

**Differentielle Genexpression in humanen arteriellen  
Endothelzellen nach Stimulation mit  
Vascular Endothelial Growth Factor**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

vorgelegt von:           Eva Schmaltz geb. Ludwig  
aus:                         Duisburg  
Erscheinungsjahr:       2009

Angefertigt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. T. Neuhaus
2. Gutachter: Professor Dr. med. N. Wernert

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.03.2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB  
Bonn unter [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch  
publiziert.

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Bonn  
Direktor Prof. Dr. H. Vetter

## Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1	Einleitung	8
1.1	Angioneogenese	8
1.1.1	Tumorangiogenese	10
1.2	Inhibitoren der Angiogenese	11
1.3	Angiogene Faktoren	13
1.3.1	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	15
1.4	Ziel der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Zellkultur	18
2.1.1	Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur	18
2.1.2	Gewinnung von humanen Endothelzellen und Anlegen einer Primärkultur	19
2.1.3	Morphologische Identifizierung von Endothelzellen	20
2.1.4	Passagierung und Kultivierung in Kulturflaschen	21
2.1.5	Herstellung einer Kinetik mit VEGF	22
2.1.6	Stimulation von Endothelzellen mit VEGF für die Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (SSH)	22
2.2	Isolation der total-RNA	23
2.3	Quantifizierung der RNA-Proben	24
2.4	Direkter RNA-Nachweis mit dem RNA-Gel	24
2.5	Isolation von m-RNA aus t-RNA	25
2.6	Prinzip der SSH	26
2.6.1	Herstellung einer Gen-Bank mittels SSH	27
2.6.2	Detektion der cDNA-Fragmente im Polyacrylamid-Gel	29
2.7	Klonierung der selektierten DNA-Fragmente	30
2.8	Materialien	33
3	Ergebnisse	37
3.1	Morphologische Charakterisierung der humanen arteriellen Endothelzellen (HUAEC)	37

3.2	Ergebnisse der SSH	38
4	Diskussion	45
4.1	Charakterisierung und Interpretation von Genen der Proliferation	46
4.2	Charakterisierung und Interpretation von Genen der Migration, der Plastizität sowie der Gefäßformation	49
4.3	Charakterisierung und Interpretation von Genen, die mit neurologischen Erkrankungen in Zusammenhang stehen	52
4.4	Charakterisierung und Interpretation weiterer Gene	54
4.5	Vor- und Nachteile einer SSH	55
5	Zusammenfassung	56
6	Übersichtstabelle der identifizierten Gene	59
	Literaturverzeichnis	64

## Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Actin, beta
AKAP2	A-kinase anchor protein 2
ANXA2	Annexin A2
ARHA	RAS homolog gene family, member A
ATP	Adenosintriphosphat
B4 GALT4	Beta-1,4-Galactosyltransferase 4
CAPZB	Capping protein, beta
CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine protease
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CRIM 1	Cysteine-rich motor neuron protein 1
CTP	Cytosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA JB1	DNAJ, E. coli, homolog of, subfamily B, member 1
DTT	Dithiothreitol
ECGF	Endothelial-cell growth factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
FGF	Fibroblasts growth factor
FKS	Fötales Kälberserum
FN1	Fibronectin 1
GBE1	Glycogen branching enzyme
GdGF	Glioblastom-derived growth factor
GTP	Guanosintriphosphat
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HSPD1	Heat-shock 60-KD protein 1
HUAEC	Humane umbilikale arterielle Endothelzellen
LASP1	LIM and SH3 protein 1
LRP1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
mA	Milli-Amper

min	Minute
MMLV	Moloney-Murine-Leukämie Virus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSN	Moesin
MYO 1C	Myosin
NME2	Nonmetastatic cells 2
NTF2	Nuclear transport factor 2
NTP	Nukleosidtriphosphat
PBS	Physiologischer Phosphatpuffer
PCDH-gamma	Protocadherin-gamma, subfamily A, member 1
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGF	Placental growth factor
PSMB 7	Proteasome subunit, beta-type, 7
PR dm4	PR domain-containing protein 4
RAB5B	RAS-associated protein RAB5B
RECK	Reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Reverse Transkriptase
SET	SET translocation, myeloid leukemia-associated
SHMT1	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic
SLC20A1	Solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
STMN1	Stathmin
TGFB1/1	Transforming growth factor, beta-1-induced 1
THBS1	Thrombospondin I
TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3
TTC3	Tetratricopeptide repeat domain 3
TTP	Thymidintriphosphat
U	Einheiten (units)

UBB	Ubiquitin B
UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1
V	Volt
VCL	Vinculin
VDAC	Voltage-dependent anion channel
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VPF	Vaskulärer Permeabilitätsfaktor
VPS29	Vacuolar protein sorting 29
W	Watt
YWAHZ	Tyrosine-3 Monooxygenase

## **1 Einleitung**

Bereits in ihren Anfängen beschäftigte sich die Tumorforschung mit der Frage der Nährstoffversorgung von Neoplasien. Eine der ersten Überlegungen war es, ob Tumore durch bereits vorhandene oder aber durch neu gebildete Blutgefäße eine ausreichende Nährstoffversorgung erhalten. Nachdem sich herausstellte, dass die Versorgung eines Tumors durch neugebildete Gefäße erfolgt, blieb die Frage zu beantworten, wodurch diese Angio(neo)genese in Gang gesetzt wird. Hierzu wurden verschiedene Thesen aufgestellt:

Vielfach wurde zunächst vermutet, dass die Angiogenese eine entzündliche Reaktion auf den Tumor sein könnte oder dass Tumore selber Gefäße bilden, welche aus Tumorzellen hervorgehen und bestehen. Die umgekehrte Vermutung, dass das Tumorstadium abhängig von der Gefäßaussprossung sei, wurde zunächst nur vereinzelt vertreten. Heute ist bekannt, dass das Wachstum solider Tumoren und die Entstehung neuer Metastasen von der Bildung neuer Gefäße abhängig sind. Eine Therapie, welche die Gefäßneubildung stoppt oder verlangsamt, ist daher ein wichtiger Baustein in der modernen Tumorbehandlung.

### **1.1 Angiogenese**

Die Neubildung von Gefäßen spielt eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Prozessen wie der Wundheilung, dem Menstruationszyklus, der embryonalen Entwicklung oder der Ausbildung von Kollateralkreisläufen in ischämischen Körperregionen (Myokard, Extremitäten). Sie ist aber auch die Grundlage vieler pathologischer Vorgänge und Erkrankungen z.B. bei der Rheumatoiden Arthritis, der diabetischen Retinopathie sowie der Tumorbildung.

Der Begriff „Angiogenese“ wurde zum ersten Mal 1935 geprägt zur Beschreibung der Gefäßneubildung in einer Plazenta. Er bezeichnet einen mehrstufigen Prozess zur Bildung neuer Blutgefäße (Folkmann, 1991) aus bereits vorhandenen Gefäßen. Hiervon abzugrenzen ist die Vaskulogenese in der Embryonalphase, bei der sich erste Gefäßplexus aus fusionierenden Blutinseln und Angioblasten bilden.

Die Angiogenese ist der erste Schritt für die Neovaskularisation eines Gewebes. Sie beginnt auf der Ebene der kapillaren Blutgefäße, die aus Endothelzellen, Perizyten und Matrixbestandteilen bestehen. Die beiden Zelltypen tragen die gesamte genetische Information, die für die Aussprossung erster Gefäßstübli aus einem bereits existierenden Gefäß (Bucher und Wartenberg, 1989) bis hin zu kapillaren Verzweigungen und Ausbildung ganzer Gefäßnetzwerke (Folkmann und Shing, 1992) notwendig ist.

Voraussetzung für die Angiogenese ist die Fähigkeit von Endothelzellen zur Proliferation, Migration sowie zur Invasion der Zellen in das umliegende Gewebe. Die Perizyten als weiterer wichtiger Bestandteil der Kapillarwand umfassen mit ihren Ausläufern das Blutgefäß und tragen unter physiologischen Bedingungen dazu bei, das Endothel in einem ruhenden, nicht proliferierenden Zustand zu halten (Antonelli-Orlidge et al., 1987).

Nach Kontakt mit einem angiogenen Stimulus beginnt der Prozess der Angiogenese mit der enzymatischen Auflösung der Basalmembran und der extrazellulären, die Kapillaren und Venolen umgebenden Matrix durch Kollagenasen und Proteinasen sowie speziellen Metalloproteinasen, welche von den Gefäßendothelzellen sezerniert werden (Folkmann, 1982). Es folgt die Migration und Invasion der Zellen durch die fragmentierte Basallamina in das perivaskuläre Bindegewebe. Nach Proliferation der Endothelzellen mit anschließender Lumen- und Anastomosenbildung kommt es nun zur Ausdifferenzierung eines funktionierenden Kapillarsystems. Ein regelrechter Blutfluß zur Versorgung von Tumorgewebe oder von anderem Gewebe wird dadurch ermöglicht (Folkmann, 1982; Bicknell und Harris, 1991; Bobik und Campbell, 1993).

### **1.1.1 Tumorangiogenese**

Das unbegrenzte, invasive Wachstum eines soliden Tumors in das umliegende Gewebe ist abhängig von seiner Fähigkeit zur Angiogenese. Ein Tumor, der diese Fähigkeit nicht besitzt, wird über Diffusion ernährt und kann sich dadurch nur wenige Kubikmillimeter weit ausbreiten (Folkman, 1972). Die Möglichkeit zur Angiogenese eines Tumors entsteht erst durch die Umwandlung einer ausreichenden Anzahl von Tumorzellen in einen angiogenen Phänotyp (Folkman, 1992). Auch die Fähigkeit der Metastasierung eines Primärtumors in entfernte Organe über den Blutweg ist erst möglich durch das Einsprossen von Kapillaren in den Tumor (Folkman und Shing, 1992). Bei Tumoren mit Zellen nicht angiogenen Phänotyps ist das Größenwachstum limitiert, und sie können so mehrere Jahre beim Menschen in ruhendem Zustand verbleiben.

Der Mechanismus der Tumorangiogenese unterscheidet sich nicht substantiell von der oben beschriebenen Gefäßneubildung. Essentiell ist der Wandel von Tumorzellen in einen angiogenen Phänotyp. Diese Umwandlung ist abhängig vom Gleichgewicht angiogener Stimulatoren zu angiogenen Inhibitoren. Es ist davon auszugehen, dass sowohl die Tumorzellen selbst, als auch normales Gewebe Einfluss auf dieses Gleichgewicht nehmen. Der Verlust der Suppressor-Gen-Aktivität scheint ebenfalls Einfluss auf die Umwandlung von Tumorzellen zu angiogenen Phänotypen zu haben. Zusätzlich trägt das Rekrutieren und Aktivieren von Makrophagen durch den Tumor über chemotaktische Moleküle zur Förderung der Tumorangiogenese bei (Steiner et al., 1992). Es wird vermutet, dass die in Tumorzentren entstehende Hypoxie mit anschließender Erhöhung des Laktatgehaltes im Gewebe sowohl die angiogene Aktivität des Tumors als auch die der Makrophagen erhöht. Diese Annahme wird unterstützt durch Experimente, in denen beispielsweise die Steigerung der Expression von VEGF auf mRNA-Ebene unter erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck gezeigt werden konnte (Shweiki et al., 1992; Brogi et

al., 1994; Iizuka et al., 1994). Co-Kulturen von Pericyten und Endothelzellen haben ergeben, dass beide Zellarten eine inaktive Form von TGF- $\beta$  bilden. Das TGF- $\beta$  wird bei Kontakt der Zellen miteinander aktiviert. Die aktive Form ihrerseits hemmt die Endothelzellproliferation. Kommt es zu einer Auflösung der Strukturen von Pericyten und Endothelzellen durch Tumorwachstum, wird dieser inhibierende Faktor somit aufgehoben, und die ruhenden Endothelzellen werden zur Proliferation und somit zur Angiogenese aktiviert.

Unter Berücksichtigung all dieser Mechanismen zur Umwandlung von Tumorzellen in einen angiogenen Phänotyp sind drei Hauptmechanismen der angiogenen Aktivierung erkennbar:

- 1) Aktivierung, die durch Tumorzellen selbst hervorgerufen wird,
- 2) Aktivierung durch Zellen, welche wiederum durch den Tumor aktiviert werden, und
- 3) Aktivierung, basierend auf dem Verlust der physiologischen Inhibition der Endothelzellproliferation.

## **1.2 Inhibitoren der Angiogenese**

Unter physiologischen Bedingungen ist die Angiogenese ein fein regulierter Prozess, der durch angiogene Stimulatoren und Inhibitoren kontrolliert wird. Der Wandel der Tumorzellen zum angiogenen Phänotyp basiert ebenfalls auf diesem Netzwerk. Die Produktion der Stimulatoren ist für diese Umwandlung zwar notwendig, reicht aber alleine nicht aus. Es muss gleichzeitig zu einer „down“-Regulation der Inhibitoren kommen.

Angiogeneseinhibition basiert im Wesentlichen auf drei Strategien:

- Hemmung der Freisetzung angiogener Moleküle;
- Neutralisierung bereits sezernierter Moleküle ;
- Modulation der Endothelzellantwort auf einen angiogenen Stimulus (Folkman und Ingber, 1992).

Einer der ersten Faktoren, für den gezeigt werden konnte, dass er unter normalen Umständen permanent vom Organismus gebildet und dessen Produktion erst unter Tumorwachstum supprimiert wird, war der Angiogeneseinhibitor Thrombospondin. Mit Einsetzen der Tumorangio-genese werden nur noch ca. 4 - 6% der ursprünglichen Menge des Thrombospondin gebildet (Rastinejad et al., 1989).

In Fibroblasten wird dieser Inhibitor kontrolliert durch das Suppressor-Gen p53. Bei Patienten mit dem Li-Fraumeni-Syndrom findet sich in den Fibroblasten nur ein Allel des Suppressor-Gens p53. Neigt ein solcher Patient zu Neoplasien und ist dieses Allel in irgendeiner Form mutiert oder verändert, kommt es zur Verminderung der Thrombospondinbildung und somit zur Aktivierung der Angiogenese (Dameron et al., 1994).

