lichtemission im UV-Licht die Konzentration der jeweiligen Proben. Unter Berücksichtigung der Basenpaarmenge (pCEP etwa 10.000, PCR-Sequenz etwa 500 Basenpaare) und davon abhängiger Ethidiumbromidbindung und Lichtemission wurden für die Ligase-Reaktion Plasmid und PCR-Produkt im Verhältnis 1:2 gemischt.

In ihrem Temperaturoptimum (16°C) wurde 1U T4 DNA Ligase mit 1µg Plasmid und entsprechender Menge an PCR-Insert und Pufferlösung gemischt und über Nacht die Ligase inkubiert.

2.2.8. Plasmidtransfektion in PC-3-luc Zellen

Transfektion bezeichnet einen Vorgang, bei dem fremde Moleküle wie DNA in eukaryonte Zellen gebracht werden. In dieser Arbeit wurde die Technik der stabilen Transfektion benutzt, bei der transfizierte DNA, in diesem Fall Plasmide, dauerhaft in den Zellzyklus und –stoffwechsel eingegliedert wurden.

In einer Kulturschale (Durchmesser 6cm) wurden PC-3-luc Zellen bis zu einem Konfluenzgrad von 70% kultiviert. Es wurde 1µg des in TE-Puffer gelösten Plasmids aus dem Midi-Präp mit DMEM auf ein Endvolumen von 150µl verdünnt. Nach Zugabe von 20µl SuperFect Transfektionsreagenz wurde die Lösung für 10min bei Zimmertemperatur inkubiert. Zusammen mit 1ml des Zellwachstumsmediums (inklusive FCS und Antibiotikum) wurden gewaschene Zellen mit dem Transfektionsmedium 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Entfernung überschüssigen Mediums und Waschen ließ man die Zellen in Wachstumsmedium (zunächst noch ohne Selektionsantibiotikum für plasmidtragende Zellen) 48 Stunden inkubieren. Es erfolgte dann eine Aufteilung der transfizierten Zellen auf Kulturschalen mit Hygromycin-haltigem Selektionsmedium. Zur Austestung der Hygromycin-Konzentration, die plasmidtragende Zellen ausreichend selektionierte, aber Zellvermehrung durch toxische Nebenwirkungen nicht zu sehr behinderte, wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Dabei wurden Konzentrationen von 150µg/ml bis 800µg/ml getestet.

Als Positivkontrolle des Transfektionsexperiments wurde eine Zellreihe mitgeführt, der das pCEP/CAT-Plasmid eingepflegt wurde. Hier wurde im CAT-Elisa die Expression der Chloramphenicol-Acetyltransferase nachgewiesen.

Als Negativkontrolle wurden zwei Zellreihen mitgeführt, deren Medien im Experiment keine Plasmide enthielten. Eine Zellreihe davon wurde zusammen mit SuperFect Transfektionsreagenz inkubiert. Dieses Vorgehen sollte kontaminationsbedingtes Eindringen von DNA ausschließen.

2.2.9. CAT-Elisa

Der Enzym-Immunoassay für die Chloramphenicol-Azetyltransferase (*Fa. Roche*) (CAT) weist die synthetisierte Menge dieses Enzyms in eukaryoten Zellen nach. Normalerweise kommt dieses Enzym nicht in eukaryoten Zellen vor. Die Messung seiner Aktivität wird in dieser Arbeit als Positivkontrolle der Plasmidtransfektion genutzt. Parallel zum pCEP-Plasmid wurde das enzymkodierende pCEP/CAT-Plasmid in PC-3-luc-Zellen transfiziert.

Das Prinzip des Tests beruht darauf, dass CAT-Antikörper an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden sind und im Zelllysate enthaltene CAT-Enzyme abfangen. Im nächsten Schritt wird ein weiterer CAT-Antikörper, gekoppelt an Digoxigenin, an das Enzym gebunden. Digoxigenin wird durch einen Antikörper erkannt, der seinerseits mit Peroxidase verbunden ist. Nach Zugabe eines Substrates weist die Peroxidaseaktivität durch eine Farbreaktion indirekt Chloramphenicol-Azetyltransferase sowohl qualitativ als auch quantitativ nach.

Mit 1ml Lysispuffer aus dem Kit wurden die plasmidtransfizierte Zellen suspendiert und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei 15.000rpm für 10min bei 4°C wurde der Überstand aufgefangen. Auf mit anti-CAT beladene Mikrotiterplatten wurden nun jeweils 200µl dieses Überstandes pipettiert. Zur Positivkontrolle wurde auch gereinigtes CAT-Enzym in einer Konzentration von 1ng/ml aufgetragen. Mit Folie bedeckt wurden die Platten eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen der Lösungen wurden die Platten mehrmals mit Waschlösung gereinigt, mit 200µl anti-CAT-DIG Arbeitslösung überschichtet und wieder 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit jeweils 200µl anti-DIG-POD-Arbeitslösung 60min bei 37°C inkubiert. Nach mehrfacher Spülung mit Waschlösung wurden jeweils 200µl Substrat dazugegeben. Zur Verstärkung der Farbreaktion wurde bei Bedarf Enhancer zum Substrat gegeben und vor dem Auftragen 30min durch Schütteln gemischt. Die Farbänderung von gelb nach grün wurde nach 20min abgelesen. Als Negativkontrolle dienten Zelllysate, in denen lediglich pCEP4 enthalten war, als Positivkontrolle reines CAT-Enzym. Der Test wurde zum qualitativen Nachweis der Transferase durchgeführt.

2.2.10. Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, bei der Proteine durch spezifische Antikörper markiert und durch eine Wasserstoffperoxidase-gesteuerte Reaktion über eine Lichtemission sichtbar gemacht werden. Dazu wird eine von Zellen gewonnene Gesamtproteinmischung im elektrischen Feld in einem SDS-Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine durch einen Blot nach dem Semi-Dry-Verfahren auf einer Polyvinylfluoridmembran fixiert, worauf sie dann mit entsprechenden Antikörpern markiert

werden können. Der primäre Antikörper ist dabei der auf das gesuchte Protein spezifisch passende, während sich der zweite Antikörper gegen die Spezies richtet, aus der der primäre gewonnen wurde. Gleichzeitig ist Wasserstoffperoxidase an diesen sekundären Antikörper gebunden, so dass nach Zugabe eines Substrates das Enzym dieses unter Emission von Licht spaltet. Es wird genau an der Stelle des gesuchten Proteins Licht frei. Dies wird auf einem Röntgenfilm dokumentiert.

2.2.10.1. Proteinextraktion aus Zellkulturen

Eine konfluent bewachsene Zellkulturflasche wurde mit 400µl Lysispuffer mehrfach bei -80°C schockgefroren. Dies bewirkte eine Lyse der Zellen. Mit einem Zellschaber wurden Zelltrümmer gelöst. Die erhaltene Suspension wurde mit einer 22G-Nadel mehrfach aufgezogen, um Zellsequester zu erhalten. Nach Zentrifugation bei 10000rpm setzten sich Zellreste wie Lipide und Nukleinsäuren als Pellet, während die Proteine im Überstand blieben. Nach der Methode des *Bio-Rad* Protein Assay wurde die Proteinkonzentration anhand einer Albumin-Standardkurve im Spectrometer bei 595nm ermittelt.

Lysispuffer:

- 1% Triton
- 0.5% DOC
- 10mM EDTA
- PBS

PBS-Puffer:

- 10mM Natriumphosphat (pH 7.2)
- 0.9% Natriumchlorid

2.2.10.2. SDS-Polyacrylamidgel-Präparation

In einer vertikalen *Bio-Rad* Gelkammer wurde ein 10%iges Gel gegossen (vgl. Sambrook, Fritsch, Maniatis 1989). Bis zur vollständigen Vernetzung des Acrylamids innerhalb des Trenngels wurde dieses mit Butanol überschichtet, um ein Austrocknen zu vermeiden. Nach 30min war die Quervernetzung abgeschlossen. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Spacerkamm eingefügt. Nach weiteren 30min wurde das Gel in die mit Pufferlösung gefüllte Elektrophoresekammer eingebracht.

10ml 10% SDS-Polyacrylamidlösung:

- 4ml Aqua dest.
- 3.3ml Acrylamidmix (in 100ml Aqua dest. 1g N,N'-Metylen-bis-Acrylamid und 29g Acrylamid lösen)
- 2.5ml 1.5M Tris (pH 8.8)
- 0.1ml 10% SDS
- 0.1ml 10% Ammoniumphosphat
- 4µl TEMED (Zugabe erst, wenn obige Zutaten gut vermischt waren, da TEMED die Vernetzung der beiden Acrylamide untereinander induziert)

3ml Sammelgel:

- 2.1ml Aqua dest.
- 0.5ml Acrylamidmix
- 0.38ml 1.0M Tris (pH 6.8)
- 0.03ml 10%SDS
- 0.03ml 10% Ammoniumpersulfat
- 3µl TEMED
-

Tris-Glycin-Laufpuffer:

- 25mM Tris
- 250mM Glycin (ph 8.3)
- 0.1% SDS

2.2.10.3. Protein-Gelelektrophorese

Es wurden jeweils 10µg Gesamtprotein eingesetzt. Dies wurde in 20µl Wasser 3min bei 100°C denaturiert. Nach Schockkühlung wurde die Lösung mit 20µl einer Mischung aus 2fachem SDS-Puffer und 1M DTT (gelöst in 0.01M Natriumacetat) in einem Verhältnis von 4:1 verdünnt. Die Proben wurden bei 10V über Nacht parallel zu einem Proteinstandard (*Fa. Amersham*) aufgetrennt.

2facher SDS-Puffer:

- 100mM Tris-Cl (pH 8.0)
- 4% SDS
- 0.2% Bromphenolblau
- 20% Glycerol

2.2.10.4. Protein-Blot

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde 15min in Transferpuffer inkubiert. Die Membran wurde 1min in Methanol und anschließend 10 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. 6 *Whatman*-Filterpapiere wurden ebenfalls vorgeätzt.

Transferpuffer: (pH 9.2)

- 48mM Tris
- 39mM Glycin
- 20% Methanol
- 1.3mM SDS

Nach Anweisung des Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell-Handbuches (*Fa. Bio-Rad*) wurden 3 *Whatman*-Filterpapiere luftblasenfrei auf die Platinanode gebracht. Darüber wurden in Sandwich-Technik nacheinander das SDS-Gel, die Immobilon-Membran und wiederum 3 Filterpapiere geschichtet. Geblottet wurde eine Stunde bei 15V.

2.2.10.5. Coomassie Brilliant Blau-Gelfärbung

Zur Überprüfung der SDS-Gelelektrophorese und des Proteinblots wurden Gele sowohl nach der Gelelektrophorese als auch nach dem Blot in Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Zum Auswaschen nicht-proteinspezifischer Färbungen wurde eine Mischung aus 50% Methanol und 10% Eisessig verwendet.

Färbelösung Coomassie Blau:

- 0.1% Coomassie Brilliant Blau
- 50% Methanol
- 7% Eisessig

2.2.10.6. Proteinfärbung

Der vollständige Übergang der aufgetrennten Proteine wurde durch Färbung der Membranen mit Amidoschwarz kontrolliert. Dazu wurde die Membran 10min in Färbelösung inkubiert. Unspezifische Membranfärbung wurde mit 25% Isopropanol und 10% Eisessig ausgewaschen.

Färbelösung Amidoschwarz:

- 0.1% Amidoschwarz
- 25% Isopropanol
- 10% Eisessig

2.2.10.7. Protein-Immundetektion

Protein-beladene Membranen wurden zweimal 10min in PBS-Puffer mit 0.1% Tween 20 gewaschen. Die PBS-Tween 20-Mischung (=PBS-T) wurde für jede Waschung benutzt. Zur Blockade antikörper-unspezifischer Bindungen wurde die Membran 1,5h in PBS-T mit

5% fettarmer Trockenmilch geschwenkt und anschließend in PBS-T gewaschen. Die Bindung des proteinspezifischen Antikörpers erfolgte über Nacht in einem versiegelten Kunststoffbeutel. Nach mehrfachem Waschen wurde für 2h mit einem sekundären Antikörperkonjugat inkubiert. Die Antikörperkonzentrationen waren im Dot Blot aufeinander abgestimmt worden, um möglichst kontrastreiche Markierungen bei geringer Hintergrundfärbung zu erreichen. Die Antikörper wurden mit PBS-T verdünnt. Entsprechend der Anweisung des ECL-Kits (*Fa. Amersham*) wurde die antikörperbeladene Membran mit Detektionsreagentien im Verhältnis 1:1 (0,123ml/cm² Membran) bedeckt und 1min inkubiert. In der Dunkelkammer exponierte man auf den Membranen ECL-Hyperfilm. Zur Entwicklung des Röntgenfilms wurde dieser in Entwickler- und anschließend in Fixierlösung (*Fa. Tetenal Photowerk*) jeweils 5min geschwenkt.

2.2.11. RNA-Isolierung aus transfizierten PC-3-luc-Zellen

Im Gegensatz zur RNA-Isolierung nach der Methode des *Qiagen*-Kits wird im NucleoSpin RNA II von *Macherey und Nagel* ein DNA-Verdau in die Präparation einbezogen. Dies verhindert bei der RNA-Isolierung transfizierter Zellen eine Kontamination durch genomische oder Plasmid-DNA, welche einer sich anschließenden Reversen Transkription bzw. PCR zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten.