Zahlreiche weitere Substanzen mit antiangiogenen Eigenschaften wurden in den letzten Jahren beschrieben, konnten jedoch bis jetzt nicht therapeutisch genutzt werden. Die Kombination von Steroiden und Heparin beispielsweise führt zum Rückgang der Tumormasse und der Metastasierungsrate von Tumoren auf Allantoismembranen, ohne dass Steroide selbst zu einer Inhibition von Vaskularisationen führen (Folkman et al., 1983). Der zugrundeliegende Mechanismus der Interaktion der beiden Moleküle ist unklar; es finden sich aber Hinweise auf eine direkte Hemmung der Endothelzellproliferation in vitro (Sakamoto et al., 1986) und eine indirekte angiogene Wirkung durch Auflösung der kapillären Basalmembran (Ingber et al., 1986). Zu den antiangiogenen Substanzen zählen auch Protamin (Taylor und Folkman, 1982), dessen Bindung an Heparin vermutlich die Interaktion von bFGF an seine Membranrezeptoren beeinflusst (Bobik und Campbell, 1993), sowie der rekombinante humane Plättchenfaktor-4, der die Gefäßneubildung am ehesten durch eine Hemmung von Kollagenasen inhibiert.

Mit Interferon- $\alpha$  wurde erstmalig eine antiangiogene Substanz klinisch eingeführt. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Interferon- $\alpha$  zur

speziesspezifischen Hemmung der Tumorgefäßneubildung von humanen, in Mäusen implantierten Tumorzellen führte (Sidky und Borden, 1987). Heute hat Interferon- $\alpha$  Einzug in die Therapie von Erkrankungen gehalten, die mit pathologischer Gefäßneubildung einhergehen, wie zum Beispiel die Behandlung von Hämangiomen im Kindesalter (White et al., 1991).

Weitere, stark antiangiogene Moleküle sind das Angiostatin, ein Plasminogenfragment (O'Reilly et al., 1994) und das Endostatin (O'Reilly et al., 1997), ein c-terminales Fragment von Kollagen XVIII, das in Hämangiotheliomen gebildet wird. Angiostatin findet sich nur bei Anwesenheit eines Primärtumors und verschwindet ca. 5 Tage nach dessen Entfernung. Dass Angiostatin dennoch nicht zu einer Einschränkung des Wachstums des Primärtumors führt, hängt mit den Halbwertszeiten des Angiostatins und seines Gegenspielers, dem VEGF, zusammen. VEGF hat eine Halbwertszeit von ca. 3 Minuten, was dazu führt, dass es nur in unmittelbarer Nähe des Tumors wirkt. Es liegt hier in wesentlich höherer Konzentration als das Angiostatin vor. Angiostatin hingegen hat eine Halbwertszeit von 2-3 Tagen und kann frei zirkulieren und somit die Angiogenese entfernt liegender Metastasen hemmen und so ihr Wachstum verhindern (Folkmann, 1995). Dieser Mechanismus kann dazu führen, dass Metastasen des Tumors zunächst mikroskopisch klein bleiben und erst einige Tage nach der Entfernung des Primärtumors rasch an Größe zunehmen. Die systemische Gabe des Peptidfragments führte in Versuchen ebenfalls zur Hemmung des Metastasenwachstums (O'Reilly et al., 1994).

### **1.3 Angiogene Faktoren**

Angiogene Faktoren finden sich nicht nur in Tumoren, sondern auch in fast allen anderen körpereigenen Geweben. Die angiogenen Faktoren lassen sich nach funktionellen Aspekten in zwei große Gruppen unterteilen.

Zum einen die Gruppe der direkt wirksamen Faktoren mit direktem Einfluss auf die Endothelzellen und deren Stimulation, und zum anderen die Gruppe der Faktoren, welche nur indirekt, über zwischengeschaltete Zellen, Einfluss auf die Endothelzellen nehmen können. Die von den indirekten Faktoren aktivierten Zellen, beispielsweise Makrophagen, schütten ihrerseits dann wieder direkt wirksame angiogene Faktoren aus, die die Mitose, Sekretion von Kollagenasen und Proteasen, intrazelluläre Prozesse sowie Proliferation und Migration der Endothelzellen beeinflussen.

Seit den 80er Jahren, in denen die Heparin-Affinität einiger angiogener Faktoren entdeckt wurde, konnte eine ständig wachsende Anzahl von angiogenen Molekülen isoliert und teilweise auch sequenziert werden. Die wichtigste Gruppe der angiogenen Faktoren stellen Polypeptide dar. Es gibt aber auch eine Vielzahl niedermolekularer Substanzen, die in irgendeiner Weise Einfluss auf die Angiogenese nehmen. Hierzu zählen unter anderem Fettsäurederivate wie beispielsweise 1-Buterylglycerol, das von Adipozyten sezerniert wird (Dobson et al., 1991), Prostaglandin E1 und E2 (Ziche et al., 1982; Form und Auerbach, 1983), Adenosin sowie Derivate des Nikotinamids (Morris et al., 1989) und zahlreiche andere Moleküle. Bei den höhermolekularen angiogenen Faktoren handelt es sich um Wachstumsfaktoren, die in unterschiedlicher Weise Einfluss auf die Angiogenese nehmen.

Zu ihnen zählen zum einen Moleküle mit ausschließlicher, sehr potenter Stimulation der Angiogenese, jedoch ohne Wirkung auf die Endothelzellproliferation, wie zum Beispiel Angiogenin oder mitogenwirkende Peptide. Deren mitogener Effekt erstreckt sich auf ein vielfältiges Spektrum von Zielzellen mesodermalen Ursprungs, wie dies beispielsweise bei den Fibroblastenwachstumsfaktoren (bFGF, aFGF) (Bobik und Campbell, 1993; Burgess und Maciag, 1989), dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und dem Tumorstromawachstumsfaktor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) (Schreiber et al., 1986) der Fall ist, oder ihr mitogener Einfluss ist spezifisch für Endothelzellen. Neben dem aus Thrombozyten stammenden Endothelzellwachstumsfaktor (Ishikawa et al.,

1989) trifft letzteres insbesondere auf VEGF (Ferrara und Henzel, 1989; Gospodarowicz et al., 1989) zu.

### **1.3.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**

Bei VEGF handelt es sich um ein homodimeres, glycolysiertes Protein, welches drei intramolekulare und zwei intermolekulare Disulfidbrücken hat. Es wird von den meisten Tumoren sowohl gebildet als auch ausgeschüttet.

VEGF entfaltet seine Wirkung nahezu ausschließlich auf Gefäßendothel (Ferrara und Henzel, 1989), daneben zeigt es aber auch eine Affinität zu Monozyten, in denen Chemotaxis und Migration induziert werden (Clauss et al., 1990) und eine Affinität zu menschlichen Melanomzellen (Gitay-Goren et al., 1993). Es wirkt für die Gefäßendothelzellen stark mitogen und induziert deren Migration, fördert ihre Gestaltung zu schlauchartigen Formationen und erhöht die Permeabilität in Gefäßen. Durch diese Eigenschaften nimmt VEGF eine Schlüsselrolle in der Angiogenese und im Besonderen in der Tumorangiogenese ein.

Viele weitere Peptide, die in den letzten Jahren isoliert wurden und sich als mitogen für Endothelzellen erwiesen, (wie z. Bsp. FSdGF, der aus Hypophysenzellen isoliert wurde, VPF, der aus Tumorzellen stammt und die Gefäßpermeabilität erhöht und der aus Glioblastomzellen extrahierte Wachstumsfaktor GdGF), stimmen mit VEGF überein.

VEGF gehört neben bFGF zu den potentesten Stimulatoren der Angiogenese. In Experimenten mit kultivierten bovinen Endothelzellen zeigen beide Peptide einen ausgeprägten proliferativen Effekt. Die Kombination der beiden Peptide führt zu einem exponentiellen Anstieg der Endothelzellzahlen, womit ein synergistischer Effekt der beiden Einzelfaktoren postuliert werden kann (Goto et al., 1993). Der Nachweis der synergistischen Wirkung konnte in einem Tiermodell mit chirurgisch induzierten Extremitätenischämien bestätigt werden

(Asahara et al., 1995). Jedoch fanden sich auch relevante Unterschiede zwischen den beiden Peptiden.

In vitro Experimente zeigten beispielsweise, dass die Bildung von VEGF-mRNA in glatten Muskelzellen durch Hypoxie induziert werden kann, die Expression anderer Wachstumsfaktoren wie bFGF hingegen unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck stattfindet (Brogi et al., 1994). Weitere Versuche, bei denen genau differenziert wurde, welchen Einfluss VEGF und bFGF auf die Proliferation und die Migration von Gefäßendothelzellen haben, zeigen ebenfalls erhebliche Unterschiede. VEGF induziert im Vergleich zu bFGF eine um 200% gesteigerte Migrationsrate der Endothelzellen bei gleicher Konzentration. Hingegen zeigte bFGF bei den Versuchen eine wesentlich stärkere mitogene Wirkung (Yoshida et al., 1996).

Studien der frühen Angiogenese haben gezeigt, dass zunächst eine Migration der Endothelzellen Richtung Stimulus erfolgt und erst nachträglich die Mitose einsetzt (Yamagami, 1970; Ausprunk und Folkmann, 1977). Hinsichtlich der direkten Migration in Richtung Stimulus gibt es verschiedene Varianten. Zum Beispiel laufen Prozesse der Wundheilung und der Hämangiombildung eher diffus und ungerichtet in der lokalen Umgebung ab, im Gegensatz dazu findet man bei der Tumorbildung und dem fetalen Wachstum eine präzise, kontrollierte und zielgerichtete Migration der Kapillaren. Alle diese Punkte weisen auf die enorme Bedeutung von VEGF besonders in der Tumorangio-genese hin.

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Die Wachstumsmöglichkeit von Tumoren ist bedingt durch deren Fähigkeit zur Angiogenese. Einer der wichtigsten und bekanntesten Faktoren in diesem komplexen Prozess ist das VEGF. Die genauen Wirkmechanismen und möglichen Wechselwirkungen des VEGF sind größtenteils nicht bekannt. Ziel der Arbeit ist daher die Identifizierung differentiell exprimierte Gene mittels Suppressiver Subtraktiver Hybridisierung aus arteriellen Endothelzellen nach der Stimulation mit VEGF, um weitere, möglicherweise an der Tumorangiogenese beteiligte Faktoren entdecken zu können.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

Sämtliche Arbeiten an den Zellkulturen wurden unter den keimarmen Bedingungen einer Sterilbank durchgeführt.

Gezüchtet wurden die Zellen in Kulturgefäßen. Mit Hilfe eines Inkubators wurde die für das Überleben der Zellen notwendige Atmosphäre von 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung sicher gestellt.

#### **2.1.1 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur**

Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgte mit Medium 199. Dieses wurde steril bei 2-8 °C gelagert.

Für die Primärkulturen und die erste Passage war die Zugabe von 20%igem humanem Serum erforderlich, um für die Zellen die nötigen Wachstumsfaktoren bereitzustellen.

Für die weiteren Kultivierungsschritte wurde dem Medium 199 20%iges fötales Kälberserum (FKS) zugesetzt. Dieses wurde bei -20°C gelagert und direkt nach dem Auftauen, ebenfalls steril filtriert, beigefügt.

Beide Nährlösungen wurden prophylaktisch, um einer bakteriellen Kontamination vorzubeugen, mit 10 ml/l einer Antibiotikallösung aus 10.000 U/ml Penicillin/Streptomycin versetzt.

Die so hergestellten Nährmedien wurden bei 2-8°C gelagert und vor Gebrauch in einem Wasserbad langsam auf 37°C erwärmt.

Als Wachstumsfaktoren wurden Heparin und ECGF (Endothelial cell growth factor) (culture grade) eingesetzt. ECGF wurde in sterilem Aqua bidest. in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Die ECGF-Lösung wurde den Kulturen in einer Konzentration von 5 µl/ml zugegeben. Heparin wurde direkt aus sterilen Ampullen (Heparin-Natrium 2.500 I.E./ml) in einer Konzentration von 5 µl/ml zugesetzt.

Als Puffer bei verschiedenen Arbeits- und Waschvorgängen diente physiologischer Phosphatpuffer (PBS), welcher bei 2-8°C steril aufbewahrt wurde.

### **2.1.2 Gewinnung von humanen Endothelzellen und Anlegen einer Primärkultur**

In Anlehnung an die von Jaffe et al. (1973) bzw. Balconi et al. (1986) beschriebene Methode wurden die humanen arteriellen Endothelzellen gewonnen und kultiviert.

Nach der Geburt wurden 5-20 cm große Stücke einer Nabelschnur in sterile Gefäße gebracht. Diese Gefäße waren gefüllt mit ca. 50 ml  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS, welches mit einer Antibiotikallösung aus Penicillin/ Streptomycin versetzt war. Die Nabelschnüre wurden bei 10°C gelagert und innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet.

Zu Beginn der Präparation wurde die Nabelschnur in ca. 100 ml sterilem  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen, und beschädigte Stellen wurden entfernt. Anschließend erfolgte die Kanülierung einer der beiden Nabelschnurarterien mit einer Einmalkanüle (Durchmesser 0,8 mm). Die Kanüle wurde mit steriler Seide fixiert. Die Arterie wurde sorgfältig mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gespült, um verbliebene Blutreste aus den Gefäßen auszuwaschen. Anschließend erfolgte die Injektion einer Kollagenase/ Dispase-Lösung, so dass Reste des  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS entfernt wurden und die Arterie vollständig mit der Enzym-Lösung gefüllt war. Das freie Ende der Nabelschnur wurde mit Seide

ligiert. Die präparierte Nabelschnur wurde in einer flachen Glasschale, bedeckt mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS, für 20 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Enzymlösung löste die Endothelzellen von den Gefäßwänden ab, ohne diese jedoch zu schädigen. Mit ca. 10 ml  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS wurde die Kollagenase-/Dispase-Lösung samt der gewünschten Endothelzellen aus den Nabelschnurarterien gespült. Die so gewonnene Zellsuspension konnte in einem Kulturröhrchen aufgefangen und bei 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert werden. Der Überstand wurde entfernt und das gewonnene Pellet in 1 ml Medium 199, versetzt mit 20%igem Humanserum sowie Penicillin/Streptomycin gelöst. Die Zellkultur wurde auf ein kurz zuvor mit Fibronectin beschichtetes Kulturschälchen ( $8\text{ cm}^2$ ) aufgebracht. Nach einem Zeitablauf von etwa 4 Stunden konnte das Medium erstmals gewechselt werden, um von der Präparation verbliebene Verunreinigungen aus der Zellkultur zu entfernen. Zum Zeitpunkt des ersten Mediumwechsels war bereits eine Sedimentation der gewonnenen Endothelzellen erfolgt. Dem erneuerten Medium wurden erstmals die Wachstumsfaktoren,  $5\mu\text{l}$  ECGF und  $5\mu\text{l}$  Heparin zugegeben. Nach 24 Stunden wurde erneut ein Mediumwechsel vorgenommen.

Das Kulturmedium wurde unter Zugabe von ECGF und Heparin alle zwei Tage gewechselt, bis ein konfluentes Wachstum der Endothelzellen erreicht war.

### **2.1.3 Morphologische Identifizierung von Endothelzellen**

Die Identifizierung der Endothelzellen erfolgte nach rein morphologischen Kriterien mit Hilfe eines Licht- bzw. Phasenkontrastmikroskopes. Auf Grund des charakteristischen Wachstums der Endothelzellen in teils konfluierenden Inseln und des typischen „Pflastersteinmusters“ konnte eine problemlose Abgrenzung zu Fibroblasten oder Muskelzellen getroffen werden.

#### **2.1.4 Passagierung und Kultivierung in Kulturflaschen**

Nach etwa zwei bis sechs Tagen war ein ausreichend konfluentes Wachstum erreicht, so dass eine Subkultivierung der Zellen in Kulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Grundfläche erfolgen konnte. Hierzu wurden die Zellkulturen zunächst zweimal mit jeweils 1 ml Ca<sup>2</sup>/Mg<sup>2</sup>-freiem PBS gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung in einer Verdünnung von 1:7 für eine Minute im Inkubator bei 37°C bebrütet, um sie vom Boden des Kulturschälchens abzulösen. Das Trypsin wurde mit 1 ml Medium 199 (20% Humanserum) neutralisiert, um eine enzymatische Zerstörung der Zellen zu vermeiden. Die so gewonnene Zellsuspension wurde vorsichtig in ein Kulturröhrchen überführt und 5 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Zellsediment in 10 ml Medium 199 (20% Humanserum) resuspendiert und vorsichtig durchmischt. Die Zellpopulation wurde in eine mit Kollagen beschichtete Kulturflasche gebracht und die Wachstumsfaktoren, 30 µl ECGF und 50µl Heparin wurden zugegeben. Nach ca. zwei Tagen konnte der erste Mediumswechsel vorgenommen werden. Hierbei erfolgte eine Umstellung von Medium 199, versetzt mit 20%igem Humanserum, auf Medium 199, versetzt mit 20% fötalem Kälberserum (FKS); der Zusatz der Wachstumsfaktoren wurde nicht verändert. Bis zum Erreichen einer Zellkonfluenz, nach drei bis acht Tagen, wurde alle zwei Tage das Medium gewechselt.

Eine erneute Passagierung der Endothelzellen von einer auf drei, maximal vier Kulturflaschen erfolgte nach dem gleichen Schema wie oben bereits geschildert. Die Lösungsmengen, Lösungskonzentrationen sowie die Zeit wurden den größeren Grundflächen der Kulturflaschen angepasst. Es wurde zweimal mit 10 ml Ca<sup>2</sup>/Mg<sup>2</sup>-freiem PBS gespült und die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung in einer Verdünnung von 1:5 vom Boden gelöst. Die Inkubation erfolgte zwei bis drei Minuten bei 37°C. Gestoppt wurde die Reaktion mit 5 ml Medium 199 (20% FKS). Nach der Zentrifugation der Zellsuspension bei 1300 rpm für 5 Minuten wurden die gewonnenen Zellpellets

mit Medium 199 (20% FKS) resuspendiert. Die Menge des zur Resuspendierung verwendeten Medium 199 (20% FKS) wurde so gewählt, dass je 1 ml der gewonnenen Zellsuspension in eine neue Kulturflasche gegeben werden konnte. Anschließend wurden die Flaschen auf 10ml mit Medium 199 (20% FKS) aufgefüllt. Die Wachstumsfaktoren wurden wie oben beschrieben zugesetzt.

Maximal vier bis fünf solcher Passagen waren möglich.

### **2.1.5 Herstellung einer Kinetik mit VEGF**

Die humanen arteriellen Endothelzellen wurden, wie oben beschrieben, gewonnen und in Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) angezüchtet. Nach der dritten oder vierten Passage wurden sechs Flaschen einer Zelllinie, bei denen die Zellen eine ausreichende Konfluenz zeigten, zweimal mit PBS gespült und anschließend zur Gleichschaltung des Zellzyklus mit 5 ml Medium 199, ohne Zusatz von Serum oder wachstumstimulierenden Faktoren für vier Stunden inkubiert. Vier von den sechs Kulturflaschen wurden mit VEGF (vascular endothelial growth factor) in einer Konzentration von 50 ng/ml stimuliert. Die Inkubation erfolgte einmal für 30 Minuten, 60 Minuten, 120 Minuten und für 240 Minuten. Die beiden anderen Kulturen dienten als Kontrollen, ihnen wurde kein Wachstumsfaktor zugefügt. Die erste Kontrollkultur wurde sofort und die zweite nach 240 Minuten gestoppt.

### **2.1.6 Stimulation von Endothelzellen mit VEGF für die Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (SSH)**

Für die Stimulation der SSH wurden ausschließlich arterielle Endothelzellen verwendet. Hierfür wurden zwanzig Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>), meist nach vier oder mehr Passagen benötigt. Diese wurden wie unter 2.1.5 beschrieben zweimalig mit PBS gespült und anschließend mit 5 ml Medium 199, zur

Gleichschaltung des Zellzyklus, für vier Stunden inkubiert. Zehn der Kulturflaschen wurden mit 50 ng/ml VEGF stimuliert und anschließend wurden die stimulierten und die nicht-stimulierten Zellkulturen für weitere 4 Stunden inkubiert. Das „Stoppen“ der Stimulation erfolgte wie unten beschrieben.

## **2.2 Isolation der total-RNA**

Die mit VEGF stimulierten Zellen wurden nach 4 Stunden gestoppt. Hierfür wurde das Medium komplett aus den Flaschen entfernt. Um die Endothelzellen zu lysieren und gleichzeitig die RNA zu konservieren, wurde in jede Kulturflasche 1 ml TRI-Reagenz hinzugegeben und am Boden verteilt. Unter Zuhilfenahme eines Einmalplastikschabers konnten am Boden anhaftende Endothelzellen gelöst und anschließend abpipettiert werden. Die Suspension wird bei 20°C eingefroren.

Die eigentliche RNA-Isolierung erfolgte dann in mehreren Schritten auf Eis und mit RNase freien Pipetten bzw. Pipettenspitzen.

Die Proben wurden unter Lichtabschluss behutsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Lysate kurz gemischt, bis eine homogene Lösung entstanden war, und dann ca. 5 Minuten gewartet. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform zu jeder Probe wurden diese erneut gemischt und ca. 5 Minuten stehen gelassen. Nachdem die Suspensionen 15 Minuten bei 4°C mit 12.000 rpm zentrifugiert worden war, zeigte sich eine Auftrennung in drei Schichten. Unten setzte sich eine rötliche Mischung bestehend aus Protein, Phenol und Chloroform ab, darüber lagerte sich ein dünner weißlich schimmernder Streifen DNA an und obenauf war eine farblose wässrige Phase, welche die gewünschte RNA enthielt. Pro Probe konnten ca. 600 bis 800 µl RNA gewonnen werden. Entsprechend der abpipetierten Menge RNA wurde 2-Propanol hinzu gegeben und die Lösung erneut gemischt. Die Proben wurden bei -20°C über Nacht eingefroren. Nachdem die Proben am nächsten Tag aufgetaut waren, wurden sie 10 Minuten bei 4°C mit 12.000 rpm zentrifugiert. Es bildete sich am Boden ein kleines weißliches Pellet und darüber eine

farblose Flüssigkeit, welche behutsam abgesaugt wurde. Die Pellets wurden mit 1 ml 70%iges Ethanol (-20°C) gemischt und 10 Minuten bei 4°C mit 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt und die Proben für 20 Minuten getrocknet. In 20 µl Depc-H<sub>2</sub>O wurde die isolierte RNA vorsichtig resuspendiert. Abschließend erfolgte eine Erwärmung für 5 Minuten in einem Thermoblock bei 60 °C. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -70°C.

### **2.3 Quantifizierung der RNA-Proben**

Die sich anschließende RNA-Quantifizierung erfolgte in einem Spektrophotometer.

Zuerst wurde ein Leerwert ermittelt. Hierfür wurden 70 µl Aqua bidest. in eine Quarküvette pipettiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (A<sub>260</sub>) gemessen.

Zur Ermittlung des RNA-Gehaltes wurde zu den 70 µl Aqua bidest. je 1µl einer Probe gemischt und ebenfalls die Extinktion bei 260 nm gemessen. Aus den Extinktionswerten konnte die RNA-Konzentration in µg/µl berechnet werden.

Um Verunreinigungen auszuschließen wurden die Proben anschließend bei 280 nm gemessen. Bei einem Verhältnis von 1,7–2,0 von A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> konnte von einem hohen Reinheitsgrad der RNA ausgegangen werden.

Bei Abweichungen wurde eine erneute RNA – Isolierung vorgenommen, bis der oben beschriebene Reinheitsgrad erreicht war.

### **2.4 Direkter RNA-Nachweis mit dem RNA-Gel**

Um über die gewonnenen Proben nicht nur eine quantitative Aussage machen zu können, wurde nicht nur per Lichtabsorption der Gehalt an RNA gemessen, sondern auch per Elektrophorese die Qualität der Proben bestimmt.

Hierfür wurde zuerst ein Agarose-Gel gegossen. Dieses enthielt 1,2 g Gibco Agarose Pure (bei 4°C gelagert), 90 ml DEPC-H<sub>2</sub>O, 10 ml 10xHepes. Diese Bestandteile wurden unter Rühren erhitzt und nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 1,8 ml Formaldehyd 37% zugegeben.

Der Probenmix zur qualitativen Analyse des RNA-Gehaltes wurde zusammengesetzt aus verschiedenen Anteilen von 10xHepes, Formamid, Formaldehyd, Loading Buffer, Ethidiumbromid und DEPC-Wasser. Nachdem noch ca. 1µg RNA aus der jeweiligen Probe zugefügt wurde, konnte das Gemisch für 5 Minuten bei 65°C inkubiert werden. In einem Laufpuffer, bestehend aus 10xHepes und Aqua bidest., wurden die RNA-Fragmente 45 Minuten lang bei 170 V aufgetrennt. Unter Zuhilfenahme von UV-Licht konnten die Banden sichtbar gemacht und somit die Qualität der RNA beurteilt werden. Das Verhältnis der 18s zur 20s Bande wurde kontrolliert, wobei eine höhere Intensität der 20s Bande eine bessere Qualität der RNA anzeigte. Zur Dokumentation wurde ein Foto des Gels gemacht.

## **2.5 Isolation von m-RNA aus t-RNA**

Bei der direkt aus den Zellen gewonnenen RNA handelte es sich zunächst noch um total-RNA. Für die später geplante SSH wurde jedoch nur die messenger-RNA benötigt, so dass diese zunächst aus der total-RNA isoliert werden musste.

Die Isolation der m-RNA erfolgte mittels eines m-RNA Isolation Kit der Firma Miltenyi-Biotec. Das Prinzip dieser Methode der m-RNA Isolation beruht darauf, eisenkernhaltige Oligo (dT) MicroBeads an die poly A<sup>+</sup> - Enden der m-RNA zu binden und diese über eine Säule zu leiten, welche in einem Magnetfeld hängt. In dem Magnetfeld werden die eisenhaltigen Oligo (dT) MicroBeads samt der gebundenen m-RNA Moleküle zurückgehalten. Anschließend wird die m-RNA mit angewärmtem Puffer eluiert.

Zunächst wurde die totale RNA für ca. 3 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die RNA wurde mit einem Lysis/Binding Buffer gemischt, wobei ein Mischungsverhältnis von 1:1 zugrundegelegt wurde.

Zu je 100 µg total RNA wurden 25 µl Oligo (dT) MicroBeads hinzugefügt, bei größeren Mengen total RNA erhöhte sich entsprechend die Menge der zugefügten Oligo (dT) MicroBeads. Durch Mischen verbinden sich die Oligo (dT) MicroBeads mit den poly A+-Enden der m-RNA. Eine spezielle Inkubation war nicht erforderlich.

Bevor im Anschluß daran die Isolation der m-RNA aus der t-RNA erfolgen konnte, musste zunächst die Säule vorbereitet werden.

Hierzu wurde eine MACS Typ M Säule in das magnetische Feld eines MACS-Separators eingespannt und mit 250 µl Lysis/Binding Buffer gefüllt und gespült. Anschließend wurde die mit Oligo (dT) MicroBeads präparierten RNA-Probe über die Säule gegeben und erneut mit 250 µl Lysis/Binding Buffer und viermal mit je 250µl Wasch-Buffer gespült. Um die im Magnetfeld isolierte m-RNA auswaschen zu können, wurde auf 65°C erhitzter Elution Buffer zugefügt. Dieser löste die m-RNA von den MicroBeads.

## **2.6 Prinzip der SSH**

Die von Diatchenko et al. 1996 beschriebene Technik der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (SSH) erlaubt die Isolierung differenziell exprimierter Gene aus zwei mRNA-Populationen.

Hierfür wird die mRNA von nativen, humanen arteriellen Endothelzellen, diese Population wird als „Driver“ bezeichnet, von der mRNA von stimulierten (50 ng/ml VEGF) humanen Endothelzellen, diese Population wird als „Tester“ bezeichnet, subtrahiert.

### 2.6.1 Herstellung einer Gen-Bank mittels SSH

Die Subtraktionsreaktion erfolgte mit Hilfe des Kits CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (CLONTECH Laboratories, Inc., 1020 East Meadow circle, Palo, Alto, Ca 94303-4230, USA). Abgesehen von einigen hier aufgeführten Veränderungen wurde exakt nach den Angaben und Protokollen des Herstellers verfahren.

Zuerst wurden die beiden zu vergleichenden Populationen mRNA zu Einzelstrang cDNA synthetisiert. Hierfür wurden jeweils 2 µg der gewonnenen Poly A<sup>+</sup> RNA von der „Driver“- und der „Tester“-Population genommen und mit Hilfe eines speziellen Oligo dT Primers für 2 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde mit 1mM dNTPs und 200 U Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) Reverse Transkriptase in RT-Puffer bei 42°C für 90 Minuten durchgeführt. Sofort im Anschluss wurden die Proben bei 16°C für 2 Stunden in 100 mM KCl, 10 mM Ammoniumsulfat, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 mM β-NAD, 20 mM Tris-HCl, 1 mM dNTPs in 0,05 mg/ml BSA, 0,3 U/µl DNA Polymerase I, 0,01 U/µl RNase H und 0,06 U/µl Escherichia coli DNA-Ligase zur Herstellung der second strand cDNA inkubiert. Im Folgenden wurde die double strand cDNA mit 6 Units der T4 DNA Polymerase für 30 Minuten bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit EDTA/Glycogen gestoppt und die cDNA präzipitiert. Mit der gewonnenen cDNA erfolgte dann mit einem 4-Basen-schneidenden Enzym, Rsa I bei 37°C für 90 Minuten ein Restriktionsverdau, wodurch sich kleinere Oligonukleotide mit freien, stumpfen Enden ergaben, an die sich ein Adapter binden konnte.