Ein Zellpellet wurde in 400µl RA1-Puffer und 4µl β-Mercaptoethanol gelöst. Bei 15.000rpm erfolgte über einen NucleoSpin Filter die Homogenisierung des Lysates. Die Bindung der RNA an die NucleoSpin RNA-Säule war nach Zentrifugation mit 300µl reinem Ethanol gegeben. Mit 95µl RNase freier DNase I-Arbeitslösung entfernte man bei Raumtemperatur DNA-Rückstände. Mit 500µl RA2-Puffer erfolgte die Inaktivierung der DNase. Die Spinsäule wurde mit RA3 mehrfach gewaschen und zum Trocknen 2min bei 15.000rpm zentrifugiert. Die RNA wurde bei 15.000rpm für 60sek mit 100µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der Probe ermittelte man im Spectrometer.

Zur Überprüfung des DNase-Verdaus wurde eine direkte PCR ohne vorherige Reverse Transkription mit den Primern pCEP-Forward und EBV-Reverse durchgeführt, um die Kontamination mit Plasmid-DNA auszuschließen.

2.2.12. Northern Blot

Beim Northern Blot wird die Gesamt-RNA einer Probe in einem MOPS/Formaldehyd-Gel durch Elektrophorese der Molekülgröße nach aufgetrennt. Anschließend wird die RNA durch einen Blot nach der Methode von Southern (Maniatis et al. 1982) auf eine Nylonmembran transferiert, auf deren Oberfläche sie gebunden und damit immobilisiert wird. Bei der Hybridisierung, also Markierung der Ziel-RNA, wird die Membran mit DIG-konjugierten DNA-Sonden inkubiert. Zur Herstellung dieser Sonden wird von einem Plasmid mit entsprechendem Insert eine PCR durchgeführt, bei der dUTP durch Digoxigenin-gekoppeltes dUTP ersetzt wird. DIG-dUTP wird als Desoxynucleotid in die neusynthetisierte DNA eingebaut. Die an die Membran gebundenen RNA:DIG-DNA-Hybride können mit lumineszenter Detektion nachgewiesen werden.

2.2.12.1. RNA-Gelelektrophorese

Zur Vermeidung von RNase-Kontamination wurden benötigte Gefäße eine Stunde in 0.1% Diethylpyrocarbonat-Lösung (DEPC) in Wasser inkubiert und anschließend wie die verwendeten Lösungen autoklaviert.

Es wurde ein 1.2% MOPS/Formaldehyd-Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 1.2g Agarose und 10ml 10x FA-Gelpuffer auf 100ml RNase-freies Wasser gemischt und in der Mikrowelle zum Schmelzen gebracht. Nach dem Abkühlen fügte man 1.8ml 37% Formaldehyd sowie 1µg/ml Ethidiumbromid hinzu. Das Gel wurde vor dem Beladen mit RNA 30min in 1x FA-Laufpuffer äquilibriert.

Es wurden je 5µg Gesamt-RNA eingesetzt. Dazu erhitzte man 4 Volumina RNA-Lösung zur Denaturierung 4min auf 65°C und kühlte direkt auf Eis, um anschließend 1 Volumen 5x RNA-Ladepuffer hinzuzufügen.

Die Elektrophorese wurde bei 50V durchgeführt, bis die Lauffront das Gelende erreichte.

10x FA-Gelpuffer: pH 7.0 (Lagerung bei 4°C):

- 200mM MOPS
- 50mM Natriumacetat
- 10mM EDTA

1x FA-Laufpuffer:

- 100ml 10x FA-Gelpuffer
- 20ml 37% Formaldehyd
- 880ml RNase-freies Wasser

5x RNA-Ladepuffer: pH 8.0 (Lagerung bei 4°C):

- 80µl 500mM EDTA
- 720µl 37% Formaldehyd
- 2ml Glycerol
- 3084µl Formamid
- 4ml 10x FA-Gelpuffer

gemischt auf 10ml RNase-freies Wasser; Färbung mit Bromphenolblau

2.2.12.2. RNA-Blot auf Hybond N+

Der Transfer separierter RNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran wurde nach der Blotting-Technik von Southern (Maniatis et al.1982) durchgeführt. Die RNA wurde hierbei von der durch Kapillarkräfte aufsteigenden 20x SSC-Lösung aus dem Gel eluiert und an die Membran gebunden (vgl. Abb. 4). Nach etwa 16 Stunden überprüfte man durch Beleuchtung mit einer UV-Lampe den vollständigen Übergang der RNA auf die Membran, welche für zwei Stunden bei 80°C fixiert wurde.

Transferpuffer 20x SSC:

- 175.3g Natriumchlorid
- 88.2g Natriumcitrat

gelöst in 1l RNase-freiem Wasser; pH 7,0

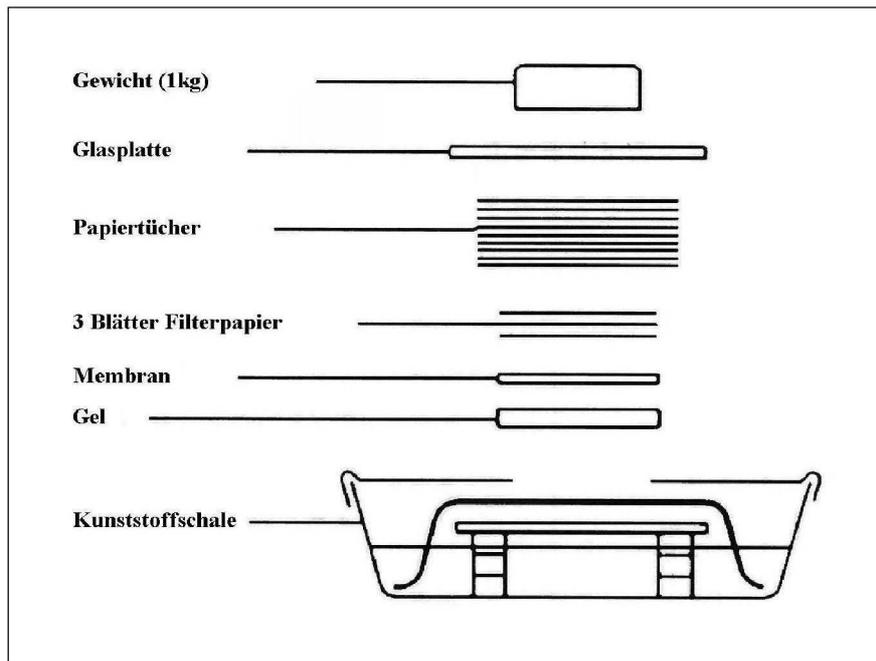


Abb. 4

Abb. 4:

Schematischer Aufbau der Northern-Blot-Technik (Fa. Amersham pharmacia biotech)..

2.2.12.3. DIG-High-Prime-DNA-Markierung

DNA-Markierung mit Digoxigenin, einem Steroid-Hapten, ermöglicht eine nicht-radioaktive Markierung von RNA durch Hybridisierung und Chemilumineszenz.

Es wurde aus einem Plasmid die benötigte Sonde durch enzymatischen Verdau herausgelöst, in der DNA-Elektrophorese von Verunreinigungen separiert und durch Gel-Extraktion konzentriert. Man löste 100ng DNA in 16µl Wasser und denaturierte sie bei 100°C für 10min. Aus dem High-Prime-Kit der *Fa. Roche* wurden 4µl DIG-High-Prime zugefügt und kurz zentrifugiert. Bei 37°C wurde 24 Stunden inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde mit 2µl 0.2M EDTA (pH 8.0) gestoppt. Die Effizienz der Markierung wurde in einer Verdünnungsreihe im Vergleich zu Kontroll-DNA bekannter Konzentration bestimmt. Die Probe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Als Positivkontrolle für den Northern-Blot wurde das housekeeping-Gen der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; Enzym der Glykolyse) benutzt. Um hierfür eine DIG-markierte Sonde zu erhalten, wurde die Gensequenz direkt bei einer PCR markiert. Mit der Gesamt-RNA aus 293-Zellen wurde eine RT-PCR mit dem GAPDH-Forward-Primer und dem GAPDH-Reverse-Primer sowie einer dNTP-Mischung mit DIG-konjugiertem dUTP durchgeführt.

Reaktionsansatz für Markierungs-PCR:

- 10µl 10x PCR-Puffer (*Fa. Qiagen*)
- 10 µl 10x dNTP (DIG-markiert)
- 1µl Primer Forward
- 1µl Primer Reverse
- 0.5µl Taq-Polymerase (*Fa. Qiagen*)
- 77.5µl Nuclease-freies Wasser
- 1µl Template-DNA

2.2.12.4. Hybridisierung von RNA mit einer DIG-markierten DNA-Sonde

Die Hybridisierung der aufgetrennten und immobilisierten RNA auf der Membran wurde mit Hilfe des DIG-Easy-Hyb-Kits (*Fa. Roche*) durchgeführt. Zunächst prähybridisierte man bei 50°C eine Stunde in 2ml DIG-Easy-Hyb-Puffer pro 10cm² Membran, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Die DIG-markierte DNA-Probe wurde für 5min bei 100°C denaturiert und auf Eis schockgekühlt. Dann verdünnte man sie mit 50°C warmem DIG-Easy-Hyb-Puffer auf 25ng/ml. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 50°C (1ml Probenpuffer/10cm² Membran). Danach wurde zweimal 5min mit 2xSSC/0.1%SDS bei Zimmertemperatur, anschließend zweimal 15min in 0.5xSSC/0.1%SDS bei 60°C gewaschen.

2.2.12.5. Immundetektion von RNA:DNA-Hybriden

Die Membran wurde nach der Hybridisierung 5min in Waschpuffer gewaschen. Unspezifische Bindungen wurde 30min mit 1x blocking-solution des DIG-High-Prime-Kits (*Fa. Roche*) gesättigt. Anschließend inkubierte die Membran 30min in Antikörper-Lösung (Anti-Digoxigenin-Antikörper wurde 1:10.000 in blocking-solution verdünnt, dies entsprach 750U Fab-Fragmenten/ml). Nach Waschen äquilibrierte der Blot in Detektionspuffer. Im Hybridisierungsbeutel bedeckte man die Membran blasenfrei mit Farbsubstratlösung (CSPD 1:100 in Detektionspuffer verdünnt). Nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur und weiteren 5min bei 37°C wurde die Lichtemission auf einem Röntgenfilm festgehalten.

Waschpuffer: pH 7.5

- 0.1M Maleinsäure
- 0.15M Natriumchlorid
- 0.3% Tween 20

Detektionspuffer: pH 9.5

- 0.1M Tris-Cl
- 0.1M Natriumchlorid

2.2.13. DNA-Präzipitation

Die geklonten Plasmide wurden von der *Fa. Qiagen* sequenziert. Es wurde 1µg DNA des Plasmid-Midi-Präps in TE-Puffer mit 2 Volumina eiskaltem Ethanol gemischt und 30min auf Eis gelagert. Bei 0°C wurde die DNA 10min bei 12.000rpm sedimentiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden 250µl 70% Ethanol zum Waschen zugegeben. Nach Zentrifugation wurde das präzipitierte Plasmid-Pellet über Nacht getrocknet und zur Sequenzierung gegeben.

2.2.14. Immunhistochemische Proteinfärbung in vivo

Nach Anleitung des Vectastain ABC-Kits (*Fa. Vector Laboratories*) wurden auf Objektträgern fixierte Zellschichten nach der ABC-Methode immunhistochemisch gefärbt. Diese Methode benutzt das Glykoprotein Avidin (A), welches vier Bindungsstellen mit starker Affinität bei hoher Spezifität zum Vitamin Biotin (B) besitzt. Biotin liegt gebunden an einen sekundären Antikörper, welcher sich gegen die Ursprungsspezies des primären Antikörpers richtet, vor. Der Komplex (C) aus Avidin und biotinylierter Wasserstoffperoxidase zeigt nach Zugabe eines Substrates (Chromogen DAB) eine Farbreaktion am Ort der Antikörperbindung.

2.2.14.1. Zellfixation

Mit Zellen konfluent bewachsene Lab-Tek-Chamber-Slides (*Fa. Nunc*) wurden von ihrem Dach befreit und der entstandene Objektträger zweimal in PBS gewaschen. Nach Inkubation für 5min in -20°C kaltem Methanol wurden die Zellen für 10sek in Aceton fixiert. Anschließend wurden sie über Nacht bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Gelagert wurden auf diese Weise konservierte Zellschichten bei -20°C .

2.2.14.2. Proteinfärbung in vivo

In einer feuchten Kammer (verhinderte Verdunstung und Austrocknung) wurden fixierte und getrocknete Zellschichten 20min in Blocking-Serum (Serum aus der Spezies, aus der sekundäre Antikörper gewonnen wurde) präinkubiert, um unspezifische Bindungen abzudecken. Jeweils nach vorsichtigem Waschen mit PBS wurde mit den Antikörpern inkubiert: zunächst mit dem antigenspezifischen Antikörper, welcher 1:250 bis 1:1000 in PBS verdünnt wurde, für 30 min bei 37°C , danach mit dem sekundären Antikörper (Peroxidase-konjugiertes Biotin). Das Farbsubstrat für die Wasserstoffperoxidase setzte sich aus 0.5mg Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)/ml PBS und $0.35\mu\text{l H}_2\text{O}_2/\text{ml PBS}$ zusammen.

Zur Kontrastierung wurden die Zellen 5sek mit Hämalaun gegengefärbt. Überschüssige Farbe wurde mit warmen Wasser abgenommen sowie durch eine Alkoholreihe ansteigender Konzentration (80%, 96% und 99.5% Ethanol, abschließend 100% Xylol) ausgewaschen.

Zur Konservierung wurden die Objektträger mit Depex und einem Deckglas eingedeckt. Die in-situ-Hybridisierung konnte in einem Carl Zeiss Standard Mikroskop begutachtet werden.