Die „Tester“-cDNA wurde in zwei Subpopulationen aufgeteilt und jede wurde mit einem speziellen Adapter ligiert, welcher keine Phosphatgruppe aufweist, so dass sich nur ein Adapter an jedes 5'-Ende binden konnte. Eine Hälfte wurde jeweils mit 2 µM Adapter-1 und die andere Hälfte mit 2 µM Adapter-2 in einer Ligationsmischung (50 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 5% Polyethylen Glycol und 0,5 U T4 DNA-Ligase) bei 16°C über Nacht

inkubiert. Die Reaktion wurde mit EDTA/Glycogen gestoppt und die Ligase durch Erhitzen auf 72°C für 5 Minuten inaktiviert. Die beiden verschiedenen Adaptoren hatten Anteile gleicher Sequenzen, so dass zu einem späteren Zeitpunkt das Anlagern des PCR-Primers möglich war.

Die eigentliche Subtraktionsreaktion setzt sich aus zwei aufeinanderfolgenden Hybridisierungen und aus zwei anschließenden PCR-Reaktionen zusammen. Bei der ersten Hybridisierungsreaktion wurde jeder der beiden „Tester-Populationen“ ein Überschuss an „Driver-cDNA“ zugegeben. Durch Erhitzen für 1,5 Minuten bei 98°C wurden die Proben zunächst denaturiert, beim späteren Abkühlen hybridisierten gleiche Einzelstrangfragmente miteinander. Da der „Driver“ im Überschuss vorlag, fängt er gleich exprimierte DNA-Fragmente des „Testers“ heraus. Die erste Hybridisierung wurde in einem Hybridisierungspuffer bei 68°C für 8 Stunden durchgeführt. In der zweiten Hybridisierungsreaktion wurden die beiden zuvor hybridisierten Proben gemischt und erneut mit einem Driverüberschuss bei 68°C über Nacht inkubiert.

Die PCR-Reaktionen dienten der selektiven Gewinnung der differentiell exprimierten Gene. In der ersten PCR wurden Primer verwendet, die, wie oben beschrieben, den Sequenzen der Adaptoren angepasst waren. Dadurch wurden die differentiell exprimierten Gene selektiv amplifiziert. Hierfür wurden 1 µl der subtrahierten cDNA mit 25 µl Lösung gemischt, die 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 400 nM jeden Primers, 0,2 mM dNTPs und 0,5 der advantage Taq-Polymerase der Firma Clontech enthielt. Nach einer Denaturierung bei 75°C für 7 Minuten durchlief die PCR 30 mal folgende Zyklen :

1. Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden
2. Hybridisierung der Primer auf der cDNA bei 68°C für 30 Sekunden
3. DNA-Synthese mit Hilfe der Primer und der Taq-Polymerase bei 72°C für 1,5 Minuten

Danach wurde 1 µl des PCR Produkts für die zweite PCR mitbenutzt und unter den identischen Bedingungen durchgeführt. Bei der zweiten PCR wurden in einer Konzentration von 400 nM der nested Primer 1 sowie der nested Primer 2R verwendet. Diese Primer erkennen die weiter innen, also an den Nahtstellen zwischen Tester-DNA und Adapter gelegenen Sequenzen auf dem Adapter.

### **2.6.2 Detektion der cDNA-Fragmente im Polyacrylamid-Gel**

Die Detektion der cDNA-Fragmente erfolgte mittels Gelelektrophorese. Hierzu wurde in einem Polyacrylamidgel (CleanGel Long- 10, ETC) die amplifizierte PCR-DNA nach Größe aufgetrennt. Zunächst wurde das Polyacrylamidgel für 90 Minuten in 50 ml Rehydrationsbuffer gequollen und anschließend die Geloberfläche sorgfältig abgetrocknet. Die amplifizierte DNA wurde in drei Bahnen aufgetragen und zunächst im elektrischen Feld bei 150 V, 15 mA und 5 W in 15°C kaltem DNA LongRun Buffer (ETC) für 30 Minuten aufgetrennt. Dann erfolgte eine weitere Auftrennung für 10 Minuten bei 400 V, 31 mA, 12 W und für 45 Minuten bei 500 V, 25 mA und 12 W. Abschließend wurden alle Parameter für weitere 2 Stunden und 20 Minuten auf 800 V, 28 mA und 13 W erhöht. Das Gel wurde anschließend in der Mitte der 2. Bahn durchgeschnitten und eine Gelhälfte mit Hilfe einer Versilberung angefärbt.

Die Versilberung des Gels erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurde das Gel fixiert. Hierzu wurde es für 45 Minuten in eine Lösung aus 75 ml 100% Ethanol (15% Endkonzentration), 25 ml Eisessig (5% Endkonzentration) und 400 ml H<sub>2</sub>O, mit der Gelseite nach oben, gelegt. Nach gründlichem Waschen mit Aqua bidest. (3x10 Minuten) folgte die eigentliche Versilberung. Das Gel wurde erneut für 45 Minuten in eine Lösung gelegt, diesmal mit der Gelseite nach unten. Die Silberlösung bestand aus 200 ml 0.1% AgNO<sub>3</sub> und 200 µl 37% Formaldehyd. Die Geloberfläche wurde anschließend sorgfältig mit Aqua bidest. abgespritzt. In einem Bad aus 200 ml 2.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 200 µl

Formaldehyd und 200 µl 2%igen Natriumthiosulfat wurde die Silberfärbung für 5 Minuten entwickelt. Gestoppt wurde dieser Vorgang mit 250 ml 2% Glycin/EDTA 0.5%. Das Gel wurde hierfür 20 Minuten in der Lösung belassen. Nach einer Imprägnierung mit 5% Glycerinlösung konnte das Gel nach 20 Minuten luftgetrocknet werden.

Die gefärbte und die ungefärbte Hälfte des Gels wurden entsprechend ihrer ursprünglichen Lage wieder zusammengelegt. Anschließend konnten Stücke aus dem ungefärbten Gel, die den sichtbaren Banden auf dem gefärbten Gel entsprachen, ausgeschnitten werden. Diese ausgeschnittenen Banden wurden als DNA-Vorlage für eine weitere PCR verwendet, welche mit den nested Primern durchgeführt wurde. Die Bedingungen entsprachen hierbei denen der SSH.

## **2.7 Klonierung der selektierten DNA-Fragmente**

Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des TOPO-TA cloning Kits (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Das Klonieren diente einer Vervielfältigung der gewünschten DNA-Fragmente mit Hilfe von kompetenten E. coli Zellen.

Zuerst wurde die Topo-Cloning Reaktion durchgeführt. Hierfür wurde das gewonnene PCR-Produkt (2 µl) mit der im TOPO-TA cloning Kit enthaltenen Salt solution (1 µl), sterilem Wasser (2µl) und dem TOPO Vektor (1µl) vorsichtig vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In manchen Fällen war eine Abwandlung der Mengen nötig, da nicht alle PCR-Produkte die exakt gleiche Menge RNA in einem Mikroliter enthielten.

2µl dieser so hergestellten TOPO-Cloning Reaktion wurden den kompetenten Zellen (E. coli) beigefügt. Hierbei durfte nur durch vorsichtiges Rühren gemischt werden, da ein Auf- und Abpipetieren die empfindlichen Zellen zerstört hätte. Nach einer 15 minütigen Inkubationszeit auf Eis und kurzem Anwärmen (ca. 30 sec.) im Wasserbad (42°) wurden 250µl SOC-Medium hinzugegeben. Bevor die so präparierten E. coli Zellen auf vorgewärmten Agar-Platten ausgestrichen wurden, erfolgte eine Durchmischung der

kompetenten Zellen mit dem SOC-Medium, in dem es bei 37°C horizontal mit 200 rpm geschüttelt wurde. Die fertig präparierten Agar-Platten wurden bei 37° über Nacht inkubiert. Die 15 cm durchmessenden Schalen enthielten neben LB-Agar das Selektionsantibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) sowie 100 µM IPTG und X-Gal (50 µg/ml) zur Blau-/Weißsortierung.

Gut sichtbare Kolonien wurden unter Blau-/Weißselektion gepickt und in sterile 96-well-Mikrotiterplatten übertragen. Jedes einzelne Well war mit 200 µl LB-Medium und Ampicillin (100 µg/ml) beladen. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend für 4 Stunden (150 rpm) bei Raumtemperatur geschüttelt. 5µl der so erzeugten Bakteriensuspension eines jeden Klonen wurden mit 15 µl Wasser verdünnt und für 10 Minuten bei 100° erhitzt und lysiert.

Um die Bakteriensuspensionen für einen weiteren Gebrauch zu erhalten, wurden jedem Well der Mikrotiterplatte 20 µl DMSO beigesetzt und gemischt. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten mit Parafilm gut verschlossen und bei -70° gelagert.

5 µl jeder Reaktion konnten später für eine PCR verwendet werden. Die PCR wurde mit 10 µM vektorspezifischen Primern (5'-primer: 5'- GCT ATT ACG CCA GCT GGC GAA AGG GGG ATG TG -3', 3'-primer: 5'- CCC CAG GCT TTA CAC TTT ATG CTT CCG GCA CG -3') durchgeführt. Diese Primer entsprechen den Sequenzen, die die Cloning-Site des Vektors begrenzen. Die 5 µl der gekochten Bakteriensuspension wurden einem Ansatz aus 5 µl 10x PCR-Puffer, 1 µl je dNTP, 28,5 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl DMSO, je 1µl M13 Forward und Reverse Primer und 0.5 µl TAQ-Polymerase zugefügt und durchliefen nach einer einmaligen Denaturierung bei 94°C für 7 Minuten folgende Temperaturzyklen 30 mal:

1. Denaturierung bei 94°C für 1 Minute
2. Hybridisierung bei 60°C für 1 Minute
3. DNA-Synthese bei 72°C für 1 Minute

Abschließend erfolgte ein weiterer Syntheseschritt bei 72°C für 10 Minuten. Eine Probe jedes PCR-Produkts wurde zur weiteren Analyse auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. So konnte die Größe des klonierten Fragments kontrollieren werden.

Die Sequenzierung der DNA wurde von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Es wurden nur Proben mit einer Fragmentgröße von etwa 800 bis 1000 bp Länge eingeschickt. Die so gefundenen Gene wurden mit Hilfe des BLAST-Programms ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) analysiert und kontrolliert, ob es sich bei den Sequenzen um bereits bekannte Sequenzen handelt (Altschul et al., 1997).

## 2.8 Materialien

### Zellkultur

Medium 199	Life Tech
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma
Penicillin (10.000 I. U. / ml)	Gibco-BRL
Streptomycin (10.000 U. G. /ml)	Gibco-BRL
Trypsin	Life Tech
Dispase II (0,5 U/mg)	Boehringer
Kollagenase Typ I (260 U/mg)	Sigma
Heparin (2.500 I.E. Heparin-Natrium/ml)	Roche
ECGF	Boehringer
Fibronectin	Gibco-BRL
Kollagen	Sigma
Seide (Nabelschnurgarn)	Decnatel
Einmalkanüle (Durchmesser 0,8 mm)	
	Braun-Melsungen
Zentrifugenröhrchen (10 ml / 50 ml)	Sarstedt
Kulturgefäße (8 cm <sup>2</sup> / 75 cm <sup>2</sup> )	Falcon
Membranfilter (Porengröße 0,2.µm)	Millipore
Scraper	Sarstedt
DEPC Wasser	Roche
Sämtliche Primer	MWG-Biotech
MMLV reverse Transkriptase	Gibco-BRL
Taq-Polymeras	Perkin-Elmer
Random Primer	Perkin-Elmer
dATP, dCTP, dTTP, dGTP	Perkin-Elmer
VEGF	Boehringer
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt

EppendorfgefäÙe

TRI-Reagenz

Agarose

PBS

Greiner

Sigma

Serva

Life Tech

## Lösungen und Puffer

10 x Hepes-Puffer:	Hepes (0,2 M) Trinatriumacetat (50 M) EDTA (10 M)
RT-Puffer:	Tris-HCl (50 mM/pH 8,3) KCl (75 mM) MgCl <sub>2</sub> (3 mM)
PCR-Puffer:	Tris-HCl (10 mM/ pH 8,3) KCl (50 mM) MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM) Gelatine (0,001%)
Gel-loading-buffer:	Bromphenolblau (0,25%) Xylencyanol (0,25%) Glycerin (25%)
LB-Medium:	Tryptone (1%) Yeast Extract (0,5%) NaCl (1%) (mit NaOH auf pH 7 einstellen)
Elution-Buffer:	Tris-HCl (10 mM / pH 7,5) EDTA (1 mM)

## Geräte

Sterilbank	Gelair ICN Biomedicals, TC 60
Ikubato	Labotect Forma Scientific, 3035
Lichtmikroskop	Zeiss
Phasenkontrastmikroskop	Nikon
Zentrifuge für Zellkultur	Heraeus Megafuge
Zentrifuge	Kontron Hermle ZK364
Ultrazentrifuge	Kontron TGA 50
Thermo-Cycler	Perkin-Elmer, Modell 480
Elektrophoresekammer	Bio-Rad
Kamera	MP 4-Polaroidkamera
Spektrophotometer	Shimadzu UV160

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Morphologische Charakterisierung der humanen arteriellen Endothelzellen (HUAEC)**

Die aus den Nabelschnüren gewonnenen Endothelzellen wurden während der Kultivierung mehrfach mikroskopisch beurteilt. Unmittelbar nach der Gewinnung der Zellen aus der Nabelschnurarterie stellten sich diese im Lichtmikroskop kugelförmig, teils einzeln oder in Zellnestern zusammengelagert dar. Die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt bereits zu Boden sedimentiert, hafteten diesem aber noch nicht an. Bevor zum ersten Mal das Medium nach ca. 4 Stunden gewechselt wurde, waren die Zellen fest am Boden angehaftet und bildeten uncharakteristische Zellverbände. Am folgenden Tag fanden sich dann bereits typische Endothelzellverbände aus tropfenförmigen Zellen ohne deutlich sichtbare Zellgrenzen mit polygonalen, ovalen Zellkernen. Die Endothelzellen formierten sich einschichtig ohne Zellgrenzenüberlappungen. In den folgenden vier bis fünf Tagen kam es in den meisten Fällen zu einer Vermehrung der Endothelzellen in den Nestern und zur Ausbildung eines konfluierenden „Monolayers“ mit charakteristischem „Pflasterstein muster“ (Gimbrone et al., 1974; Cotta-Pereira et al., 1980).

In den folgenden Passagen wiederholte sich dieser Ablauf ohne größere Änderungen in der Morphologie der Zellen oder der Wachstumsgeschwindigkeit.

Bei der Nabelschnurpräparation konnte es durch die enzymatische Ablösung der Endothelzellen zu Kontaminationen der Zellkulturen durch Fibroblasten oder auch glatte Muskelzellen kommen. Lichtmikroskopisch waren speziell die Fibroblasten leicht von den Endothelzellen zu differenzieren. Sie zeigten eine eher spindelförmige Morphologie mit deutlichen Zellgrenzen und wirbelförmiger

Anordnung der Zellen. Da die Fibroblasten eine schnellere Teilungsrate haben, konnte es durch eine Kontamination zu einer Überwucherung der Endothelzellen kommen. In solchen Fällen mußten die Zellkulturen verworfen werden. In manchen Fällen war es aber durch frühe Trypsinierung und kurze Kontaktzeit mit der Trypsinlösung möglich, die verschiedenen Zellarten voneinander zu trennen und so eine Zellkultur zu retten. Dies basierte auf dem Umstand, dass Fibroblasten sich beim Trypsinieren später vom Boden der Kulturschalen lösen als die HUAEC.

### **3.2 Ergebnisse der SSH**

Die durchgeführte Subtraktionsreaktion diente der Isolierung und Identifizierung differentiell exprimierter Gene aus humanen arteriellen Endothelzellen nach Stimulation mit dem angiogenen Wachstumsfaktor VEGF. Die aus den stimulierten Zellen gewonnene mRNA wurde als „Tester“ und die mRNA der nativen, humanen arteriellen Endothelzellen als „Driver“ verwendet. Gemeinsam in „Driver“ und „Tester“ exprimierte Sequenzen konnten mit der Methode der Subtraktion eliminiert, hingegen differentiell exprimierte Gene amplifiziert und im Folgenden identifiziert werden. Zunächst wurde hierfür die gewonnene mRNA mit der Reverse-Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe des Enzyms Rsa I konnte die cDNA in kleinere Fragmente mit stumpfen Enden geteilt werden, an welche sich im Anschluss ein Adapter binden konnte. Die verdauten „Tester“-cDNA wurde in zwei Ansätze mit jeweils einem Adapter (Adapter 1 und 2) ligiert und mit einem Überschuss an „Driver“-cDNA hybridisiert. Der ersten Hybridisierung folgte ein zweiter Hybridisierungsschritt, in dem die zwei Ansätze miteinander gemischt wurden. Im Anschluss wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt, die der selektiven Gewinnung differentiell exprimierter Gene dienten. In der ersten PCR wurden Primer verwendet, die den Sequenzen der Adaptern angepasst waren. Dadurch wurden die differentiell exprimierten Gene selektiv amplifiziert. Das erste PCR-Produkt wurde für eine zweite PCR mit den nested Primern benutzt.

Die so entstandenen subtrahierten und amplifizierten cDNA-Fragmente wurden in einem Acrylamidgel aufgetrennt und durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht. Die sichtbaren Banden konnten ausgeschnitten und erneut in einer PCR-Reaktion reamplifiziert werden. Mit diesem Schritt konnten diskrete Banden aufgeschlüsselt und dargestellt werden.

In Abbildung 1 ist das durchgeschnittene Acrylamid-Gel mit den einzelnen, aufgetrennten Banden beider PCR-Reaktionen der SSH, welche teilweise für die Reamplifizierung ausgeschnitten wurden, dargestellt.

Abbildung 2 zeigt das Ergebnis einer mit diesen Produkten durchgeführten Reamplifizierung. Bedingt durch Längenunterschiede der cDNA-Fragmente der einzelnen differentiell exprimierten Gene sind die Banden deutlich aufgetrennt.

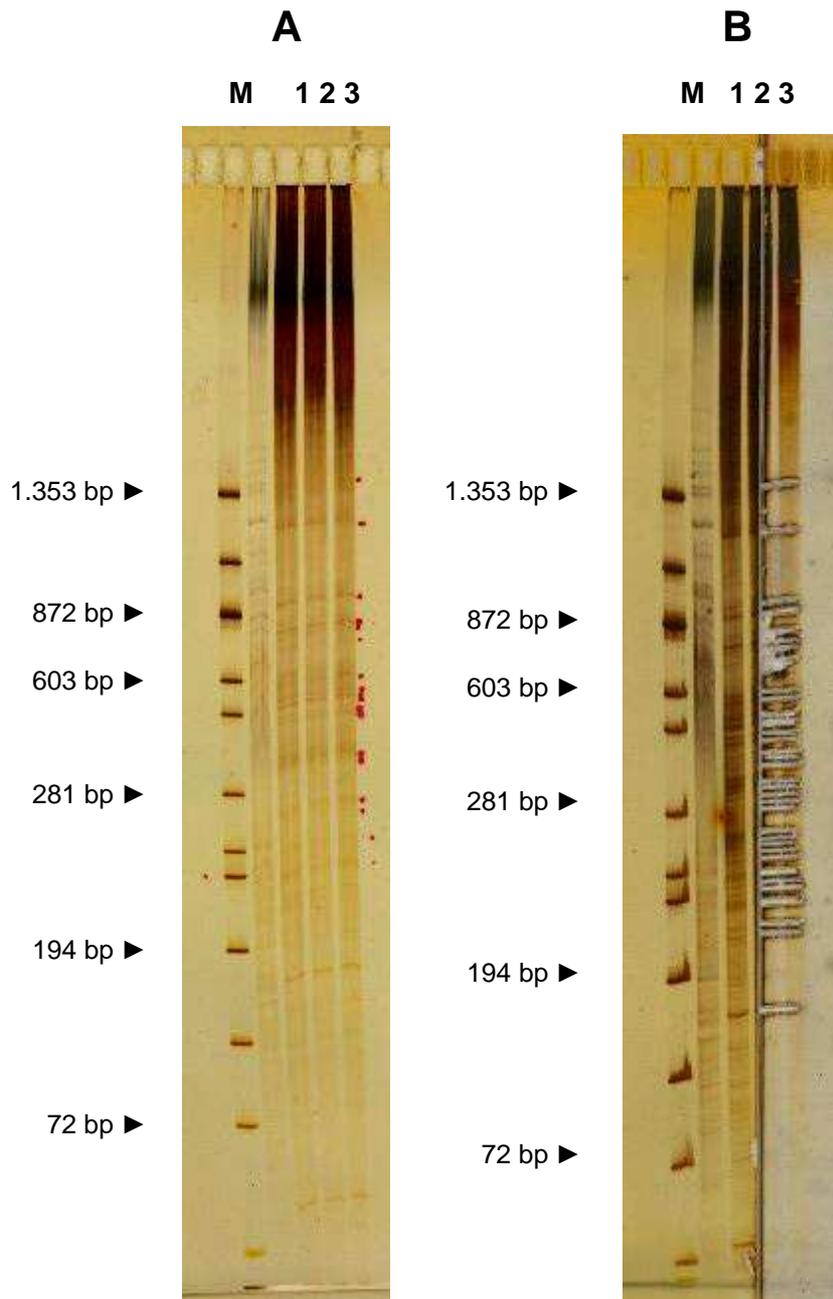
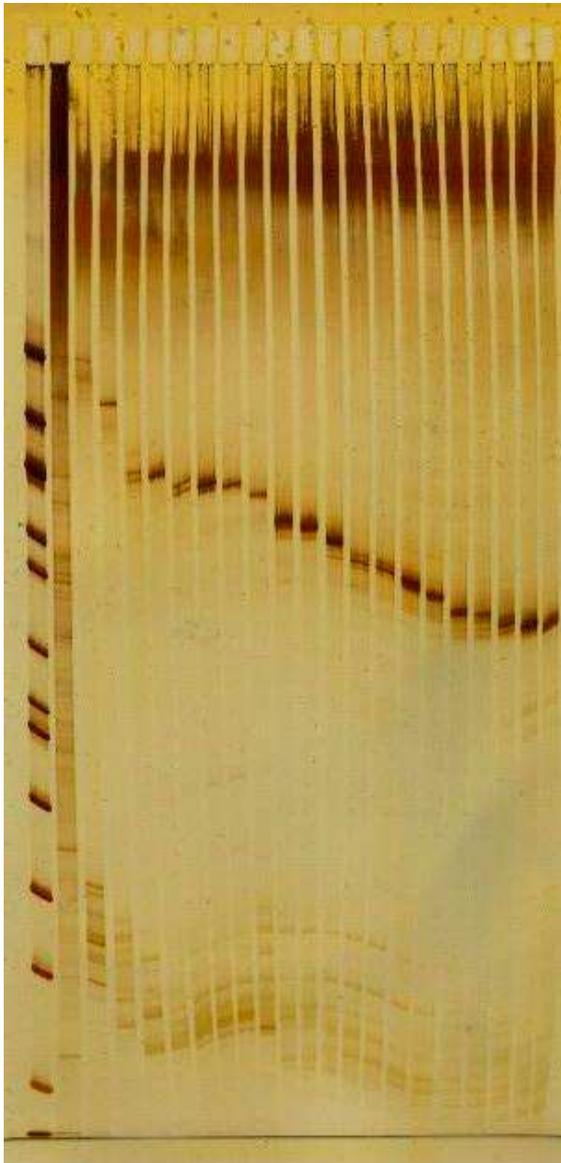


Abb. 1: **A:** Auftrennung der mittels Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung gewonnene PCR-DNA nach ihrer Fragmentgröße.  
**B:** Aus dem ungefärbten Gel (rechts) konnten Stücke, die den 36 sichtbaren Banden auf dem gefärbten Gel (links) entsprechen ausgeschnitten werden. Die ausgeschnittenen Stücke enthielten die DNA-Vorlage für die darauf folgende PCR mit den nested Primern.  
M : Hae-III digest  $\Phi$  X-174  
1-2-3: In drei Bahnen aufgetragene und nach Gelelektrophorese aufgetrennte DNA.

2.PCR

M V

Bande 1 - 20



2.PCR

M V

Bande 21 - 36

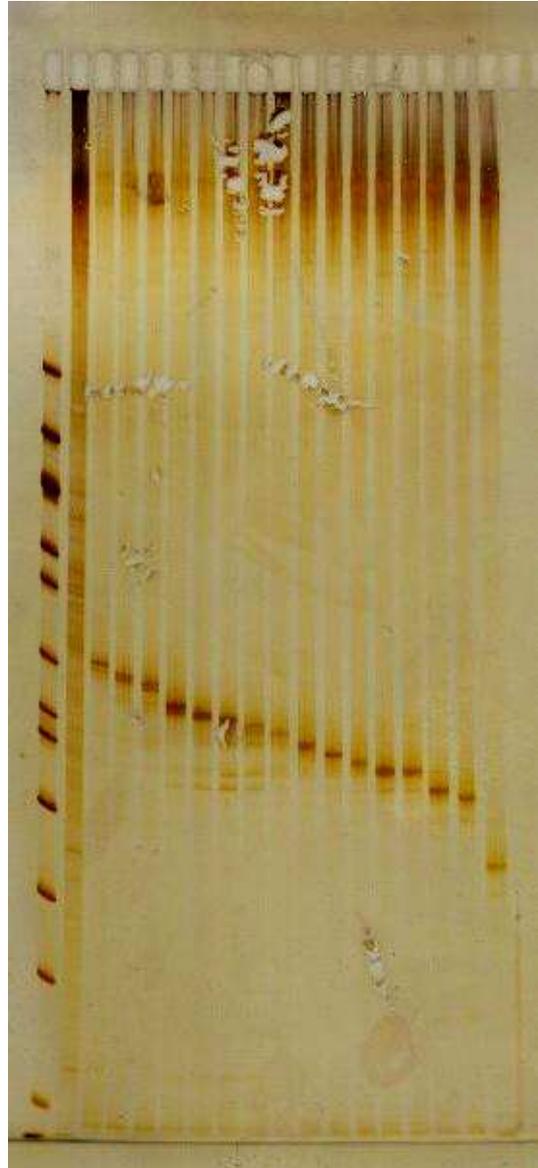


Abb. 2: Aufgetrennte cDNA-Fragmente der differentiell exprimierten Gene nach Durchführung der PCR mittels nested Primern

M : Hae-III digest  $\Phi$  X-174 (siehe Abb. 1)

V : nach Fragmentgröße aufgetrennte DNA aus der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung gewonnen

Bande 1 – 36: PCR-Produkt der ursprünglich aus dem Polyacrylamid-Gel ausgeschnittenen 36 DNA-Fragmente

Die Klonierung der reamplifizierten Gene diente zum einen der Vervielfältigung der gewünschten DNA-Fragmente zum anderen der Kennung der Fragmente mit einem Vektor. Mittels eines vektorspezifischen M13 Primers wurden die Genfragmente erneut amplifiziert und anschließend durch die Firma MWG sequenziert.

Die abschließende Identifizierung wurde mit Hilfe des BLAST-Programms durchgeführt.

Mit der Methode der SSH konnten insgesamt 70 Gene kloniert werden, von denen 56 zu identifizieren (s. unten) waren. Die übrigen 14 Gene stellten sich als unbekannte Klone des Homo sapiens heraus, denen keine spezielle Funktion zugeordnet werden konnte. Zwei dieser 14 Gene konnten auf einem Chromosom lokalisiert werden, und sechs wiesen eine komplette mRNA auf.

## **Alphabetische Auflistung der identifizierten Gene**

Annexin A2 (ANXA2)  
Actin, beta (ACTB)  
A-kinase anchor protein 2 (AKAP2)  
RAS homolog gene family, member A (ARHA)  
Beta-1,4-Galactosyltransferase 4 (B4 GALT4)  
Capping protein, beta (CAPZB)  
Caspase 9, apoptosis-related cysteine protease (CASP9)  
Cysteine-rich motor neuron protein 1 (CRIM 1)  
DNAJ, E. coli, homolog of, subfamily B, member 1 (DNA JB1)  
Fibronectin 1 (FN1)  
Glycogen branching enzyme (GBE1)  
Heat-shock 60-KD protein 1 (HSPD1)  
LIM and SH3 protein 1 (LASP1)  
Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)  
Moesin (MSN)  
Myosin (MYO 1C)  
Nonmetastatic cells 2 (NME2)  
Nuclear transport factor 2 (NTF2)  
Protocadherin-gamma, subfamily A, member 1 (PCDH-gamma)  
Placental growth factor (PGF)  
Proteasome subunit, beta-type, 7 (PSMB 7)  
PR domain-containing protein 4 (PR dm4)  
RAS-associated protein RAB5B (RAB5B)  
Reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK)  
SET translocation, myeloid leukemia-associated (SET)  
Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic (SHMT1)  
Solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1 (SLC20A1)  
Stathmin (STMN1)  
Transforming growth factor, beta-1-induced 1 (TGFB1/1)  
Thrombospondin I (THBS1)

Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3)

Tetratricopeptide repeat domain 3 (TTC3)

Ubiquitin B (UBB)

Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (UCHL1)

Vinculin (VCL)

Voltage-dependent anion channel (VDAC)

Vacuolar protein sorting 29 (VPS29)

Tyrosine-3 Monooxygenase (YWAHZ)

## **4            Diskussion**

Am Anfang der Arbeit stand die Überlegung, dass die Angiogenese einen wesentlichen pathophysiologischen Schritt im Verlauf einer Tumorerkrankung darstellt. Erst das Einsprossen von Blutgefäßen in einen malignen Tumor eröffnet diesem die Möglichkeit der hämatogenen Metastasierung sowie die Fähigkeit des Wachstums über eine Größe von wenigen Kubikmillimetern hinaus.