3. Ergebnisse

3.1. VEGF-C-Gen und sein Nachweis in PC-3-luc-Zellen

Die cDNA für das menschliche VEGF-C-Gen wurde 1996 erstmals aus Prostatakarzinomzellen geklont und sequenziert (Joukov et al. 1996). Passend zu jeweils drei unterschiedlichen Bereichen dieses Gens wurden drei verschiedene Primerpaare zur Amplifizierung dieser DNA-Abschnitte genutzt.

Für das Teilstück A ergab sich nach einer PCR ein Genprodukt aus 504 Basenpaaren. Die Sequenz der Primer für den Bereich des VEGF-C-Gens von der Base 936 bis zur Base 1439 lautete folgendermaßen:

Primer A forward: ⁹³⁶CCCCAAACCAGTAACAATCAG ⁹⁵⁶

Primer A reverse: ¹⁴³⁹GTACATTCACAGGCACATTTTC ¹⁴¹⁸

Das Teilstück B war mit 511 Basenpaaren zwischen der Base 648 und der Base 1158 des Gens gelegen. Die Primer hierfür hatten folgende Sequenz:

Primer B forward: ⁶⁴⁸CAACTCAAGGACAGAAGAGAC ⁶⁶⁸

Primer B reverse: ¹¹⁵⁸TCCAGCATCCGAGGAAAAC ¹¹⁴⁰

Mit Primerpaar C wurde ein 445-Basenpaar langes PCR-Stück vom VEGF-C-Gen hergestellt:

Primer C forward: ³⁴²TCCTTCCACCATGCACTTGC ³⁶¹

Primer C reverse: ⁷⁸⁶TCCAAACTCCTTCCCCACATC ⁷⁶⁶

Abbildung 5 zeigt eine Gelelektrophorese dieser drei VEGF-C-DNA-Teilstücke.

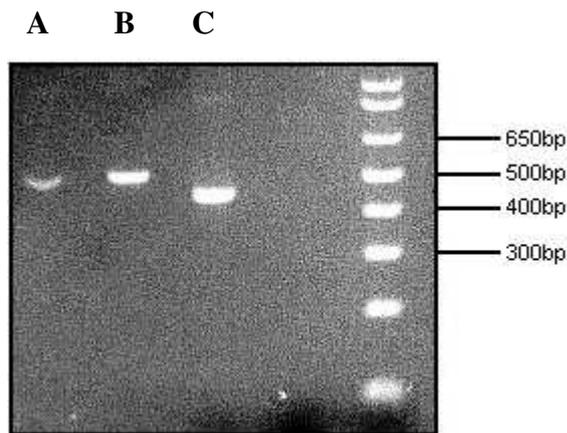


Abb. 5

Abb. 5:

Darstellung der PCR-Produkte von VEGF-C mit den Primerpaaren A, B und C im 1%igen Agarosegel bei 100V im Vergleich zu einem Basenpaarstandard.

3.2. Antisense-Konstrukt im pCEP4-Plasmid

Jeder der drei Forward-Primer für VEGF-C war an seinem 5'-Ende mit einer kurzen Basensequenz ausgestattet, die eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamHI darstellte. Ebenso besaßen die Reverse-Primer am 5'-Ende eine für Kpn I erkennbare Basenabfolge. Die Abbildung 6 stellt dar, wie durch die spezielle Anordnung der Restriktionsenzym-Angriffstellen die durch PCR gewonnenen Sequenzen von VEGF-C in einer Antisense-Richtung in das Plasmid pCEP4 eingebaut werden konnten.

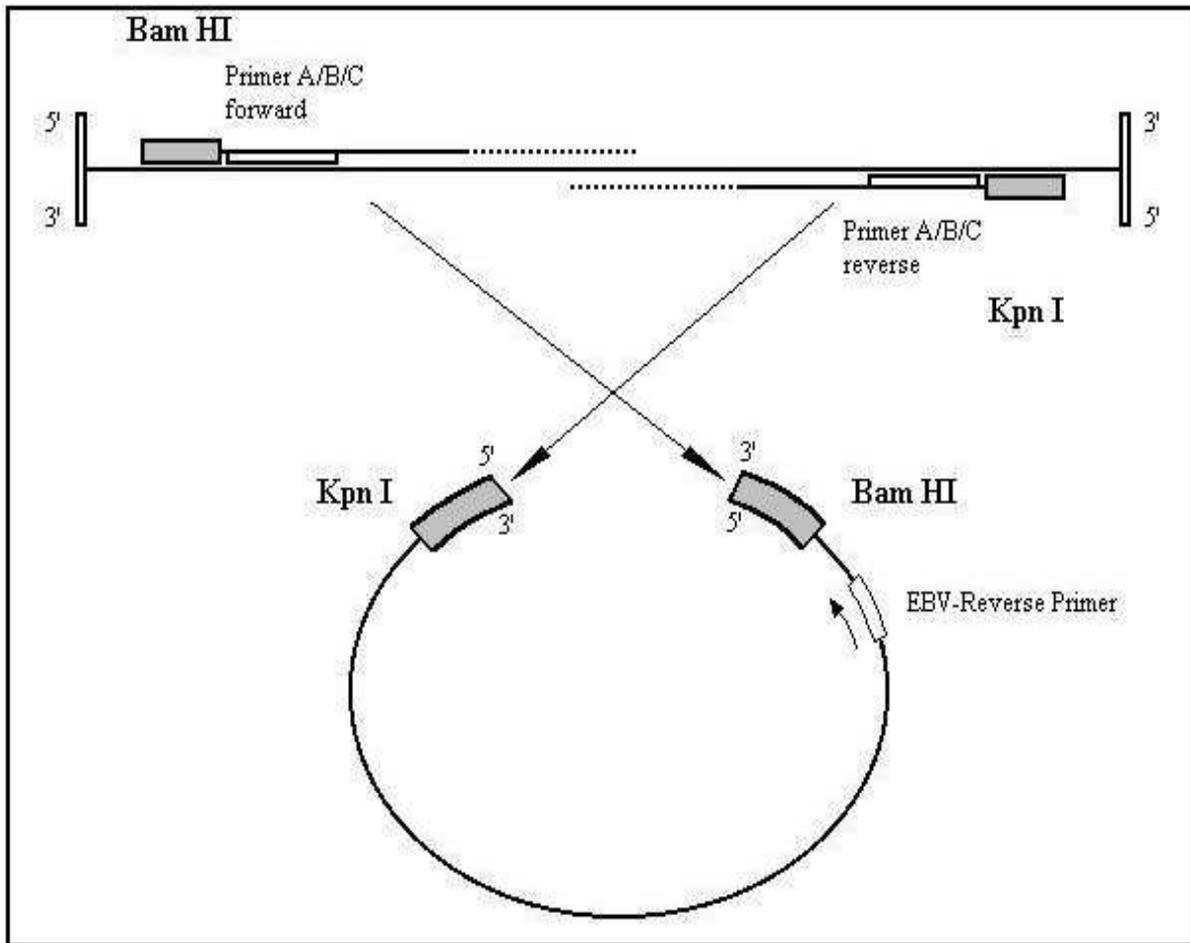


Abb. 6

Abb. 6:

Theoretisches Modell für die Klonierung von DNA-Sequenzen in Antisense-Richtung in ein Plasmid. Die Restriktionsenzym-Schnittstellen sind so angeordnet, dass durch den EBV-Reverse-Primer bei einer gezielten Transkription der klonierten Sequenz die Antisense-Abfolge vorgegeben wird.

Nach einem Proteinverdau des Plasmids pCEP4 und der in der PCR gewonnenen VEGF-C – Teilstücke A, B und C mit Kpn I und Bam HI wurden diese mit Hilfe der T4-Ligase wie in Abbildung 6 dargestellt zusammengesetzt. Das neue pCEP4-Plasmid mit dem Insert wurde in E.coli Bakterien transformiert. Mit Hilfe eines Midi-Präps konnten größere Mengen des Plasmides von den Bakterien geerntet werden. Zur Kontrolle des Enzymverdaus und der Neuligation wurde das Plasmid mit Insert wiederum durch die beiden Restriktionsenzyme verdaut und die entstehende DNA in einer Gelelektrophorese kontrolliert.

Parallel dazu wurde das Plasmid pCEP4/CAT in die Bakterien transformiert und per Midi-Präp wieder extrahiert und verdaut. Das pCEP4/CAT-Plasmid ist bereits ein Plasmid, in dem

sich analog zum obigen Modell eine Information für das Enzym Chloramphenicol-Azetyl-Transferase in Form einer 780-Basenpaar großen DNA zwischen den Schnittstellen der Restriktionsenzyme befindet. Dadurch kontrollierte man die Funktion der Restriktionsenzyme und den Transformationsvorgang.

Die Abbildung 7 zeigt einen Re-Verdau nach Transformation und Midi-Präp. In der Abbildung 8 sieht man den parallelen Kontrollversuch mit cCEP4/CAT.

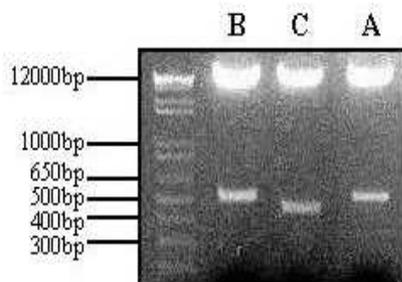


Abb. 7

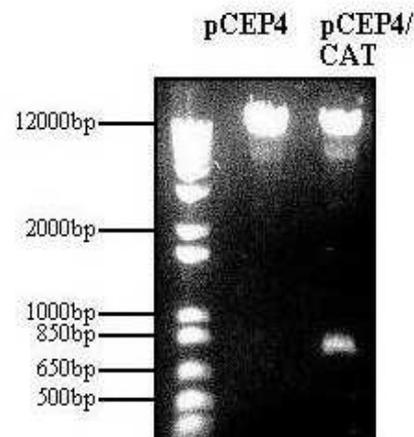


Abb. 8

Abb. 7:

Gelelektrophorese (1% Agarose) nach enzymatischem Verdau (BamH1 und Kpn1) von pCEP4-Plasmiden mit Antisense-Inserts (je nach Primerpaar A, B oder C).

Abb. 8:

Gelelektrophorese (1% Agarose) nach Enzymverdau (BamH1 und Kpn1) von pCEP4- und pCEP4/CAT-Plasmiden. In der rechten Spalte ist das 780 Basenpaar umfassende CAT-Gen dargestellt.

3.3. Plasmidtransfektion und Selektion

3.3.1. Ermittlung der für erfolgreiche Transfektion notwendigen DNA-Menge

Zur Austestung optimaler Transfektionsbedingungen wurden PC-3-luc Zellen mit unterschiedlichen Mengen nativer pCEP4- bzw. pCEP4/CAT-Plasmide beimpft. Ebenfalls

wurde geprüft, in welcher Konzentration das Antibiotikum Hygromycin als Selektionsfaktor für plasmidtragende Zellen gegenüber nichttransfizierten PC-3-luc vorliegen sollte. Die Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der Auszählung positiv transfizierter Zellklonkolonien auf Kulturschalen von 4cm Durchmesser. Zu erkennen ist, dass die optimale DNA-Menge zur Plasmidtransfektion bei 1µg lag. Außerdem erwies sich die Konzentration von 150µg Hygromycin pro ml Kulturmedium als optimal, nicht-plasmidtragende und damit auch nichtresistente PC-3-luc am Wachstum zu hindern ohne jedoch zytotoxisch zu wirken.

Tab. 1:

Ergebnisse der manuell durchgeführten Zählung der Zellkolonieverteilung in Abhängigkeit von transfizierter DNA-Menge und Antibiotikakonzentration im Kulturmedium.

In der Kopfzeile sind ansteigende Hygromycinkonzentrationen im Kulturmedium aufgetragen. Die Kopfspalte beschreibt die Menge an Plasmid-DNA, die transfiziert wurde, unterschieden nach pCEP4 und pCEP4/CAT. Kontrolle 2 dient als Negativ-Kontrolle und wurde ohne DNA- und Transfektionsmedium-Zugabe während des Transfektionsexperimentes mitgeführt. Der Kontrolle 1 wurde keine DNA, jedoch Transfektionsreagenz zugefügt; dadurch schloß man kontaminationsbedingte Aufnahme von DNA aus. Die Sterne stehen für konfluent bewachsenen Zellrasen in der Positivkontrolle ohne Antibiotika-Zusatz. Die Zahlen stehen für die Anzahl gesichteter Zellkolonien in den parallel aufgeteilten Kompartimenten der Transfektionsplatten.

	0µg/ml	150µg/ml	300µg/ml	400µg/ml	600µg/ml	800µg/ml
2µg pCEP4	*	1/4	0/0	0/1	0/1	1/0
2µg pCEP4/CAT	*	0/0	1/0	0/1	0/3	0/1
1µg pCEP4	*	10/9	5/2	7/7	7/6	0/5
1µg pCEP4/CAT	*	6/7	0/8	1/1	0/1	1/0
0.2µg pCEP	*	52/53	23/42	26/41	10/37	6/29
0.2µg pCEP4/CAT	*	19/10	2/6	4/12	1/8	0/5
Kontrolle 1	*	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Kontrolle 2	*	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

Tab. 1

3.3.2. Selektion transfizierter PC-3-luc Zellen

Um die erfolgreiche Transfektion der Plasmide pCEP4 und pCEP/CAT in die Zellen zu nachzuweisen und deren aktive Teilnahme am Zellstoffwechsel darzustellen, wurde von pCEP/CAT-transfizierten PC-3-luc ein CAT-Elisa durchgeführt. Die Farbreaktion bei transfizierten Zellen war äquivalent stark wie in der Positivkontrolle mit reiner CAT-Enzymlösung (im Kit enthalten) zu beobachten.

3.3.3. Transfektion von PC-3-luc Zellen

Entsprechend der Ergebnisse aus Kapitel 3.3.1. wurden jeweils 1µg der pCEP4-Plasmide mit den Antisense-Inserts A, B und C in PC-3-luc transfiziert. Die Zellen wurden in Nährmedium mit 150µg Hygromycin/ml selektioniert. Tabelle 2 stellt die Anzahl positiv transfizierter Zellkolonien dar.

Tab. 2:

Ergebnisse der manuell durchgeführten Zählung der Zellkolonieverteilung nach Transfektion der pCEP4-Plasmide mit Antisense-Inserts.

In der Kopfzeile sind die sechs Petrischalen einer Kulturplatte aufgelistet, auf die die Zellen nach der Transfektion passagiert wurden. In Schale 1 befand sich Zellmedium ohne Hygromycinzusatz, die anderen Schalen enthielten das Antibiotikum in der Konzentration von 150µg/ml. In der Kopfspalte sind die Plasmide mit den Inserten A, B und C aufgetragen, die Transfektion wurde in doppelter Ausführung durchgeführt. Die Sterne beschreiben einen konfluent bewachsenen Zellrasen in den Petrischalen ohne Hygromycinzusatz. In der Kontrolle wurde eine PC-3-luc-Zellreihe ohne transfiziertes Plasmid mitgeführt und zeigt aufgrund des fehlenden Resistenzgens für Hygromycin kein Wachstum (-).

	1	2	3	4	5	6
A1	*	56	32	42	37	26
A2	*	32	34	15	25	34
B1	*	19	18	15	12	13
B2	*	10	13	18	11	10
C1	*	13	15	8	4	10
C2	*	9	13	12	8	12
Kontrolle	*	-	-	-	-	-

Tab. 2

3.3.4. Untersuchung Antisense-transfizierter PC-3-luc Zellen

3.3.4.1. PCR

Die Insertstücke A, B und C befinden sich im pCEP4-Plasmid zwischen Bindungsstellen für die Primer pCEP-forward und EBV-reverse. Es wurde eine PCR durchgeführt mit jeweils

unterschiedlichen Primerkombinationen, um schrittweise den korrekten Einbau der Insertsequenzen anhand der Größe der in der PCR entstehenden DNA-Abschnitte zu verfolgen. Die Primerkombinationen setzten sich folgendermaßen zusammen:

1. pCEP-forward/EBV-reverse,
2. VEGF-C-reverse/EBV-reverse und
3. VEGF-C-reverse/VEGF-C-forward.

Das PCR-Produkt Nummer 1 sollte also jeweils das größte sein, Produkt Nummer 2 um 38 Basen und Produkt Nummer 3 um 77 (38+39) Basen kleiner. Die Abbildung 9 zeigt am Beispiel des Antisense-Konstruktes B die Gelelektrophorese einer solchen PCR.

Abb. 9:

Elektrophorese der Insertsequenzen im Plasmid pCEP4 mit Hilfe im 1%igen Agarosegel bei 100V nach einer PCR mit spezifischen Primerpaaren.

Verwendet wurden drei Klone von PC-3-luc Zellen, deren transfizierte Plasmide jeweils das Insert B enthielten.

Die Primerpaare setzten sich folgendermaßen zusammen:

1. pCEP-forward/EBV-reverse
2. Primer B reverse/EBV-reverse
3. Primer B reverse/Primer B forward

Theoretisch ergibt sich bei der 1. Primerkombination ein PCR-Stück von 588 Basenpaaren (38bp vom pCEP-forward-Primer bis zur Schnittstelle Kpn I, 511bp für das Insertstück B, 39bp von der Schnittstelle für Bam HI bis zum EBV-reverse-Primer). Dementsprechend ist das Stück mit der 2. Primerkombination 550, das bei der 3. Paarung 511 Basenpaare groß. Die Größe der theoretisch entstehenden PCR-Stücke lässt sich im Bild praktisch nachvollziehen.

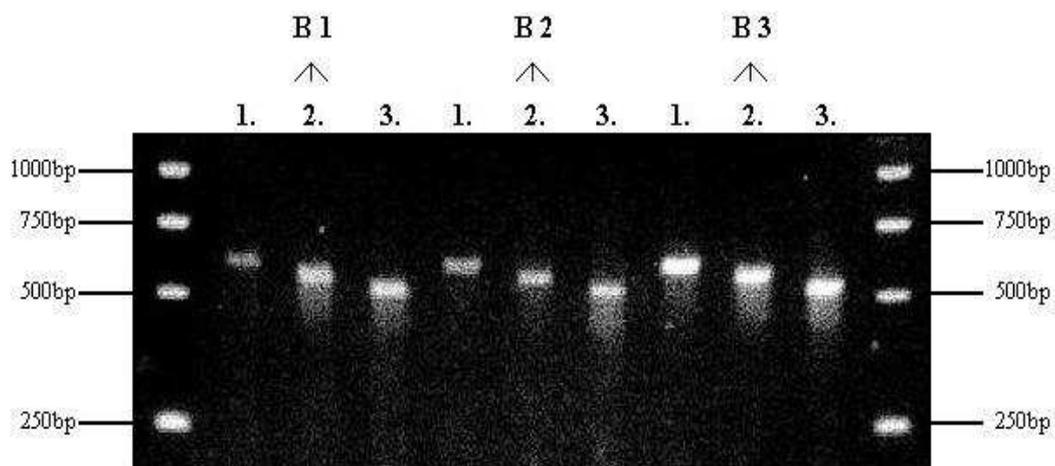


Abb. 9

Zusätzlich zur PCR wurden die Plasmide bei der *Fa. Qiagen* sequenziert, um die genaue Basenabfolge der Inserts zu kontrollieren. Es zeigte sich, dass die konstruierten und in Zellen kultivierten Plasmide der Theorie entsprechend aufgebaut waren.

3.3.4.2. Northern Blot

Um die Auswirkungen der veränderten DNA auf RNA-Ebene zu studieren wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt. Die Abbildung 10 zeigt eine elektrophoretisch aufgetrennte Gesamt-RNA mehrerer Zelllinien, die anschließend auf Nylonmembranen geblottet und mittels DIG-markierter DNA-Sonden spezifisch markiert wurden. Bei der Detektion der VEGF-C-RNA und ihrer Antisense-Komponenten war kein eindeutiges Ergebnis nachweisbar, obwohl die Positivkontrolle mit dem Housekeeping-Gen GAPDH spezifische Signale ergab. Die Abbildung 11 zeigt einen Dot-Blot zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der DIG-Sonde für GAPDH. In der Abbildung 12 wird deutlich, dass diese Sonde auch in elektrophoretisch aufgetrennter RNA spezifisch bindet. In Abbildung 13 sieht man, wie eine Sonde für das Insert B auf die RNA nativer und transfizierter PC-3-luc Zellen reagiert. Die im Vergleich zur Positivkontrolle schwachen und aufgrund der doppelten Markierung als unspezifisch einzustufenden Signale gaben Anlaß dazu, die transfizierten Zellen im Western Blot zu untersuchen.

Abb. 10:

Elektrophorese von Gesamt-RNA verschiedener Zelllinien im MOPS/Formaldehydgel.

Aufgetragen wurden jeweils 5µg RNA. Die beiden deutlich sichtbaren Banden stellen die 18S- und 28S-Untereinheiten ribosomaler RNA dar. Auf Bahn 1 ist RNA nativer PC-3 Zellen aufgetragen. Bahn 2 repräsentiert PC-3-luc Zellen. In der 3. Bahn wurde RNA von HEK-293-Zellen aufgetrennt. Die Bahnen A, B und C enthalten die RNA der mit pCEP4 und den jeweiligen Inserts A, B und C transfizierten PC-3-luc.

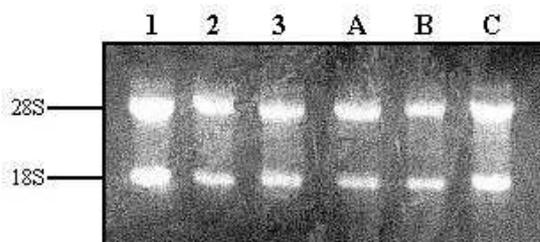


Abb. 10

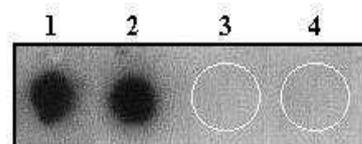


Abb. 11

Abb. 11

Dot-Blot-Analyse einer DIG-markierten GAPDH-DNA-Sonde auf einer Hybond NX-Membran.

Es wurde jeweils ein Tropfen DNA auf die vorgehäusete Nylonmembran gegeben und zur Fixierung getrocknet. Das deutliche Signal in Dot 1 (aus PC-3-luc durch PCR mit G3PDH-forward- und G3PDH-reverse-Primer gewonnene DNA-Sequenz einer Länge von 306 Basenpaaren) und in Dot 2 (450bp-lange GAPDH-DNA aus

dem Control Amplimer Set der *Fa. Clontech Laboratories*) zeigt, dass die DIG-markierte Sonde spezifisch bindet. In Dot 3 wurde pCEP4 aufgetragen. Hier schließt das fehlende Signal unspezifische Reaktionen der Sonde auf DNA anderer Sequenz aus. Dot 4 diente als Negativkontrolle und enthielt lediglich Aqua dest.

Abb. 12:

Northern-Blot-Analyse elektrophoretisch aufgetrennter Gesamt-RNA verschiedener Zellpopulationen. Detektion von GAPDH-RNA mittels DIG-markierter Sonde.

GAPDH ist als Enzym der Glykolyse ubiquitär und konnte in PC-3 Zellen (1), PC-3-luc Zellen (2), HEK-293-Zellen (3) und transfizierten PC-3-luc Zellen (A=pCEP4/Insert A, B=pCEP4/Insert B, C=pCEP4/Insert C) nachgewiesen werden. Diese Analyse überprüfte den Versuchsablauf eines Northern Blots und diente als Positivkontrolle.

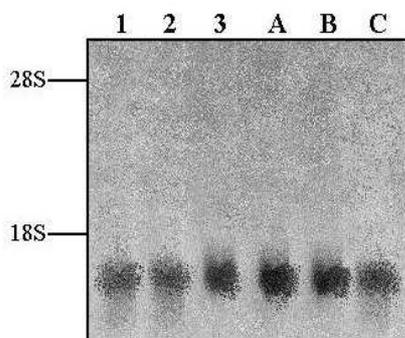


Abb. 12

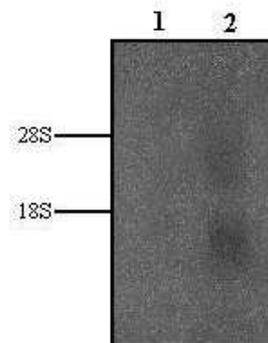


Abb. 13

Abb. 13:

Northern-Blot-Analyse elektrophoretisch aufgetrennter Gesamt-RNA verschiedener Zellpopulationen. Als Sonde dient ein DIG-markiertes DNA-Stück der Sequenz des Inserts B.

Auf Bahn 1 wurden 10 μ g RNA aus HEK-293-Zellen aufgetragen. Da diese Zellen kein VEGF-C besitzen, erscheint hier auch keine Markierung.

Auf Bahn 2 befinden sich 10 μ g RNA aus pCEP4/Insert B-transfizierten PC-3-luc. Das Signal ist trotz gesteigerter RNA-Konzentration sehr schwach und erscheint schon allein aufgrund der Doppelmarkierung unspezifisch.

3.3.4.3. Western Blot

Analog zu den Northern-Blot-Analysen und den PCR-Untersuchungen sollte im Western Blot gezeigt werden, dass durch die Antisense-Sequenz im Plasmid das Protein VEGF-C von

pCEP4/Insert-transfizierten Zellen nicht mehr exprimiert wird, bzw. dass die Translation der originären mRNA durch die kurze Antisense-RNA inhibiert wird. Dazu wurden die VEGF-C-freien HEK-293-Zellen mit PC-3-luc und transfizierten PC-3-luc verglichen. Als Positivkontrolle wurde das ubiquitäre Protein Aktin eingesetzt. Weiterhin enthielten einige Antikörper-Markierungskits aufgereinigtes VEGF-C, welches in der Immundetektion ebenfalls als Positivkontrolle genutzt wurde.

Die spezifische Darstellung von VEGF-C im elektrophoretisch aufgetrennten Gesamtprotein der verschiedenen Zellreihen erwies sich als schwierig. Es wurden verschiedene Primär- und Sekundärantikörper unterschiedlicher Firmen getestet, doch eine eindeutige Reaktion blieb aus. Im Unterschied dazu ließ sich Aktin sehr einfach, selbst mit hoch verdünnten Antikörperlösungen darstellen.

Abb. 14:

Western-Blot mit Immunmarkierung durch einen spezifischen Antikörper für Aktin.

In einem 10%igem SDS-Gel wurden auf den Bahnen 1 und 3 jeweils 5µg und auf den Bahnen 2 und 4 je 2.5µg Gesamtprotein aus PC-3-luc Zellen aufgetragen. Zur Immundetektion von Aktin wurden die Membranen in verschieden stark konzentrierten Antikörperlösungen inkubiert. Für die Bahnen 1 und 2 wurde die Verdünnung 1:200 und für die Bahnen 3 und 4 die Verdünnung 1:1000 beim primären Antikörper (Aktin (I-20) sc-8536) (*Fa. Santa Cruz Biotechnology*) benutzt. Als sekundärer Antikörper wurde anti-goat IgG-HRP (*Fa. Santa Cruz Biotechnology*) in den Verdünnungen 1:10.000 (Bahn 1 und 2) und 1: 2000 (Bahn 3 und 4) eingesetzt. Die Belichtungszeit des Röntgenfilms betrug 2min. Es ist auf jeder Bahn unabhängig von der aufgetragenen Proteinmenge oder den verwendeten Antikörperkonzentrationen ein eindeutiges Signal des 42kDa großen Proteins Aktin zu sehen.