Neben vielen weiteren Mitogenen wie bFGF und PDGF spielt vor allem VEGF eine Schlüsselrolle in der Tumorangio-genese. Seine hohe Spezifität gerade für Endothelzellen macht es interessant für einen möglichen Ansatzpunkt in der onkologischen Therapie. Ziel dieser Arbeit ist es, Gene zu finden, deren Expression in humanen arteriellen Endothelzellen durch Stimulation mit VEGF deutlich erhöht wird, um das Verständnis für Prozesse, die mit der Tumorangio-genese in Zusammenhang stehen, zu vertiefen. Mit Hilfe einer Suppression Subtractive Hybridization (SSH) war es möglich, solche differentiell exprimierten Gene zu identifizieren und im Anschluss daran zu charakterisieren und in Kontext mit VEGF sowie der Angiogenese zu setzen.

Es wurden 70 Gene kloniert, für die eine differentielle Genexpression in humanen arteriellen Endothelzelle unter Stimulation mit VEGF nachgewiesen werden konnte.

56 der detektierten Gene konnten genauer identifiziert werden. Sie stehen im Zusammenhang mit Prozessen der Angiogenese, der Zellmigration und der damit verbundenen Aktinorganisation, aber auch mit verschiedenen Krankheiten. Daneben weisen viele der gefundenen Gene differenzierte Funktionen in der Zellkommunikation, der embryonalen Entwicklung und dem Auftreten verschiedener Tumoren auf.

#### **4.1 Charakterisierung und Interpretation von Genen der Proliferation**

Für drei der isolierten Gene ist eine direkte Interaktion mit VEGF in der Literatur bereits beschrieben. Neben dem Placental Growth Factor (PGF), der, wie bereits oben erwähnt, ein hochpotentes Regulatorprotein für die Angiogenese ist, wurden zwei weitere Gene, TIMP 3 und THBS 1 gefunden. Bei diesen handelt es sich jedoch im Gegensatz zu PGF um Antagonisten, die den VEGF spezifischen Rezeptor VEGFR 2 beeinflussen und somit die Angiogenese inhibieren können.

PGF ist ein Protein, das mit VEGF zu einer Familie von Regulatorpeptiden zusammengefasst wird. Beide Proteine besitzen die Fähigkeit, durch Interaktion mit zwei Endothel-Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (VEGFR 1, VEGFR 2), die Blutgefäßbildung sowie die Gefäßpermeabilität zu regulieren (Mattei et al., 1996).

Beide Rezeptoren, sowohl VEGFR 2 wie auch VEGFR 1, spielen eine entscheidende Rolle in der Angiogenese, dies zeigen Experimente, bei denen beide Rezeptoren selektiv ausgeschaltet wurden (Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995), wobei VEGFR 2 eher an der pathologischen Angiogenese zum Beispiel im Zusammenhang mit Krebserkrankungen und diabetischer Retinopathie beteiligt zu sein scheint, während VEGFR 1 eher Tumorwachstum, Metastasierung und Entzündungsreaktionen begünstigt (Shibuya, 2006).

Der VEGFR 2 weist insgesamt eine stärkere Tyrosin-Kinase-Aktivität auf und vermittelt die Zellproliferation, Zellmigration sowie Gefäßpermeabilität und Gefäßformation (Keyt et al., 1996; Yang et al., 2001).

In der Literatur ist für VEGF eine wesentlich höhere Affinität zu VEGFR 1 als zu VEGFR 2 beschrieben (de Vries et al., 1992).

PGF besitzt sogar eine selektive Affinität zu VEGFR 1 und interagiert nicht mit VEGFR 2 (Park et al., 1994). Über die Aktivierung von VEGFR 1 durch PGF kommt es aber zu einer intermolekularen Transphosphorylierung um VEGFR

2, der seinerseits dadurch die VEGF-gesteuerte Angiogenese stimuliert (Autiero et al., 2003). VEGF seinerseits vermittelt eine erhöhte PGF-Expression und kann somit seine Wirkung geradezu exponentiell steigern.

Neben der direkten Aktivierung von VEGFR 1 durch PGF und der damit verbundenen indirekten Aktivierung von VEGFR 2 konkurrieren die beiden Wachstumsfaktoren um die Bindung an VEGFR 1. Da PGF aber nur an VEGFR 1 binden kann, kommt es somit indirekt zu einer Erhöhung der Konzentration des VEGF am VEGFR 2 Rezeptor, welches nun vermehrt an diesen Rezeptor binden kann und hier zu den oben beschriebenen Reaktionen Endothelzellwachstum, Proliferation und Migration führt.

TIMP3 wird von Perizyten generiert und reguliert in Kombination mit TIMP2, synthetisiert aus Endothelzellen, die Stabilisierung von ersten gebildeten Gefäßschlauchformationen. Auch die zuvor ablaufende Morphogenese dieser Formationen (Lumenbildung und Invasion) wird durch TIMP2 und TIMP3 beeinflusst (Saunders et al., 2006).

Bei TIMP3 handelt es sich zudem um einen Angiogeneseinhibitor, welcher die Fähigkeit besitzt, VEGF zu hemmen. TIMP3 blockiert hierzu die Bindung von VEGF an VEGFR 2 und inhibiert damit direkt die Angiogenese (Qi et al., 2003); darüber hinaus hemmt es indirekt die Endothelzellmigration (Oh et al., 2004).

Welche Funktion bzw. welchen Vorteil diese gleichzeitige Aktivierung von Inhibitoren für eine geordnete Angiogenese genau hat, ist zurzeit noch ungeklärt. Es ist aber zu vermuten, dass durch ein solches negatives Feedback ein Überschießen der Angiogenese verhindert werden soll. Ähnliche Regulationsmechanismen finden sich vielfach zum Beispiel bei der Atmung, der Körperkerntemperaturregulation oder verschiedenen endokrinen Systemen.

Thrombospondin 1 wurde erstmals im Zusammenhang mit der Aggregation von Blutplättchen bei der Gerinnung beschrieben. Daneben besitzt es eine Vielfalt von biologischen Funktionen und wird von vielen Zellen

(Endothelzellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen etc.) synthetisiert und sezerniert. Unter anderem spielt es eine Rolle in der natürlichen Hemmung pathologischer Angiogenese (Volpert et al., 2002).

Thrombospondin 1 führt zu einer Erhöhung von FasL in Endothelzellen, welches deren Apoptose vermittelt. Der notwendige Partner von FasL, der Fas-Rezeptor, findet sich zunächst nur gering exprimiert auf ruhenden Endothelzellen und Gefäßen, so dass es durch die alleinige Steigerung der FasL Konzentration nicht zu einer deutlich vermehrten Apoptose kommt. Werden die Endothelzellen und Gefäße nun aber durch angiogene Faktoren stimuliert, kommt es zu einer signifikanten Anreicherung des Fas-Rezeptors und dadurch zu einer Sensibilisierung der stimulierten Zellen für die FasL-vermittelte Apoptose. Über einen an pro- und antiangiogene Faktoren gekoppelten Mechanismus kommt es somit zu einer selektiven Zerstörung neugebildeter Kapillaren ohne bereits bestehende Gefäßsysteme zu zerstören (Volpert et al., 2002).

Neben dieser selektiven Hemmung der Angiogenese inhibiert Thrombospondin 1 aber auch generell die Angiogenese und invasives Tumorwachstum. Gezeigt werden konnte dies im Mausmodell, bei denen Mäuse genetisch so verändert wurden, dass sie Thrombospondin entweder gar nicht oder vermehrt exprimierten. Bei fehlendem Thrombospondin 1 kam es zu einer deutlich vermehrten Bindung von VEGF an den VEGFR 2 und der daraus resultierenden Angiogenese sowie stark erhöhten Werten von aktiver Metalloproteinase-9 (Rodriguez-Manzaneque et al., 2001).

Für Thrombospondin lässt sich also ebenfalls wie für TIMP3 eine regulierende Rolle für VEGF-Signalvermittlung postulieren. Zusätzlich führt es zu einer Suppression der Aktivität von Metalloproteinase-9, einem Schlüsselenzym für Angiogenese, invasives Tumorwachstum und Metastasierung.

## **4.2 Charakterisierung und Interpretation von Genen der Migration, der Plastizität sowie der Gefäßformation**

Bei der Identifizierung der differenziell exprimierten Gene fand sich eine große Gruppe, die mit dem Zytoskelett und im Besonderen mit Aktin in Verbindung stand. Der Aufbau sowie die Organisation des Aktin – Zytoskelettes sind wichtig für die Form und auch für die Funktion von Zellen. Einige der gefundenen Gene sind beteiligt an der Steuerung sowie dem Aufbau dieses Zytoskeletts. Zu den detektierten Genen gehören ACTB, MSN, LASP1, ARHA, VCLN1 sowie CAPZB und Myosin. Das ACTB ist ein Gen, welches für einen wichtigen Bestandteil des Zytoskeletts kodiert, Aktin. Daneben fanden sich noch VCL (involviert in die Verankerung von F-Aktin), MSN (wichtig für die Organisation und die Ausrichtung des Aktins) sowie ARHA, welches die Aktinumbildung steuert.

Neben diesen drei Genen finden sich noch Lasp-1 und CAPZB, zwei Aktin-binding-Proteine, sowie AKAP 2, welches sich in Assoziation mit F-Aktin in Regionen des kortikalen Zytoskeletts ansammelt. Des Weiteren wird die Expression von Myosin durch die Stimulation mit VEGF angeregt. Myosin kommt bekanntermaßen mit Aktin in Muskelzellen vor und bewirkt deren Kontraktion.

Das Zytoskelett der eukaryotischen Zelle erfüllt drei wesentliche Aufgaben. Es dient als mechanisches Gerüst der Zelle, das ihr die typische Gestalt verleiht und Membranen und Organellen miteinander verbindet. Des Weiteren funktioniert es wie eine „Schiene für den Transport“ innerhalb der Zelle. Organellen und andere große Komplexe können an ihm entlangwandern.

Die in Zusammenhang mit der Arbeit wichtigste Funktion ist allerdings die Zellmigration. Neben Muskelzellen enthalten auch Zellen von nicht-kontraktilem Gewebe, wie beispielsweise Endothelzellen, viele verschiedene Motorproteine, mit deren Hilfe sie sich koordiniert und gerichtet bewegen können.

Das dreidimensionale Cytosklett eukaryoter Zellen setzt sich aus drei Komponenten zusammen, die nach ihrer Größe eingeteilt werden: Die Mikrotubuli (ca. 25 nm), die Intermediarfilamente (ca. 10 nm) und die Mikrofilamente (ca. 8 nm), deren Baustein das Aktin ist, welches durch VEGF vermehrt in den Endothelzellen exprimiert wird. Aktinfilamente (F-Aktin) sind polare, dynamische Strukturen mit zwei unterschiedlichen Enden, an denen die Polymerisation unterschiedlich schnell abläuft. Sind die Enden nicht durch besondere Proteine stabilisiert, wächst das eine (+) – Ende ständig, während das andere (-) – Ende gleichzeitig zerfällt. Die Aktinmonomere, aus denen F-Aktin besteht, wandern dadurch langsam durch das Polymer („Tretmühlen-Effekt“) wodurch eine gerichtete Migration erfolgen kann. Mit Pilzgiften kann man diesen Teilprozess experimentell blockieren (siehe Abb. 4).

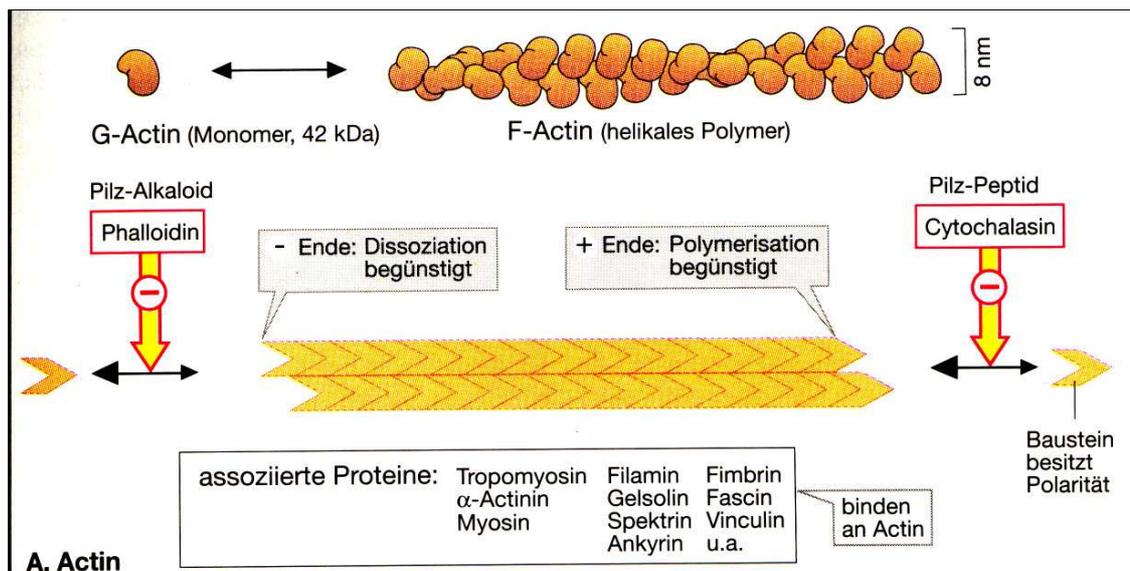


Abb. 4 Aufbau und Polarität von F-Aktinfilamenten sowie Aufzählung verschiedener Faktoren, die die Polarität beeinflussen

Taschenatlas der Biochemie, Jan Koolman, Klaus –Heinrich Röhme, Thieme

Ras Homolog (Rho) Gene Family, Member A (ARHA), eine Guanosine Triphosphatase (GTP), vermehrt exprimiert durch VEGF-Stimulation, reguliert den oben beschriebenen Umbauprozess des Aktincytosklettes während der Zellmorphogenese sowie der Zellmotilität (Bryan et al., 2005). In Versuchen

konnte gezeigt werden, dass ARHA über seinen Effektor ROCK1 die LIM-Kinase aktiviert und phosphoryliert. Diese wiederum phosphoryliert Cofilin, das seinerseits die Aktin-Depolimerisationsaktivität hemmt und somit in den Aufbau der Aktinfilamente eingreift (Maekawa et al., 1999). Versuche mit genmanipulierten Mäusen ergaben, dass durch positive bzw. negative Störung der Rho-Aktivität suppressive bzw. begünstigende Effekte auf die Neovaskularisation geerzielt werden konnte (Hoang et al., 2004). Antagonisiert wird die Aktivität der GTP-ase Rho, ein Synonym für ARH – Gene, unter anderem durch Moesin. Es konnte in Versuchen gezeigt werden, dass Zellen, denen Moesin fehlt, epitheliale Charakteristika verlieren und invasives Verhalten annehmen. Moesin fördert die kortikale Aktinanordnung und die apikal-basale Polarität. Es wird aber vermutet, dass die epitheliale Morphologie nicht durch Strukturfunktionen gefördert wird, sondern vielmehr durch Antagonisierung der Rho GTP-ase (Speck et al., 2003).