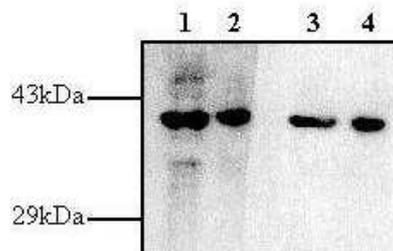


Abb. 14

Abb. 15:

Western-Blot und Immunmarkierung von Gesamtprotein aus PC-3-luc Zellen mit einem spezifischen Antikörper für VEGF-C in unterschiedlichen Konzentrationsstufen.

In einem 10%igem SDS-Gel wurden auf den Bahnen A je 10 μ g und auf den Bahnen B je 5 μ g Gesamtprotein aus PC-3-luc Zellen aufgetrennt. Für die Immunmarkierung wurde VEGF-C (H190) (Fa. Santa Cruz Biotechnology) als primärer Antikörper eingesetzt. Für die Bahnen 1 bis 4 wurden folgende Verdünnungsstufen benutzt:

- 1) 1:1000
- 2) 1:200
- 3) 0 (aqua dest.)
- 4) 1:200

Als sekundärer Antikörper wurde anti-rabbit IgG-HRP (Fa. Santa Cruz Biotechnology) verwendet. Die Konzentrationen auf den Bahnen betragen:

- 1) 1:2000
- 2) 1:10.000
- 3) 1:2000
- 4) 0 (aqua dest.)

Die Belichtung des Röntgenfilms betrug 2min.

In der Spalte S wurden 5 μ g Gesamtprotein aufgetragen und durch Amidoschwarz gefärbt. Dies diente als Vergleich zu den Banden, die sich durch die zugegebenen Antikörper spezifisch anfärben sollten. In den Blots 1 und 2 wurden nach Immunmarkierung einige Proteinbanden vermehrt markiert. Diese ließen sich auch mit dem unspezifischen sekundären Antikörper allein stärker hervorheben als in der einfachen Amidoschwarzfärbung (vgl. Bahn 3A und 3B mit S). Daraus war zu schließen, dass es sich doch eher um unspezifische Bindungen handelte.

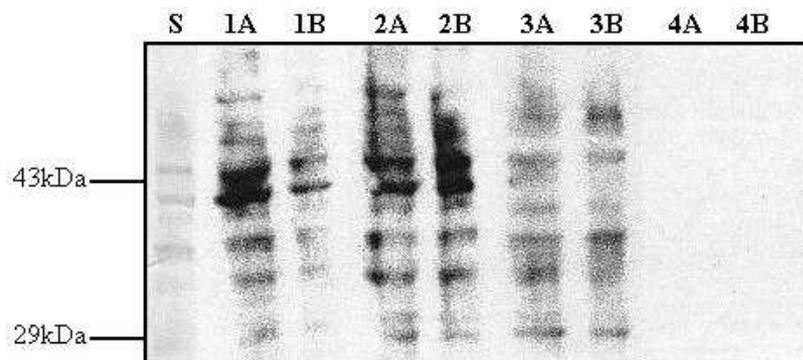


Abb. 15

Abb. 16:

Western Blot und Immunmarkierung von Gesamtprotein aus PC-3-luc und HEK-293-Zellen mit einem spezifischen primären Antikörper gegen VEGF-C.

In einem 10%igem SDS-Gel bei 50V aufgetrenntes Gesamtprotein aus PC-3-luc (1) und HEK-293-Zellen (2) zu jeweils 10 μ g (A) und 5 μ g (B) wurde nach dem Blot auf eine Immobilon-Membran mit VEGF-C (H190) (*Fa. Santa Cruz Biotechnology*) als primären Antikörper in der Konzentration von 1:1000 inkubiert. Anti-rabbit-IgG-HRP (*Fa. Santa Cruz Biotechnology*) als sekundärer Antikörper wurde in der Konzentration von 1:2000 eingesetzt. Die Belichtungszeit des Röntgenfilms betrug 5min.

In der Spalte S befinden sich 5 μ g elektrophoretisch aufgetrenntes Gesamtprotein aus PC-3-luc, welches mit Amidoschwarz nach dem Blot auf die Membran gefärbt wurde.

Ein eindeutiger Unterschied in der Proteinstruktur von PC-3-luc und HEK-293-Zellen ließ sich mit einem gegen VEGF-C gerichteten Antikörper nicht zeigen, obwohl HEK-293-Zellen kein VEGF-C bilden. Lediglich die mit einem Fragezeichen markierten Banden stellten möglicherweise allein in PC-3-luc-Zellen gebildete Proteine dar, ohne dass anhand des Proteinstandards eine direkte Zuordnung zu einer VEGF-C-Isoform möglich war.

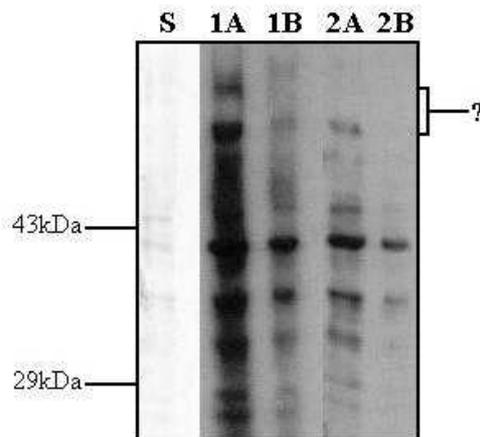


Abb. 16

Abb. 17:

Western Blot und Immunmarkierung von Gesamtprotein aus PC-3-luc im Vergleich zu reinem Aktin.

In einem 10%igen SDS-Gel wurden auf der PC-3-luc-Bahn 10 μ g Gesamtprotein dieser Zellen elektrophoretisch aufgetrennt. Parallel dazu wurden auf Bahn P 2.5 μ g reines Aktin aufgetragen. Nach dem Blot wurde über Nacht mit Rabbit-anti-VEGF-C (*Fa. Zymed Laboratories*) als primärem Antikörper in der Konzentration von 1:1000 und anschließend in anti-rabbit IgG HRP (*Fa. Santa Cruz Biotechnology*) als sekundärem Antikörper in der Konzentration von 1:2000 inkubiert. Die Belichtungszeit des Röntgenfilms betrug 2min.

Der Rabbit-anti-VEGF-C-Antikörper markiert nach Angaben der *Fa. Zymed* verschiedene Isomere des VEGF-C-Proteins. Dazu gehören Isomere von 21kDa- und 43kDa-Größe sowie ein Dimer aus 58/61kDa.

Die betont markierten Banden in der PC-3-luc-Bahn bei 61kDa und unterhalb der 35kDa-Bande des Standards ließen vermuten, dass es sich hierbei um die VEGF-C-Isomere handelte, die der primäre Antikörper erkennen sollte. Unterhalb der 35kDa waren jedoch zwei Banden markiert. Weiterhin ließ sich Aktin mit dem für VEGF-C spezifischen Antikörper bei 42kDa darstellen. Es war somit von einer unspezifischen Bindung des Antikörpers in beiden Proteinblots auszugehen.

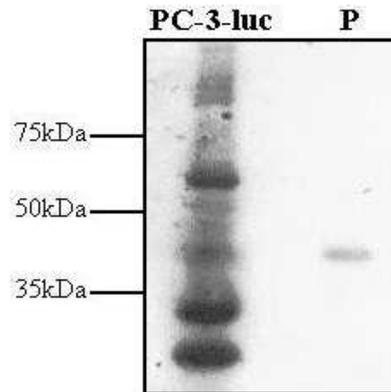


Abb. 17

3.3.4.4. Immunhistochemie

Nach dem in-vitro Nachweis supprimierter VEGF-C-Produktion in antisense-transfizierten PC-3-luc sollte auch in-vivo gezeigt werden, dass sich diese Zellen von nativen PC-3-luc unterscheiden. Dazu wurden die Zelllayer mit unterschiedlichen Antikörpern gegen VEGF-C der Fa. *Santa Cruz* und der Fa. *Zymed* inkubiert. Ähnlich wie im Northern und im Western Blot war auch hier kein signifikanter Unterschied im Färbeverhalten der Zelltypen zu erkennen. Die Zellen wurden durch die VEGF-C-Antikörper schwach und unspezifisch markiert. Auf eine fotografische Dokumentation wurde daher verzichtet.

4. Diskussion

Jede einzelne Zelle des menschlichen Körpers ist im Falle genetischer Mutation dazu fähig, den Grundstein malignen Tumorwachstums zu setzen. Oft geschieht dieser Prozess unbemerkt und erlaubt es dem Tumor frei zu wachsen. Symptome macht eine Tumorerkrankung oft erst im Stadium der Metastasierung. Ab dem Zeitpunkt der Zeldissemination wird die Behandlung einer Tumorerkrankung durch eingeschränkte Therapieoptionen deutlich schwieriger.

Bislang gibt es zahlreiche Studien zur Ursachenforschung und den Mechanismen der Zellstreuung (Karpanen, Alitalo 2001; Jussila, Alitalo 2002; He et al. 2004; Hoshida et al. 2006). Neben Zytokinen, Interleukinen und (Proto-)Onkogenen spielen auch verschiedene Wachstumsfaktoren eine große Rolle im Metastasierungsgeschehen. Besonders hervorgehoben wurde in dieser Arbeit die Wirkungsweise des Wachstumsfaktors VEGF-C und seine Funktion im Hinblick auf die Lymphgefäßentwicklung.

Das VEGF-C-Protein selbst hat kein Malignitätspotential, sondern ist ein ganz natürlich vorkommender Bestandteil eines menschlichen Organismus, ohne den dieser gar nicht lebensfähig ist (Dumont et al. 1998). Durch VEGF-C-induzierte Lymphangiogenese finden Tumoren jedoch Anschluß an das Gefäßnetz des Körpers und beginnen mit der Streuung ihrer Zellen.

Mit Hilfe der Konstruktion eines Vektors, der die Information für eine Antisense-RNA passend zur VEGF-C-RNA trägt, sollte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch Blockierung dieses Wachstumsfaktors die Metastasierung auf lymphogenem Weg entschieden unterbunden wird. Die Konstruktion eines solchen Vektors und dessen Einschleusung in maligne transformierte Zellen könnte einen neuen Ansatz in der Therapie von Krebserkrankungen darstellen. Im Gegensatz zu Chemotherapie, Operation und Bestrahlung würde bei diesem Behandlungsansatz nur der bösartige Tumor selbst angegriffen und gesundes, an den Tumor angrenzendes Gewebe geschont werden (Zhang 1995; Im, Kim, Gomez-Manzano et al. 2001).

Als Studienobjekte dienten in dieser Arbeit Prostataadenokarzinomzellen. Diese Zellen metastasieren bevorzugt lymphogen. Es waren PC-3-Zellen, aus denen im Jahr 1996 erstmals die cDNA für VEGF-C kloniert wurde (Joukov, Pajusola et al. 1996). Im ersten Schritt der vorliegenden Arbeit wurden drei zufällig ausgewählte Segmente der DNA für VEGF-C in PC-3-Zellen mittels einer Polymerasekettenreaktion und nachfolgender Gelelektrophorese nachgewiesen. Dies bestätigte, dass es sich bei dieser Zellpopulation um geeignete Studienobjekte handelte. Zielobjekte der Antisense-RNA für VEGF-C sollten diese drei Abschnitte des VEGF-C-Gens sein. Nach der in dieser Arbeit beschriebenen Theorie wurden entsprechende Antisense-DNA-Sequenzen mit Hilfe eines Plasmids als Vektor in die Zielzellen eingeschleust. Dann wurde der Effekt dieser zusätzlichen Erbinformation in diesen Zellen untersucht.

Vor dem Studium der Auswirkungen der VEGF-C-Antisense-Produkte auf Wachstum und Metastasierung in vivo mußte ein Nachweis über die Expression der Antisense-Produkte in den plasmidtransfizierten PC-3-Zellen erbracht werden. Zunächst wurde dazu das neu konstruierte Plasmid mit den Inserts der drei antisense-VEGF-C-Gensequenzen durch die *Fa. Qiagen* sequenziert. Die Sequenzierungsanalyse zeigte, dass die jeweils 504, 511 und 445 Basenpaar langen VEGF-C-Genabschnitte in Antisense-Sequenz im Klonierungsbereich des Plasmids pCEP4 eingefügt waren.

Schwierigkeiten ergaben sich im Nachweis der biologischen Auswirkungen dieser zusätzlichen DNA in den PC-3-Zellen. Im Northern Blot gelang kein eindeutiger Nachweis der Antisense-RNA trotz unauffälliger Positivkontrolle. Die gleiche Problematik zeigte sich im Western Blot. Dementsprechend ließ sich auch in der Zellkultur transfizierter PC-3-Zellen immunhistochemisch kein Unterschied zu nativen PC-3-Zellen darstellen. Mit Rücksicht auf die eindeutigen und erwartungsgemäßen Ergebnisse der Positivkontrollen in den jeweiligen Versuchsreihen konnte davon ausgegangen werden, dass Versuchsaufbau und -durchführung korrekt waren.