Vinculin gehört zu den Zytoskelett-Proteinen, die eine wichtige Rolle bei Haftstrukturen zwischen zwei Zellen oder auch zwischen Zellen und Extrazellulärmatrix spielen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Vinculin in die F-Aktin-Verankerung mit der Membran involviert ist (Weller et al., 1990).

Der nachgewiesene direkte Einfluss von VEGF auf diese Gene zur Organisation und zum Aufbau des Zytoskletts, insbesondere des Aktins der Endothelzellen, lässt vermuten, dass die Zellmigration also hauptsächlich durch das F-Aktin und nicht etwa durch die sehr viel größeren, ebenfalls dynamischen Mikrotubuli vermittelt wird.

Die Angaben zu Moesin lassen weiter vermuten, dass die zu einem späteren Zeitpunkt notwendige Zellstabilisierung für eine endgültige Gefäßbildung durch die von VEGF induzierte Aktinorganisation vermittelt wird.

Eine zusammenfassende Interpretation der in den beiden letzten Kapiteln beschriebenen Gene führt zu dem Schluss, dass VEGF offensichtlich sämtliche der in der Einleitung beschriebenen Schritte der Angiogenese direkt oder indirekt steuern kann, was dessen herausragende Bedeutung in diesem Kontext eindrücklich bestätigt.

### **4.3 Charakterisierung und Interpretation von Genen, die mit neurologischen Erkrankungen in Zusammenhang stehen**

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf den Einfluss von VEGF auf die Tumorangio-genese gelegt. Daneben sind aber auch neurotrophische und neuroprotektive Eigenschaften von VEGF bekannt (Jin et al., 2002).

Der Aspekt, dass VEGF nicht nur Einfluss auf die Angiogenese, sondern auch auf die Neurogenese hat, spiegelt sich in dieser Arbeit durch die Expression von verschiedenen Genen wider, die im Zusammenhang mit verschiedenen neuro-degenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson (UCHL 1, UB B), Morbus Alzheimer (LRP 1, ARHA, UB B) und Down Syndrom (TTC 3) stehen. Ebenfalls hierzu zählen die Chaperone HSPD 1 und DNA JB1. Das CRIM 1 hat vermutlich Einfluss auf die Differenzierung und das Überleben von Motoneuronen, die in Interaktion mit Wachstumsfaktoren stehen (Kolle et al., 2000). Daneben fand sich noch das Gen HSCR1, welches an der Pathogenese von Morbus Hirschsprung beteiligt ist.

Eines der vermehrt exprimierten Gene ist Ubiquitin B, ein ATP-abhängiger Proteolysefaktor, entscheidend für nicht-lysosomalen intrazellulären Proteinabbau. Hierbei werden die abzubauenen Proteine an Ubiquitin gebunden und markiert, um dann anschließend durch intrazelluläre Proteasomen abgebaut zu werden. Dadurch sorgt der Proteolysefaktor für die Eliminierung von intrazellulären defekten Proteinen und von intakten Proteinen mit sehr hohem Durchsatz (Murray et Norbury, 2000).

Es wird vermutet, dass Ubiquitin neben Beta-Amyloid eine entscheidende Rolle bei verschiedenen neuropathologischen Erkrankungen spielt. Es konnten Proteine in Ansammlungen von Neurofibrillen und in neuritischen Plaques im cerebralen Kortex von Patienten mit Alzheimer und Down-Syndrom entdeckt werden, die Formen von Vorläufer von beta-Amyloid und von Ubiquitin-B,

dessen C-Terminus verändert war, enthielten (Lowe et al., 1988), (Lennox et al., 1988).

Ubiquitin Carboxyl-Terminal Esterase L1, ein Protein, das notwendig für den Bau von Ubiquitin-Monomeren aus kleinen C-terminalen Ubiquitin-Untereinheiten ist, wurde ebenfalls vermehrt nach der Stimulation mit VEGF exprimiert.

UCHL 1 wird vor allem in Zusammenhang mit Morbus Parkinson gebracht (Liu et al., 2002). Hierbei scheint jedoch nicht die Hydrolaseaktivität, die notwendig für den Ubiquitinbau ist, entscheidend zu sein, sondern die Ligaseaktivität. Varianten von UCHL 1, die eine stark herabgesetzte Ligaseaktivität aufweisen, zeigen gleichzeitig auch ein deutlich vermindertes Risiko für die Parkinsonerkrankung.

Ebenfalls durch VEGF vermehrt exprimiert wurden zwei Proteine (HSPD und DNA JB1), die zu der Familie der Chaperone, auch Heat-shock-Proteine genannt, gehören. Heat-shock-Proteine spielen vor allem bei der Komplexbildung von Proteinen und bei der Proteinfaltung eine wichtige Rolle (Cheng et al., 1989), (Ellis et al., 1990), (Rothman, 1989). Daneben modulieren sie aber auch Polyglutamine, die für viele dominante neurodegenerative Erkrankungen verantwortlich gemacht werden, und setzen damit deren Neurotoxizität herab (Chan et al., 2000).

VEGF greift an unterschiedlichen Stellen in Prozesse neurodegenerativer Erkrankungen ein. Es fördert hierbei einerseits den Progress der Erkrankungen durch die Stimulation von Ubiquitin und UCHL1, übt aber auch gleichzeitig eine allgemeine neuroprotektive Funktion durch die Stimulation der Chaperone aus. Die Interpretation dieser Ergebnisse ist schwer, sie bestärkt allerdings die Hypothese einer wesentlichen Rolle von VEGF in der Pathophysiologie neurologischer Erkrankungen und kann die Basis für weitere Forschungsaktivitäten sein.

#### **4.4 Charakterisierung und Interpretation weiterer Gene**

Bei der Bildung und Strukturierung eines Proteins wird zunächst die mRNA-Sequenz in Aminosäuren umgeschrieben. Um jedoch ein voll funktionsfähiges Peptid zu erhalten, müssen die unstrukturierten langen Aminosäureketten noch in spezieller Weise gefaltet und umgebildet werden. In Assoziation mit dieser Proteinsynthese stehen vier gefundene Gene, die Polymerase 2, PR dm 4, HSPD1 sowie DNA JB 1. Die beiden erstgenannten Gene werden benötigt für die Transcription der proteinkodierenden Gene zu Aminosäureketten, die beiden letztgenannten Gene hingegen spielen eine signifikante Rolle bei der anschließenden Faltung und Strukturbildung der kodierten Proteine (Cheng et al., 1989, Ellis, 1990, Rothman, 1989).

Eine große Gruppe steht im Zusammenhang mit Zellwachstum und allgemein mit Zellkommunikation. Es wurden Gene der Signaltransduktion (MSN, SLC 20A1, NTF 2, VDAC1, RAB 5B, NME 2), der Zellorganellen (VPS 29), der Zellerkennung (PCDH-gamma, B4 GALT 4, PSMB 7), der Zelladhäsion (FN 1, VCL, B4 GALT4) und der Zellproliferation sowie – differenzierung (STMN1) entdeckt. Zusätzlich fand sich, neben fünf Ribosomale Proteinen, SHMT1, welches eine zentrale Rolle allgemein im Zellwachstum spielt (Elsea et al., 1995).

Drei der detektierten Gene bilden Antagonisten zum Zellwachstum und stehen mit der Apoptose in Zusammenhang. Hier ist zum einen RECK zu nennen, welches die Angiogenese durch vermittelte Apoptose über Metalloproteinasen stoppt (Yoon et al., 2003) und zum anderen CASP 9, das den wichtigsten Faktor in der Caspase-Kaskade zur Apoptose darstellt und abhängig von dATP und Cytochrom C ist. Daneben findet sich VDAC 1, ein mitochondriale Porin Kanal, durch welchen Cytochrom C geschleust wird. Dieser Kanal kann durch proapoptotische Proteine geöffnet und durch antiapoptotische Proteine geschlossen werden.

Zusätzlich zu den genannten Genen wurden noch Proteine der embryonalen Entwicklung (SET, CASP 9, TGF B1, TTC 3), der Regulation der Insulinsensitivität (YWAHZ) sowie der Glycogen-Synthese (GBE1) gefunden.

#### **4.5 Vor- und Nachteile einer SSH**

Die Angiogenese ist in ihrer Regulation und ihren funktionellen Mechanismen bisher nur unzureichend verstanden. Welche detaillierte Funktion in diesen Abläufen einzelne Faktoren, wie zum Beispiel VEGF spielen, ist in vielen Bereichen noch nicht vollständig geklärt. Um Gene zu identifizieren, die durch einen solchen einzelnen Faktor beeinflusst werden, ist die SSH eine mögliche Methode, die es erlaubt, zwei Zellpopulationen auf differentielle Genexpression hin zu untersuchen.

Der Vorteil der SSH besteht im Wesentlichen darin, dass eine Vorauswahl der zu identifizierenden Gene nicht nötig ist. Somit können sowohl unerwartete wie auch bislang unbekannte Gene detektiert werden. Die SSH, die in verschiedenen Zellsystemen Anwendung finden kann, ist somit eine Methode, die an den Anfang der Untersuchung eines physiologischen oder pathologischen Prozesses gestellt werden sollte. Mit den Ergebnissen besteht im Anschluss an die SSH dann die Möglichkeit, identifizierte Schlüsselgene unter funktionellen Fragestellungen weiter zu analysieren.

Die Validität der Methode ist nicht zuletzt in dem Labor, in dem die hier erwähnten Experimente durchgeführt wurden, an verschiedenen Zellsystemen wiederholt bestätigt worden (Neuhaus et al., 2003).

Bei Fragestellungen, die die differentielle Expression bestimmter vorbekannter Gene betrifft, ist die SSH demgegenüber nicht die Methode der Wahl, hier würden beispielsweise DNA-Chips schneller und einfacher die gewünschten Ergebnisse liefern.

## 5 Zusammenfassung

Die Bildung eines Tumors ist ein vielschrittiger Prozess, der mit dem Verlust der normalen Zellregulation beginnt. Essentiell für die Entwicklung eines Tumors ist die Angiogenese. Sie ermöglicht dem Tumor ein progredientes Wachstum über eine Größe von wenigen Kubikmillimetern hinaus sowie die Fähigkeit zur hämatogenen Metastasierung. Die Angiogenese ist dadurch entscheidend für den Verlauf einer Tumorerkrankung und es ergibt sich hier ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt. Voraussetzung für die Angiogenese ist die Fähigkeit von Endothelzellen zu Proliferation, Migration und Invasion in das umliegende Gewebe.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), ein im Zusammenhang mit Gefäßneubildung bekannter Wachstumsfaktor, wirkt selektiv stark mitogen auf Gefäßendothelzellen und induziert deren Migration sowie ihre Gestaltung zu schlauchartigen Formationen. VEGF scheint somit ein Schlüsselpeptid in der Angiogenese zu sein.

Vor diesem Hintergrund wurde eine Suppressiv Subtraktive Hybridisierung mit zwei Endothelzellpopulationen durchgeführt, bei der eine Zellpopulation nativ belassen wurde, die andere mit dem Wachstumsfaktor VEGF stimuliert wurde. Ziel der Arbeit war es, Gene zu identifizieren, die durch den Wachstumsfaktor VEGF differentiell von den Endothelzellen exprimiert werden.

Die humanen Endothelzellkulturen wurden zunächst aus Nabelschnüren gewonnen und in mehreren Schritten passagiert und kultiviert. Zehn Kulturflaschen einer Population wurden mit 50 ng/ml VEGF stimuliert, die anderen zehn Zellkulturen wurden nativ belassen. Aus beiden Zellkulturen erfolgte im Anschluss zunächst die Isolation der total-RNA und später hieraus die Isolation der m-RNA.

Die Suppressiv Subtraktive Hybridisierung (SSH) ist eine Technik, die es ermöglicht, zwei RNA – Pools miteinander zu vergleichen und Gene zu identifizieren, die in der einen Population exprimiert sind, hingegen in der

Vergleichspopulation nicht. Technisch setzt sich die SSH aus zwei aufeinanderfolgenden Hybridisierungen und aus zwei anschließenden PCR-Reaktionen zusammen.

Zunächst werden beide m-RNA-Populationen in cDNA synthetisiert, wobei die native Probe als „Driver“ und die mit VEGF stimulierte m-RNA als „Tester“ bezeichnet wird. Anschließend wird die c-DNA mit dem Enzym Rsa I verdaut, so dass sich stumpfe Enden bilden, an denen sich Adaptoren binden können. Die „Tester“- cDNA wird geteilt und mit zwei verschiedenen Adaptoren ligiert, die „Driver“-cDNA hat keine Adaptoren. Bei der ersten Hybridisierung wird ein Überschuss an „Driver“ – cDNA zu jeder Probe „Tester“- DNA hinzugegeben, wodurch gleich exprimierte DNA – Fragmente abgefangen werden, hingegen differentiell exprimierte Sequenzen in Einzelstrangform verbleiben. Bei der folgenden zweiten Hybridisierung werden zunächst die beiden Proben der ersten Hybridisierung gemischt und erneut ein Überschuss an „Driver“ – cDNA hinzugegeben. Durch die zweite Hybridisierungsreaktion entstehen die Vorlagen der differentiell exprimierten Genen für die späteren PCR-Reaktionen. Die PCR-Reaktionen führen jeweils zu einer Anreicherung der differentiell exprimierten Genen.

Insgesamt konnten mit der Methode 70 Gene detektiert werden, deren Expression direkt durch die Wirkung von VEGF in Endothelzellen vermittelt wird. 14 identifizierte Gene sind in ihrer Funktion und Struktur noch unbekannt. Die übrigen 56 Gene konnten exakt identifiziert und verschiedenen Funktionen zugeordnet werden.