Diese Diskrepanz gab Anlaß dazu, sich intensiver mit dem Thema „Antisense-RNA“ zu beschäftigen, um nach Erklärungen für negative und uneindeutige Ergebnisse bei den unterschiedlichen Nachweismethoden zu suchen. Veröffentlichungen über Antisense-Methoden in der Tumorforschung auf genetischer Ebene sind relativ selten zu finden. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die Methode trotz plausibler

Theorie in der Praxis sehr anfällig ist. Bereits in der Theorie lassen sich gewisse mögliche Störfaktoren für das ordnungsgemäße Wirken des Antisense-Konstruktes beschreiben. Möglich sind unspezifische Bindungen der überwiegend negativ geladenen Antisense-RNA an überwiegend positiv geladene Zellmembranen oder Proteine. Oder es kommt zu zufälliger Destruktion der Antisense-mRNA durch zelleigene Mechanismen oder natürlicher Degradation (Mercola et al. 2006).

Bisher ist es ungeklärt, wie die Transkriptionsrate des Antisense-Produktes überwacht und gesteuert werden kann (Mercola et al 1995). Es gibt Hinweise, dass bei einer Antikörper- oder Antisense-Therapie, welche auf die angiogenetische Wirkung von VEGF's abzielt, eine Art Therapieresistenz in den Tumorzellen durch Hochregulation der VEGF-Genexpression entsteht (Viloria-Petit 2001, Wong et al. 2001).

Die Antibiotika-Resistenz der transfizierten Zellen bzw. der transformierten Bakterien beweist, dass das veränderte Plasmid mit seinen Antibiotikaresistenzgenen in die Stoffwechselprozesse der Zelle eingreift. Dennoch kann über die ebenso erfolgende Transkription der anderen auf dem Plasmid kodierten Gene keine Aussage getroffen werden, sondern diese Tatsache nur als sehr wahrscheinlicher Hinweis darauf gedeutet werden. Um die Transkription der Zielsequenz zu fördern, wurden die Antisense-Genabschnitte in der Lesefolge hinter einen Verstärker, den Promotor des Zytomegalievirus, eingebaut (Oku Tjuvaje et al. 1998).

Es ist möglich, dass sich bei den gewählten Zielsequenzen des VEGF-C-Gens auf der etwa 500bp langen RNA nicht einkalkulierte Sekundärstrukturen formen, die eine Interaktion zwischen Antisense-RNA und nativer RNA unterbinden (Stein et al. 1993). In der Literatur wird beschrieben, dass nach statistischer Kalkulation eine Sequenz von 13 Basen in einer RNA und eine Sequenz von 17 Basen in einer DNA nur einmal in einem Organismus vorkommt und daher spezifisch reagiert (Helene, Toulme 1990). Vielleicht sind die in dieser Arbeit untersuchten Sequenzen zu lang und es überwiegen zuvor beschriebene unspezifische Interaktionen mit anderen Molekülen. Eine noch geringere molekulare Größe der Ziel-RNA würde ihren Nachweis erschweren (Senn et al. 2005). Außerdem kann es geschehen, dass eine sehr kurze Antisense-Sequenz von zelleigenen Nukleasen als fremd definiert und über einen natürlichen Schutzmechanismus der Zelle gegenüber fremder DNA degradiert wird (Mercola, Cohen 1995).

Zusammenfassend muß gesagt werden, dass dem Antisense-Modell eine Reihe von Störfaktoren entgegenstehen. Diese verhinderten in dieser Arbeit eine detaillierte Untersuchung der Auswirkungen einer Antisense-Gensequenz auf den Zellstoffwechsel. Die genaue Identität des Störfaktors konnte nicht ermittelt werden. Es ist zu überdenken, ob der hier dargestellte Versuch der Metastasierungsinhibition und hieraus abgeleiteter Therapieformen sinnvoll ist und zum Erfolg führen kann, wenn bereits in vitro das Nachvollziehen der theoretischen Überlegungen anhand einer Zellpopulation nicht gelungen ist.

5. Zusammenfassung

In lymphogen metastasierenden Prostataadenokarzinomen werden signifikant erhöhte Proteinspiegel von VEGF-C nachgewiesen (Tsurusaki 1999).

Die Neubildung von Lymphgefäßen ist maßgeblich abhängig von der Interaktion von VEGF-C und seinem Rezeptor VEGFR-3 (Dumont 1998; Cao, Linden 1998; Mäkinen 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob in vitro die Bildung von VEGF-C in Prostataadenokarzinomzellen (PC-3) mit Hilfe einer Antisense-Gensequenz zu unterdrücken ist. Im Antisense-Experiment dient synthetisch hergestellte, zur Ziel-Nucleinsäuresequenz invers komplementäre DNA als spezifischer Inhibitor der Genexpression (Mercola 1995). Diese DNA wird über einen Vector in die Zielzelle geschleust und greift dort in den Zellstoffwechsel ein.

Vector der Antisense-DNA ist in dieser Arbeit das Plasmid pCEP4. Ziel der Antisense-Sequenz ist die VEGF-C-kodierende DNA. In das Plasmid wurden enzymatisch gesteuert drei Teilsequenzen des VEGF-C-Gens invers eingebaut, so dass davon transkribierte mRNA komplementär zu Teilen der natürlichen mRNA für das Protein VEGF-C ist. Beide RNA-Stränge hybridisieren aufgrund der komplementären Basenabfolge zu einer Doppelhelix. Dies verhindert die Translation der Ziel-RNA (Ho 1997).

In einer Polymerase-Kettenreaktion wurde mittels drei spezifischer Primerpaare die Existenz des VEGF-C-Gens in vorliegender PC-3-Zellkultur nachgewiesen. Durch eine Sequenzanalyse wurde bewiesen, dass entsprechend der Theorie regelrecht aufgebaute Plasmide mit VEGF-C-Antisense-Inserts in vitro hergestellt worden waren. Mit Hilfe von Antibiotika-Resistenzen wurden Antisense-Plasmid tragende PC-3-Zellkulturen isoliert. Die in der Theorie konstruierte Wirkung der Antisense-Sequenzen konnte in vitro nicht nachvollzogen werden. Im Northern-Blot zeigten Antisense-transfizierte PC-3-Zellen keinen signifikanten Unterschied in der RNA-Zusammensetzung im Vergleich zu nativen PC-3-Zellen. Gleiches gilt für den Western-Blot hinsichtlich der Proteinausstattung.

Zusammenfassend konnte ein zum VEGF-C-Gen regelrecht aufgebautes Antisense-Plasmid hergestellt und erfolgreich in Zellen transfiziert werden. Die Theorie der Inhibition der VEGF-C-Synthese mit Hilfe eines Antisense-Vectors konnte in vitro nicht nachvollzogen werden.

6. Abkürzungen

Abb.:	Abbildung
ATP:	Adenosintriphosphat
CAT:	Chloramphenicol-Azethyltransferase
CMV:	Cytomegalievirus
CTP:	Cytosintriphosphat
cDNA:	complementary DNA
dNTP:	desoxy Nucleotidtriphosphat
DAB:	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DEPC:	Diethylpyrocarbonat
DIG:	Digoxigenin
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonucleidacid
DOC:	Natriumdesoxycholsäure
DTT:	Dithiothreitol
EBV:	Epstein-Barr-Virus
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EGF:	epidermal growth factor
EZM:	Extrazellulärmatrix
FCS:	fetal calf serum
FGF:	fibroblast growth factor
FIGF:	c-fos induced growth factor
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GF:	growth factor
HGF:	HGF
GTP:	Guanidintriphosphat
IL:	Interleukin
LB:	lysogeny broth
MOPS:	Morphelinopropansulfonsäure
mRNA:	messenger RNA
NTP:	Nucleotidtriphosphat
PBS:	phosphate buffered saline

PC-3:	Prostataadenokarzinomzellen
PCR:	Polymerase-chain-reaction
PDGF:	platelet derived growth factor
PIGF:	plazenta derived growht factor
RNA:	Ribonucleicacid
RT-PCR:	reverse transcription Polymerase-chain-reaction
SDS:	Sodiumdodecylsulfat
SSC:	Sodium-salt-citrate
SOC:	salt optimized carbon
TEMED:	Tetramethylethylendiamin
TGF:	transforming growth factor
TNF:	tumor necrosis factor
TTP:	Thymidintriphosphat
UTP:	Uraciltriphosphat
VEGF:	vascular endothelial growth factor
VEGFR:	vascular endothelial growth factor receptor

7. Literaturverzeichnis

Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA (1998):

Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk-1) and VEGF receptor 3 (Flt4).

Proc Natl Acad Sci USA 95: 548-553

Achen MG, Mann GB, Stacker SA (2006):

Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis.

British J Cancer 95: 1355-1360

Achen MG, McColl BK, Stacker SA (2005):

Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis.

Cancer Cell 7: 121-127

Achen MG, Williams R, Minekus MP, Thornton GE, Stenvers K, Rogers PA, Lederman F, Roufail S, Stacker SA (2001):

Localization of vascular endothelial growth factor-D in malignant melanoma suggests a role in tumor angiogenesis.

Am J Pathol 193: 147-154

Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M, Abe T, Kinoshita J, Maehara Y, Sugimachi K (2000) :

Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues.

Br. J. Cancer 83: 887-891

Alitalo K, Carmeliet P (2002):

Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease.

Cancer Cell 1: 219-227

Andre T (2000) :

VEGF, VEGF-B, VEGF-C and their receptors KDR, FLT-1 and FLT-4 during the neoplastic progression of human colonic mucosa.

Int. J. Cancer 86: 174-181

Arinaga M, Noguchi T, Takeno S, Chujo M, Miura T, Uchida Y (2003):

Clinical significance of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in patients with nonsmall cell lung carcinoma.

Cancer 97: 457-464

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM (1999):

Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization.

Circ. Res. 85: 221-228

Baldwin ME, Catimel B, Nice EC (2001) :

The specificity of receptor binding by vascular endothelial growth factor-D is different in mouse and man.

J Biol Chem 276: 19166-19171

Baldwin ME, Roufail S, Halford MM, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG (2001):

Multiple forms of mouse vascular endothelial growth factor-D are generated by RNA splicing and proteolysis.

J Biol Chem 276: 44307-44314

Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson D (1999):

LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan.

J. Cell Biol. 144: 789-801

Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM (2002):

Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors.

J Anat. 200: 581-597

Belikova AM, Zarytova VF, Grineva NI (1967):

Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues.

Tetrahedron Lett 37: 3357-3362

Bohnsack BL, Hirschi KK (2004):

Red light, green light. Signals that control endothelial cell proliferation during embryonic vascular development.

Cell Cycle 3: 1506-1511

Bubendorf L, Schopfer A, Wagner U (2000):

Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1589 patients.

Hum Pathol 31: 578-582

Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Buto S, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA,

Bongarzone I (1999) :

Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features.

Am. J. Pathol. 155: 1967-1976

Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmeey JH (2005):

Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF).

J Cell Mol Med 9: 777-794

Casley-Smith JR (1980):

The fine structure and functioning of tissue channels and lymphatics.

Lymphology 12: 177-183

Cao Y, Linden P, Farnebo J, Cao R, Eriksson A, Kumar V, Qi J-H, Claesson-Welsh L, Alitalo K (1998):

Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo.

Proc Natl Acad Sci USA 95: 14389-14394

Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MD, Anand-Apte B, Weatherbee JA, Wang Y, Fang F, Flanagan JF, Lik-Shing Tsang M (1996):
Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor.
J. Biol. Chem. 271: 3154-3162

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq 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

Chang LK, Garcia-Cardena G, Farnebo F, Fannon M, Chen EJ, Butterfield C, Moses MA, Mulligan RC, Folkman J, Kaipainen A (2004):
Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis.
Proc Natl Acad Sci USA 101: 11658-11663

Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL (2000):
Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood.
Proc Natl Acad Sci 97: 14608-14613

Chilov D, Kukk E, Taira S, Jeltsch M, Kaukonen J, Palotie A, Joukov V, Alitalo K (1997):
Genomic Organization of Human and Mouse Genes for Vascular Endothelial Growth Factor C.
J. Biol. Chem. 272: 25176-25183

Clauss M (2000):
Molecular Biology of the VEGF and the VEGF Receptor Family.
Seminars in Thrombosis and Hemostasis - Vol. 26, No. 5: 561-569

Connolly DT, Heuvelman D, Nelson R, Olander JV, Eppler BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J (1989):
Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis.
J. Clin. Invest. 84: 1470-1478

Dallas A, Vlassov AV (2006):

RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential.

Med Sci Monit 12: 67-74

Detmar M (2000):

Tumor Angiogenesis.

J. Invest. Dermatology Symposium Proceedings 5: 20-23

De Vries 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

DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Sonderman DD, Palisi TM, Sullivan KA, Thomas KA (1995):

Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor: placenta growth factor heterodimer.

J. Biol. Chem. 270: 7717-7723

Drake C (2003):

Embryonic and adult vasculogenesis.

Birth Defects Res Part C Embryo Today 69: 73-82

Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K (1998):

Cardiovascular Failure in Mouse Embryos Deficient in VEGF Receptor-3.

Science 282: 946-949

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM (1995):

Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular permeability, and angiogenesis.

Am. J. Pathol. 146: 1029-1039

Dvorak HF (2002):

Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy.

J. Clin. Oncol. 20: 4368-4380

Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA (1999):

Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability.

Mol Cell 4: 915-924

Eichmann A, Marcelle C, Breant C, Le Douarin NM (1993):

Two molecules related to the VEGF receptor are expressed in early endothelial cells during avian embryonic development.

Mech. Dev. 42: 33-48

Enholm B, Karpanen T, Jeltsch M, Kubo H, Stenback F, Prevo R et al. (2001):

Adenoviral expression of vascular endothelial growth factor-c induces lymphangiogenesis in the skin.

Circ Res 88: 623-629

Enholm B, Paavonen K, Ristimaki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, Kivinen L, Laiho M, Olofsson B, Joukov V, Eriksson U, Alitalo K (1997):

Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia.

Oncogene 14: 2475-2483

Eriksson U, Alitalo K (1999):

Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 237: 41-57

Estler CJ, Schmidt H (2007):

Pharmakologie und Toxikologie

Schattauer-Verlag: 805-812

Fellmer PT, Sato K, Tanaka R, Okamoto T, Kato Y, Kobayashi M, Shibuya M, Obara T (1999):

Vascular endothelial growth factor-C gene expression in papillary and follicular thyroid carcinomas.

Surgery 126: 1056-1061

Ferrara N (2001):

Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis.

Am J Physiol Cell Physiol 280: 1358-1366

Ferrara N, Bunting S (1996):

Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis.

Curr Opin Nephrol. Hypertension 5: 35-44

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea K-S, Powellbraxton L, Hillan K-J, Moore M-W (1996):

Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene.

Nature 380: 439-442

Ferrara N, Davis-Smyth T (1997):

The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor.

Endocrinol Rev 18: 4-25

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003):

The biology of VEGF and its receptors.

Nat Med 9: 669-676

Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW (1992):

Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins.

Endocr. Reviews 13: 18-32

Fidler IJ (2003):

The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited.

Nat Rev Cancer 3: 453-458

Fire A, Xu S, Montgomery MK (1998):

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.

Nature 391: 806-811

Fitz LJ, Morris JC, Towler P, Long A, Burgess P, Greco R, Wang J, Gassaway R, Nickbarg E, Kovacic S, Ciarletta A, Giannotti JA, Finnerty H, Zollner R, Beier D, Leak LV, Turner KJ, Wood CR (1997):

Characterization of murine Flt4 ligand/VEGF-C

Oncogene 15: 613-618

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitmann ML (1995):

Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium.

Nature 376: 66-70

Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J (1999):

Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-12 knock-out mice.

Development 126: 3015-3025

Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR (1996):

Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells.

Nat Med 2: 1096-1103

Gerli R, Solito R, Weber E, Agliano M (2000):

Specific adhesion molecules bind anchoring filaments and endothelial cells in human skin initial lymphatics.

Lymphology 33: 148-157

Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Shirbuya M, Neufeld G (2001):
Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes.
Biol Chem 276: 18688-18694

Hanahan D, Weinberg RA (2000):
The hallmarks of cancer.
Cell 100: 57-70

Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean G, Thurston S, Roberge RK, Jain RK,
McDonald DM (2000):
Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness.
Am J Pathol 156: 1363-1380

Hautmann R, Huland H (2006):
Urologie.
Springer-Verlag: 229-240

He Y, Karpanen T, Alitalo K (2004):
Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis.
Biochim Biophys Acta 1654: 3-12

He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K (2002):
Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular
endothelial growth factor receptor 3 signaling.
J Natl Cancer Inst 94: 819-825

He Y, Rajantie I, Pajusola K, Jeltsch M, Holopainen T, Yla-Herttuala S, Harding T, Jooss K,
Takahashi T, Alitalo K (2005):
Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic
endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels.
Cancer Res 65: 4739-4746

Helene C, Toulme JJ (1990):

Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids.

Biochim Biophys Acta 1049: 99-125

Hiratsuka S, Maru Y, Okada A et al. (2001) :

Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis.

Cancer Res 61: 1207-1213

Ho PTC, Parkinson DR (1997)

Antisense Oligonucleotides as therapeutics for malignant diseases.

Seminars in Oncology 24: 187-202

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, van Oosterom AT, de Bruijn EA (2004):

Vascular endothelial growth factor and angiogenesis.

Pharmacol Rev 56: 549-580

Holmes DIR, Zachary I (2005):

The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease.

Genome Biology 6: 209

Hong YK, Shin JW, Detmar M (2004):

Development of the lymphatic vascular system: a mystery unravels.

Dev Dyn 231: 462-473

Hoshida T, Isaka N, Hagendoorn J, diTomaso E, Chen YL, Pytowski B, Fukumura D, Padera TP, Jain RK (2006):

Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-c increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications.

Cancer Res 66: 8065-8075

Im S-A, Kim J-S, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Liu T-J, Cho M-S, Seong C-M, Lee SN, Hong Y-K, Yung WKA (2001):
Inhibition of breast cancer growth in vivo by antiangiogenesis gene therapy with adenovirus-mediated antisense-VEGF.
Brit. J. Cancer 84: 1252-1257

Irrthum A, Karkkainen MJ, Devriendt K, Alitalo K, Vikkula M (2000):
Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase.
Am J Hum Genet 67: 295-301

Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, Wijelath ES (2001):
Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells.
J Cell Physiol 188: 359-368

Jackson DG (2001):
New Molecular Markers for the Study of Tumour Lymphangiogenesis.
Anticancer Research 21: 4279-4284

Jackson DG, Prevo R, Clasper S, Banerji S (2001):
LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis.
Trends Immunol 22: 317-321

Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K (1997):
Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice.
Science 276: 1423-1425

Jeltsch M, Tammela T, Alitalo K, Wilting J (2003):
Genesis and pathogenesis of lymphatic vessels.
Cell Tissue Res 314: 69-84

Jorgensen R (1990):

Altered gene expression in plants due to trans interaction between homologous genes.

Trends Biotechnol 8: 340-344

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K (1996):

A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases.

EMBO J. 15: 290-298

Joukov V, Kaipainen A, Jeltsch M, Pajusola K, Olofsson B, Kumar V, Eriksson U, Alitalo K (1997):

Vascular Endothelial Growth Factors VEGF-B and VEGF-C.

Journal of Cellular Physiology 173: 211-215

Joukov V, Kumar V, Sorsa T, Arighi E, Weich H, Saksela O, Alitalo K (1998):

A Recombinant Mutant Vascular Endothelial Growth Factor-C that Has Lost Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Binding, Activation, and Vascular Permeability Activities.

J. Biol. Chemistry 273: 6599-6602

Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K (1997):

Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C.

EMBO J. 16: 3898- 3911

Junqueira LC, Carneiro J, Gratzl M (2005):

Histologie: Kreislaufsystem

Springer-Verlag: 164-186

Jussila L, Alitalo K (2002):

Vascular growth factors and lymphangiogenesis.

Physiol. Rev. 82: 673-700

Jussila L, Valtola R, Partanen TA, Salven P, Heikkila P, Matikainen MT, Renkonen R, Kaipainen A, Detmar M, Tschachler E, Alitalo R, Alitalo K (1998):
Lymphatic endothelium and Kaposi's sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3.

Cancer Res 58: 1599-1604

Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K (1995):

Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development.

Proc Natl Acad Sci U S A 92: 3566-3570

Kajita T, Ohta Y, Kimura K, Tamura M, Tanaka Y, Tsunozuka Y, Oda M, Sasaki T, Watanabe G (2001):

The expression of vascular endothelial growth factor C and its receptors in non-small cell lung cancer.

Br. J. Cancer 85: 255-260

Kajiya K, Hirakawa S, Ma B, Drinnenberg I, Detmar M (2005):

Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function.

EMBO J 24: 2885-2895

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV (2004):

Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins.

Nature Immunol 5: 74-80

Karkkainen MJ, Mäkinen T, Alitalo K (2002):

Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research.

Nature Cell Biology 4: E2-E5

Karkkainen MJ, Petrova TV (2000):

Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis.

Oncogene 19: 5598-5605

Karpanen T, Alitalo K (2001):

Lymphatic vessels as targets of tumor therapy?

J Exp Med 194: 37-42

Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Ylä-Herttuala S, Jäättelä M, Alitalo K (2001):

Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth.

Cancer Res. 61: 1786-1790

Karpanen T, Wirzenius M, Mökinen T, Veikkola T, Haisma HJ, Achen MG, Stacker SA, Pytowski B, Ylä-Herttuala S, Alitalo K (2006):

Lymphangiogenic growth factor responsiveness is modulated by postnatal lymphatic vessel maturation.

Am J Pathol 169: 708-718

Kaushal V, Mukunyadzi P, Dennis RA, Siegel ER, Johnson DE, Kohli M (2005):

Stage-specific characterization of the vascular endothelial growth factor axis in prostate cancer: expression of lymphangiogenic markers is associated with advanced-stage disease.

Clin Cancer Res 11: 584-593

Kearney JB, Kappas NC, Ellerstrom C, DiPaola FW, Bautch VL (2004):

The VEGF receptor flt-1 (VEGFR-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis.

Blood 103: 4527-4535

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT (1989):

Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF.

Science 246: 1309-1312

Kondo K, Kaneko T, Baba M, Konno H (2007):

VEGF-C and VEGF-A synergistically enhance lymph node metastasis of gastric cancer.

Biol Pharm Bull 30: 633-637

Kreuger J, Nilsson I, Kerjaschki D, Petrova T, Alitalo K, Claesson-Welsh L (2006):

Early lymph vessel development from embryonic stem cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 26: 1073-1078

Kubo H, Fujiwara T, Jussila L, Hashi H, Ogawa M, Shimizu K, Awane M, Sakai Y,

Takabayashi A, Alitalo K, Yamaoka Y, Nishikawa S-I (2000):

Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis.

Blood 96: 546-553

Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joudov V, Alitalo K (1996):

VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development.

Development 122: 3829-3837

Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H (1999) :

Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer.

Jpn. J. Cancer Res. 90: 977-981

Lara JR, Twardkowski P, Quinn DI (2004):

Angiogenesis-targeted therapies in prostate cancer.

Clin Prostate Cancer 3: 165-173

Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh S-M, Avraham H, Wood WI (1996):

Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1988-1992

Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N (1989):
Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen.
Science 246: 1306-1309

Li X, Eriksson U (2001):
Novel VEGF family members: BEGF-B, VEGF-C and VEGF-D.
The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 33: 421-426

Li R, Younes M, Wheeler TM (2004):
Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) in human
prostate.
Prostate 58: 193-199

Liu XE, Sun XD, Wu JM (2004):
Expression and significance of VEGF-C and FLT-4 in gastric cancer.
World J Gastroenterol 10: 352-355

Lohela M, Saaristo A, Veikkola T, Alitalo K (2003):
Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies.
Thromb. Haemost. 90: 167-184

Luttun A, Tjwa M, Moons L (2002) :
Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor
angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1.
Nat Med 8: 831-840

Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A (2001):
Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells
blocks tumor angiogenesis and growth.
Nat. Med. 7: 1194-1201

Lymboussaki A, Olofsson B, Eriksson U, Alitalo K (1999):
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF-C Show Overlapping Binding Sites
in Embryonic Endothelia and Distinct Sites in Differentiated Adult Endothelia.
Circ Res 85: 992-999

Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ (1994):
Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus.
J. Virol. 68: 84-92

Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R,
Jackson DG, Kubo H, Nishikawa S-I, Ylä-Herttua S, Alitalo K (2001):
Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing
soluble VEGF receptor-3.
Nat Med 7: 199-205

Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S (2001) :
Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the
VEGF-C/D receptor VEGFR-3.
EMBO J 20: 4762-4773

Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J,
Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS (2001):
Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumor
metastasis.
EMBO J 20: 672-682

Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T, Jackson DG, Härkönen PL (2002):
VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic
MCF-7 tumours.
Int J Cancer 98: 946-951

Marconcini L, Marchio S, Morbidelli L, Cartocci E, Albini A, Ziche M, Bussolino F, Oliviero S (1999):

C-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro.

Proc Natl Acad Sci USA 96: 9671-9676

Mercola D, Cohen JS (1995):

Antisense approaches to cancer gene therapy.

Cancer Gene Therapy 2: 47-59

Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ, Dehio C (1999):

A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases.

EMBO J. 18: 363-374

Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A (1993):

High affinity VEGF binding and development expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis.

Cell. 72: 835-846

Mizuno T, Chou MY, Inouye M (1984):

A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA).

Proc Natl Acad Sci USA 81: 1966-1970

Morabito A, de Maio E, di Maio M, Normanno N, Perrone F (2006):

Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions.

The Oncologist 11: 753-76

Nathanson SD (2003):

Insights into the mechanisms of lymph node metastasis.

Cancer 98: 413-423

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999):

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.

FASEB J 13: 9-22

Neufeld G, Tessler S, Gitay-Goren H, Cohen T, Levi B-Z (1994):

Vascular endothelial growth factor and its receptors.

Progress in Growth Factor Res. 5: 89-97

Ng YS, Rohan R, Sunday ME, Demello DE, D'Amore PA (2001):

Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult.

Dev Dyn 220: 112-121

Niki T, Iba S, Tokunou M, Yamada T, Matsuno Y, Hirohashi S (2000) :

Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma.

Clin. Cancer Res. 6: 2431-2439

Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H (2002):

Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis.

Oncogene 21: 2000-2008

Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya MA (1998):

A 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

Oh S-J, Jeltsch MM, Birkenhäger R, McCarthy JEG, Weich HA, Christ B, Alitalo K, Wilting J (1997):

VEGF and VEGF-C: Specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane.

Developmental Biology 188: 96-109

Ohta Y, Nozawa H, Tanaka Y, Oda M, Watanabe Y (2000):

Increased vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor-c and decreased nm23 expression associated with microdissemination in the lymph nodes in stage I non-small cell lung cancer.

J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 119: 804-813

Oku T, Tjuvajev JG, Miyagawa T, Sasajima T, Joshi A, Joshi R, Finn R, Claffey KP, Blasberg RG (1998):

Tumor growth modulation by sense and antisense vascular endothelial growth factor gene expression: effects on angiogenesis, vascular permeability, blood volume, blood flow, fluorodeoxyglucose uptake, and proliferation of human melanoma intracerebral xenografts.

Cancer Res 58: 4185-4192

Oliver G (2004):

Lymphatic vasculature development.

Nat Rev Immunol 4: 35-45

Olivier G, Alitalo K (2005):

The lymphatic vasculature: recent progress and paradigms.

Annu Rev Cell Dev Biol 21: 457-483

Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U (1998):

Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:11709-11714

Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U (1996):
Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform.
J. Biol. Chem. 271: 19310-19317

Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson R, Alitalo K, Eriksson U (1996):
Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2576-2581

Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, Oliviero S (1996):
Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11675-11680

Paavonen K, Horelli-Kuitunen N, Chilov D, Kukk E, Pennanen S, Kallioniemi O-P, Pajusola K, Olofsson B, Eriksson U, Joukov V, Palotie A, Alitalo K (1996):
Novel Human Vascular Endothelial Growth Factor Genes VEGF-B and VEGF-C Localize to Chromosomes 11q13 and 4q34, Respectively.
Circulation 93: 1079-1082

Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K (2000):
Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing.
Am J Pathol 156: 1499-1504

Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E (2002):
Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumoral lymphatics.
Science 296: 1883-1886

Pantel K, Brakenhoff RH (2004):
Dissecting the metastatic cascade.
Nat Rev Cancer 4: 448-456

Parke SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA (1996):

Cancer statistics.

CA Cancer J Clin 47: 5-27

Partanen TA, Arola J, Saaristo A, Jussila L, Ora A, Miettinen M, Stacker S, Achen M, Alitalo K (2000):

VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues.

FASEB J 14: 2087-2096

Pepper MS (2001):

Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality?

Clin. Cancer Res. 7: 462-468

Pepper MS, Skobe M (2003):

Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties.

J Biol Chem 163: 209-213

Pepper MS, Tille JC, Nisato R, Skobe M (2003):

Lymphangiogenesis and tumor metastasis.

Cell Tissue Res 314: 167-177

Persaud K, Tille JC, Liu M, Zhu Z, Jimenez X, Pereira DS (2004):

Involvement of the VEGF receptor 3 in tubular morphogenesis demonstrated with a human anti-human VEGFR-3 monoclonal antibody that antagonizes receptor activation by VEGF-C.

J Cell Sci 117: 2745-2756

Popescu FD (2005):

Antisense- and RNA interference-based therapeutic strategies in allergy.

J Cell Mol Med 4: 840-853

Prevo R, Banerji S, Ferguson DJ, Clasper S, Jackson DG (2001):

Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium.

J Biol Chem 276: 19420-19430

Pytowski B, Goldman J, Persaud K, Wu Y, Witte L, Hicklin DJ, Skobe M, Boardman KC, Swartz MA (2005):

Complete and specific inhibition of adult lymphatic regeneration by a novel VEGFR-3 neutralizing antibody.

J Natl Cancer Inst 97: 14-21

Rauber A/Kopsch F, Leonard H, Töndury G, Tillmann B, Zilles K (1987):

Anatomie des Menschen. Band II. Innere Organe.

Georg Thieme Verlag: 4-29

Reynolds AR, Kyprianou N (2006):

Growth factor signalling in poststatic growth: significance in tumour development and therapeutic targeting.

British J Pharmacology 147: 144-152

Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V (2001):

Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo.

Anat Rec 264: 317-324

Riede U-N, Herbst EW (2004):

Immunpathologie

Georg Thieme Verlag: 170-206

Riede U-N, Böcking A, Böhm N (2004):

Allgemeine und Spezielle Pathologie. Vorsteherdrüse.

Georg Thieme Verlag: 929-935

Riede U-N, Walch A, Wiestler OD (2004):

Allgemeine und Spezielle Pathologie. Autonomes Zellwachstum (Tumorpathologie).

Georg Thieme Verlag: 338-384

Ristimaki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K (1998):
Proinflammatory Cytokines Regulate Expression of the Lymphatic Endothelial Mitogen
Vascular Endothelial Growth Factor-C.
J Biol Chem 273: 8413-8418

Roberts N, Kloos B, Cassella M, Podgrabinska S, Persaud K, Wu Y, Pytowski B,
Skobe M (2006):
Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses
lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2.
Cancer Res 66: 2650-2657

Robinson CJ, Stringer SE (2001):
The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors.
J Cell Sci 114: 853-865

Roma AA, Magi-Galluzzi C, Kral MA, Jin TT, Klein EA, Zhou M (2006):
Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastases in prostate
adenocarcinoma.
Mod Pathol 19: 392-398

Roskoski R (2007):
Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression.
Crit Rev Oncol Hematol 62: 179-213

Rubio N, Villacampa MM, Blanco J (1998):
Traffic to lymph nodes of PC-3 Prostate tumor cells in nude mice visualized using the
luciferase gene as a tumor cell marker.
Lab Invest 78: 1315-1325

Rubio N, Villacampa MM, EL Hilali N, Blanco J (2000):
Metastatic burden in nude mice organs measured using prostate tumor PC-3 cells expressing
the luciferase gene as a quantifiable tumor cell marker.
The Prostate 44: 133-143

Ruhrberg C (2003):

Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF.

Bioassays 25: 1052-1060

Saaristo A, Veikkola T, Enholm B (2002):

Adenoviral VEGF-C overexpression induces blood vessel enlargement, tortuosity and leakiness, but no sprouting angiogenesis in the skin or mucous membranes.

FASEB J 16: 1041-1049

Sabin FR (1902):

On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig.

Am. J. Anat. 1: 367-391

Salven P, Lymboussaki A, Heikkilä P, Jääskela-Saari H, Enholm B, Aase K, v. Euler G, Eriksson U, Alitalo K, Joensuu H (1998):

Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors.

Am. J. Pathol. 153: 103-108

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989):

Molecular cloning: A Laboratory Manual.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Savory LJ, Stacker SA, Fleming SB, Niven BE Mercer AA (2000):

Viral vascular endothelial growth factor plays a critical role in orf virus infection.

J Virol 74: 10699-10706

Scavelli C, Weber E, Agliano M, Cirulli T, Nico B, Vacca A, Ribatti D (2004):

Lymphatics at the crossroads of angiogenesis and lymphangiogenesis.

J Anat 204: 433-449

Schiebler TH (2005):

Anatomie: Histologie, Gewebelehre, allgemeine Entwicklungsgeschichte, Blut und Abwehrsystem.

Springer-Verlag: 1-151

Schmidt RF, Lang F, Thews G (2005):

Physiologie des Menschen. Kreislauf.

Springer-Verlag: 603-663

Seeber S, Schütte J (2003):

Therapiekonzepte Onkologie.

Springer-Verlag: 64

Senger D, Galli S, Dvorak A, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983):

Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.

Science 219: 983-986

Shalaby F, Ho J, Stanford WL (1997):

A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis.

Cell 89: 981-990

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi T-P, Gertsenstein M, Wu X-F, Breitman M,

Schuh A-C (1995):

Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice.

Nature 376: 62-66

Shibuya M (1995):

Role of VEGF-Flt receptor system in normal and tumor angiogenesis.

Adv. Cancer Res. 67: 281-316

Shibuya M (2003):

Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signalling and specific ligand, VEGF-E.

Cancer Sci 94: 751-756

Shibuya M (2006):

Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 und receptor-2 in angiogenesis.

J Biochem Mol Biol 39: 469-478

Shibuya M, Claesson-Welsh L (2006):

Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Exp. Cell Res. 312: 549-560

Shushanov S (2000):

VEGF-C and VEGFR-3 expression in human thyroid pathologies.

Int. J. Cancer 86: 47-52

Siewert J-R, Wittekind C, Schackert HK (2006):

Chirurgie: Klassifikation und Behandlung von Tumoren. Molekulare Biologie in der Chirurgie.

Springer-Verlag: 161-181

Skobe M, Detmar M (2000):

Structure, Function, and Molecular Control of the Skin Lymphatic System.

J Investig Dermatol Symp Proc 5: 14-19

Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M (2001):

Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis.

Nature Medicine 7: 192-198

Society American Cancer (2005):

Cancer facts and figures.

Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K (2002):

Lymphangiogenesis and cancer metastasis.

Nature Rev Cancer 2: 573-583

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG (2001) :
VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics.
Nat Med 7: 186-191

Stacker SA, Stenvers K, Caesar C, Vitali A, Domagala T, Nice E, Roufail S, Simpson RJ, Moritz R, Karpanen T, Alitalo K, Achen MG (1999) :
Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers.
Biol Chem 274: 32127-32136

Stein CA, Cheng Y-C (1993):
Antisense ofigonucleotides as therapeutic agents – is the buzlet really magical ?
Science 261: 1004-1012

Stephenson RA, Dinney CP, Gohji K, Ordonez NG, Killion JJ, Fidler IJ (1992):
Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice.
J Natl Cancer Inst 84: 951-957

Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K (2005):
The biology of vascular endothelial growth factors.
Cardiovasc Res 65: 550-563

Tammela T, Petrova TV, Alitalo K (2005):
Molecular lymphangiogenesis: new players.
Trends Cell Biol 15: 434-441

Tamura M, Ohta Y (2003):
Serum vascular endothelial growth factor-C level in patients with primary nonsmall cell lung carcinoma : a possible diagnostic tool for lymph node metastasis.
Cancer 98: 1217-1222

Tang RF, Itakura J, Aikawa T, Matsuda K, Fujii H, Korc M, Matsumoto Y (2001):
Overexpression of lymphangiogenic growth factor VEGF-C in human pancreatic cancer.
Pancreas 22: 285-292

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC,
Abraham JA (1991):
The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded
through alternative exon splicing.
J Biol Chem 266: 11947-11954

Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, Kanetake H, Saito Y, Alitalo K, Koji T (1999):
Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its
relationship to lymph node metastasis.
Br. J. Cancer 80: 309-313

Trzewik J, Mallipattu S, Artmann GM, Delano FA, Schmid-Schonbein GW (2001):
Evidence for a second valve system in lymphatics: endothelial microvalves.
FASEB 10: 1711-1717

Valtola R, Salven P, Heikkilä P, Taipale J, Joensuu H, Rehn M, Pihlajaniemi T, Weich H,
deWaal R, Alitalo K (1999):
VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer.
Am. J. Pathol. 154: 1381-1390

Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, Kubo H, Thurston G,
McDonald DM, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K (2001):
Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for
lymphangiogenesis in transgenic mice.
EMBO J 6: 1223-1231

Wang TB, Deng MH, Qiu WS, Dong WG (2007):
Association of serum vascular endothelial growth factor-C and lymphatic vessel density with
lymph node metastasis and prognosis of patients with gastric cancer.
World J Gastroenterol 13: 1794-1798

Wang TB, Huang YH, Lan P, Song XM, Wang JP (2005):

Correlation of lymphangiogenesis to progression of colorectal cancer.

Cancer 24: 1276-1279

Weiss B, Davidkova G, Zhou LW (1999):

Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes.

Cell Mol Life Sci 55: 334-358

Wey JS, Fan F, Gray MJ, Bauer TW, McCarty MF, Somcio R, Liu W, Evans DB, Wu Y, Hicklin DJ, Ellis LM (2005):

Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines.

Cancer 104: 427-438

Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD (2002):

An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype.

EMBO J 21: 1505-1513

Wilting J, Neeff H, Christ B (1999):

Embryonic lymphangiogenesis.

Cell Tissue Res 297: 1-11

Wilting J, Papoutsi M, Othman-Hassan K, Rodriguez-Niedenfuhr M, Prols F, Tomarev SI (2001):

Development of the avian lymphatic system.

Microsc Res Techn 55: 81-91

Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, Vitali A, Makinen T, Alitalo K, Stacker SA (1999):

Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 3071-3076

Wittekind C (2000):

Diagnosis and staging of lymph node metastasis.

Rec Res Cancer Res 157: 20-28

Witzenbichler B, Asahara T, Murohara T (1998):

Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia.

Am J Pathol 153: 381-394

Wong SY, Haack H, Crowley D, Barry M, Bronson RT, Hynes RO (2005):

Tumor-secreted vascular endothelial growth factor-c is necessary for postate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis.

Cancer Res 65: 9789-9798

Xu T, Chen D (2006)

Serum vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor level in patients with colorectal carcinoma and clinical significance.

J Sci Technolog Med Sci 26: 329-355

Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y (1997):

Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D.

Genomics 42: 483-488

Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S (2000):

Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors.

Nature 408: 92-96

Yanai Y, Furuhashi T, Kimura Y (2001):

Vascular endothelial growth factor C promotes human gastric carcinoma lymph node metastasis in mice.

J Exp Clin Cancer Res 20: 419-428

Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Fushida S, Ninomiya I, Bandou E, Taniguchi K, Miwa K, Ohoyama S, Sugiyama K, Sasaki T (1999):

Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer.

Clin Cancer Res 5: 1823-1829

Zachary I, Glick G (2001):

Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family.

Cardiovasc Res 49: 568-581

Zeng Y, Opeskin K, Baldwin ME (2004):

Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 by lymphatic endothelial cells is associated with lymph node metastasis in prostate cancer.

Clin Cancer Res 10: 5137-5144

Zhang WW (1995):

Antisense oncogene and tumor suppressor gene therapy of cancer.

J Mol Med 74: 191-204

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Stefanie Leschke
Geburtsdatum	08. Februar 1977
Geburtsort	Magdeburg
Familienstand	ledig
Eltern	Manfred und Hildegard Leschke geb.: Grabiger

Schulbildung

1983 – 1984	Grundschule in Magdeburg
1984 – 1985	Grundschule in Haldensleben
1985 – 1987	Grundschule in Ratingen
1987 – 1996	Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium in Ratingen
Mai 1996	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1996 – 2003	Studium der Humanmedizin an der HHU Düsseldorf
04.09.1998	Ärztliche Vorprüfung
31.08.1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08.04.2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
19.05.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

01.09.2003 – 01.10.2004	Ärztin im Praktikum in der Frauenklinik des Evangelischen Krankenhauses Oberhausen
Seit Oktober 2004	Assistenzärztin in der Facharztweiterbildung für Gynäkologie und Geburtshilfe in der Frauenklinik des Evangelischen Krankenhauses Oberhausen