Für drei Gene ist ein Zusammenspiel mit VEGF bereits in der Literatur vorbeschrieben. Placental Growth Factor, ist ein hochpotentes Regulatorprotein für die Angiogenese und steht in Wechselwirkung mit VEGF. Die beiden weiteren Gene, Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 und Thrombospondin 1 hingegen sind Antagonisten von VEGF.

Die meisten Gene konnten jedoch in dieser Arbeit das erste Mal mit VEGF in Zusammenhang gebracht werden. Eine Gruppe der detektierten Gene wird im Kontext von Aufbau und Organisation des Zytoskelettes, insbesondere des

Bausteins Aktin gesehen. Diese Gene beeinflussen auf unterschiedliche Weise die Architektur, die Migration und Plastizität von Zellen sowie die Gefäßbildung. Hierzu gehören Aktin Beta, Moesin (MSN), LIM and SH3 protein1, RAS homolog gene family, member A, Vinculin (VCL) sowie Capping protein beta und Myosin. Darüber hinaus regelt oder beeinflusst eine große Gruppe der Gene die Zellkommunikation und hat Einfluss auf das Zellwachstum. Es wurden Gene der Signaltransduktion (MSN, Solute carrier family 20, member 1, Nuclear transport factor 2, Voltage-dependent anion channel (VDAC), RAS associated protein RAB 5B, Nonmetastatic cells 2), der Zellorganellen (Vacuolar protein sorting 29), der Zellerkennung (Protocadherin-gamma, subfamily A, Beta-1,4-Galactosyltransferase 4 (B4 GALT 4), Proteasome subunit, beta-type,7), der Zelladhäsion (Fibronectin 1, VCL, B4 GALT 4) und der Zellproliferation sowie – differenzierung (Stathmin) gefunden. Daneben fanden sich fünf ribosomale Proteine.

Andere Gene wiederum sind entscheidend bei der Apoptose (Reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs, Caspase 9, VDAC) oder der Proteinbildung (Polymerase 2, PR domain-containing protein 4, Heat-shock 60-KD protein 1 (HSPD1), DNAJ, E.coli homolog of subfamily B, member 1 (DNA JB)).

Ein weiterer Aspekt, der bei dieser Arbeit jedoch nicht primär im Fokus der Untersuchungen stand, ist der Einfluß von VEGF auf die Expression verschiedener Gene, die im Zusammenhang mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson (Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1, Ubiquitin B (UB B)), Morbus Alzheimer (Low density lipoprotein receptor-related protein 1, RAS homolog gene family, member A, UB B) und Down Syndrom (Tetratricopeptide repeat domain 3) stehen. Hierzu zählen ebenfalls HSPD 1 und DNA JB.

Auf der Grundlage dieser Ergebnissen können weitere Untersuchungen zielgerichtet folgen, um das Verständnis für die molekulargenetische Basis der Angiogenese, aber auch bestimmten neuropathologische Prozesse, zu vertiefen.

## 6 Übersichtstabelle der identifizierten Gene

Abk.	Gefäßbildung	Zell-kommunikation	Tumor-assoziatio	Aktin etc.	Neurol. Erkr.	Sonstiges
MSN	ohne MSN verlieren Ez ihre charakterlichen Eigenschaften -> invasive Migration	Zell-Zell-Erkennung, Signal für Zellbewegung		Aktinorganisation und -ausrichtung (apikale-basale Polarität)		
PGF	Stimuliert Angiogenese über FLT-1 (spezifisch)					Gehört mit VEGF in eine Gruppe
NME2		Regulation von Signaltransduktion	Tumor-suppressorgen			
ANXA2	Hohe Expression in EZ	Membranbindungsprotein				Hemmt Phospholipase A / Ca-Phospholipid-Protein
SHMT1			Zentral für Zellwachstum			Zellwachstum
FN1		Zelladhäsion, morphologie Endozytose				Serum-Protein
LRP1					Säuberung und Abbau von APP-generated beta-amylois	
ENO1						
PPT					Multiple Funktionen bei neurolog. Phänomenen/ Erkrankungen	
LASP1		notwendig für das Zellüberleben nach Stimulation mit einem Wachstumsfaktor	Erhöhte Expression bei Brustkrebs 8-12%	Aktin-binding-protein		dynamisches Adhäsionsprotein, wichtig für Zellwanderung
SET			Inhibition von Enzymen, die Tu-Metastasen unterdrücken			Findet sich in Proteinen, wichtig für die embryonale Entwicklung
CAPZB				Aktin-binding-protein		
NTF2		Passive Diffusion und aktiver Transport Proteineinschleusung in den Kern				

Abk.	Gefäßbildung	Zell-kommunikation	Tumor-assoziatio	Aktin etc.	Neurol. Erkr.	Sonstiges
VDAC		Porenbildendes Protein in Membranen				Cytochrom-C reguliert stoppt mitoch. Apoptose wird durch proapopt. Proteine geöffnet und durch antiapoptotische Proteine geschlossen
ARHA				Steuert die Aktinumbildung bei Motilität und Morphogenese vermittelt Epithelzellmigr. durch Aktincytoskelettorg.	M. Alzheimer (RHO-Inhibition) führt im Mausmodell zur Senkung von Amyloid-β	= RHO 12
HSPD1		Faltung und Formbildung von Proteinen (Tertiär- u. Quartärstruktur)			Ch. können Polyglutamine, verantwortlich für viele dominante, neurodeg. Erkrankungen modulieren  -> Neurotoxizitäts-senkung	Chaperon
RPS12			Erhöht bei Kolorektalem - Tumor			Ribosomen
RPS16			nur erhöht bei wenig diff. Pankreas-TU-Zellen			Ribosomen
RPL4						Ribosomen
ACTB				Aktin- β (cytoskelettal)		
PRdm4			Zelldifferenzierung und Tumorigenese			
EEF1			Erhöht bei Pankreas-TU Bei Verlust der Kontakthemmung wird EEF vermehrt produziert			
TIMP3	Hemmung der Angiogenese durch Blockierung von VEGFR2		Neg. Regulation von TNF-α			

Abk.	Gefäßbildung	Zell-kommunikation	Tumor-assoziati on	Aktin etc.	Neurol. Erkr.	Sonstiges
VCL	Zell-Zell-Junktions Zell-EM-Junktions			Involviert in die F-Aktin-Verankerung mit der Membran		
PSMB7						Proteasomenfa m. / produziert MHC-1-Moleküle für Immunantwort
GBE1						Glycogen-Synthese
YWHAZ						
TOM1						
RAB5B	Reguliert Vesikeltransport zw. Plasmamembran und Endosomen					
THBS1	Angiogenese-Hemmer (hemmt angiog.-Antw. auf NO)		Hemmt TU-Wachstum durch Hemmung d. Angiogenese  Bei Fehlen -> Erhöhung von MMP-9 *1			reguliert VEGF-Signalübertragung  vermittelt Apoptose, um Angiogenese zu blocken
AKAP2				tritt vermehrt auf in Regionen d. kortikalen Cytoskelettes (mit F-Aktin)		
RPS27				in malignen Zellen und Karzinomgewebe erhöht		Ribosomen
PCDH		Zell-Zell-Interaktionen				Subfamily A der nicht klassifizierten Cadherine
RPL7a						Ribosomen
SLC20		Natrium abhängiger Phosphat-Symporter				
CASP9					bei Ausschaltung in der embr. Entw. entsteht ein übergroßes und missgebildetes Cerebrum (fehlende Apoptose)	wichtigster Faktor in der Caspase-Kaskade zur Apoptose, dATP und CytochromC abhängig

Abk.	Gefäßbildung	Zell-kommunikation	Tumor-assoziati on	Aktin etc.	Neurol. Erkr.	Sonstiges
DNAJB1		Proteinkomplex-bildung, -denaturierung, -faltung, -renaturierung etc.			Ch. können Polyglutamine, verantwortlich für viele dominante, neurodeg. Erkrankungen modulieren  -> Neurotoxizitäts-senkung	Heat-shock-family  (Chaperon)
TGFB1			Reduziert in verschiedenen Tumorzelllinien			spielt eine Rolle bei der embr. Entwicklung des Darmepithels
STMN1		Zellproliferation, -funktion, -differenzierung Signaltransduktion				Stathmin-family
UCHL1					M. Parkinson spez. in Neuronen und Zellen d. diff. neuroendokr. Systems veränderte Funktionen d. Ubiquitin-Systems -> Neurodegeneration	hydrolysiert C-term.-Glieder d. Ubiquitin und ermöglicht so Ubiquitinbildung
POLR2a		wirksam bei der Transkription (PCR)				
RECK	Mäuse sterben bereits als Embryonen, durch Fehler der Gefäßbildung		Keine Expression in Tumorzelllinien Eingebracht in TU, hemmen sie nicht deren Wachstum, aber invasives Verhalten und Metastasenbildung			inhibiert MMP-9  reguliert MMP-2 und -14
UBB					M. Parkinson M. Alzheimer (wird im Gehirn von Alzheimer-Patienten gefunden)	Änderungen d Ubiquitin-Syst. Verursachen direkte Neurodegenerationen (siehe auch UCHL)
B4GALT		Zellerkennung und -adhäsion				katalytisches Enzym
CRIM1						

Abk.	Gefäßbildung	Zell-kommunikation	Tumor-assoziatio	Aktin etc.	Neurol. Erkr.	Sonstiges
TTC3					Down Syndrom Erhöht bei Gehirn- und RM- Entwicklung Wichtig für Gestaltung, Diff. und Fortbestehen von Motoneuronen	
VPS29						Sorting-Proteine dienen dem erhalt der Zellorganellen
MYO1C						notwendig zur Kontraktion von Muskelzellen
DAB2			Nach Einbau in Ovar-Ca-Zellen -> Wachstums- reduktion			
*1 MMP-9 : Metalloproteinase-9, ein Schlüsselenzym bei invasivem Tumorwachstum und Metastasierung						

## Literaturverzeichnis

**Antonelli-Orlidge A, D' Amore PA.**

Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1987; 105: 1455-1462

**Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM.**

Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 1995; 92: 365-371

**Ausprunk DH, Folkman J.**

Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1977; 14: 53-65

**Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Candeliet P.**

Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003; 9: 936-943

**Balconi G, Dejana E.**

Cultivation of endothelial cells: limitations and perspectives. *Med Biol* 1986; 64: 231-245

**Bicknell R, Harris AL.**

Novel growth regulatory factors and tumor angiogenesis. *Eur J Cancer* 1991; 27: 781-785

**Bobik A, Campbell JH.**

Vascular derived growth factors: cell biology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1993; 45: 1-41

**Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM.**

Indirekt angiogenic cytikines upregulate VEGF and bFGF gene expression only. *Circulation* 1994; 90: 649-652

**Bryan BA, Li D, Wu X, Liu M.**

The Rho family of small GTPases: crucial regulators of skeletal myogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:1547-1555

**Bucher O, Wartenberg H.**

Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. *Bern-Stuttgart-Toronto: Huber, 1989*

**Burgess WH, Maciag T.**

The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 575-606

**Chan HY, Warrick JM, Gray-Board GL, Paulson HL, Bonini NM.**

Mechanisms of chaperone suppression of polyglutamine disease: selectivity, synergy and modulation of protein solubility in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2811-2820

**Cheng MY, Hartl FU, Martin J, Pollock RA, Kalousek F, Neupert W, Hallberg EM, Hallberg RL, Horwich AL.**

Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* 1989 ; 337: 620-625

**Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familetti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT, Stern D.**

Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990; 172: 1535-1545

**Cotta-Pereira G, Sage H, Bornstein P, Ross R, Schwartz S.**

Studies of morphologically atypical („sprouting“) cultures of bovine aortic endothelial cells. Growth characteristics and connective tissue protein synthesis. *J Cell Physiol* 1980; 102: 183-191

**Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N.**

The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994; 59: 483-489

**Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD.**

Suppression Subtractive Hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6025-6030

**Dobson DE, Kambe A, Block E, Dion T, Lu H, Castellot JJ Jr., Spiegelmann BM.**

1-Butyrol-glycerol: A novel angiogenesis factor secreted by differentiating adipocytes. *Cell* 1990; 61: 223-230

**Ellis RJ, van der Vies SM, Hemmingsen SM.**

The molecular chaperone concept. *Biochem Soc Symp* 1989; 55: 145-153

**Elsa SH, Juyal RC, Jiralerspong S, Finucane BM, Pandolfo M, Greenberg F, Baldini A, Stover P, Patel PI.**

Haploinsufficiency of cytosolic serine hydroxymethyltransferase in the Smith-Magenis syndrome. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1342-1350

**Ferrara N, Henzel WJ.**

Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 851-858

**Folkman J.**

Angiogenesis: initiation and control in endothelium. *Ann NY Acad Sci* 1982; 401: 212-227

**Folkman J.**

Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31

**Folkman J.**

Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175: 409-416

**Folkman J.**

Tumor angiogenesis : therapeutic implications. *New Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186

**Folkman J., Shing Y.**

Angiogenesis. *J Biol Chem* (1992); 267: 10931-10934

**Folkman J, Langer R, Linhardt RJ, Haudenschild C, Taylor S.**

Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 1983; 221: 719-725

**Folkman J, Langer R, Linhardt RJ, Haudenschild C, Taylor S.**

Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 1983; 221: 719-725

**Folkman J., Klagsbrun M.**

Angiogenic Factors *Science* 1987; 235: 442-447

**Folkman J. In: De Vita V, Hellman S, Rosenberg SA, eds.**

Biologic therapy of cancer. *Philadelphia: JB Lippincott Co* 1991: 743-753

**Folkman J, Ingber D.**

Inhibition of angiogenesis . *emin Cancer Biol* 1992; 3: 89-96

**Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML.**

Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70

**Form DM, Auerbach R.**

PGE2 and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983; 172: 214-218

**Gimbrone MA Jr., Cotran RS, Folkman J.**

Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 1974; 60: 673-684

**Gitay-Goren H, Halaban R, Neufeld G.**

Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 190: 702-709

**Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J.**

Isolation and characterization of vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculostellate cells. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 7311-7315

**Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J.**

Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 1993; 69: 508-517

**Hoang MV, Whelan MC, Senger DR.**

Rho activity critically and selectively regulates endothelial cell organization during angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 1874-1879

**Iizuka M, Yamauchi M, Ando K, Hori N, Furusawa Y, Itukaichi H, Fukutsu K, Moriya H.**

Quantitative RT-PCR assay detecting the transcriptional induction of vascular endothelial growth factor under hypoxia. *Biochem Biophys Res Comm* 1994; 205: 1474-1780

**Ingber D, Madri JA, Folkman J.**

A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: induction of capillary basement dissolution. *Endocrinology* 1986; 119: 1768-1775

**Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, Wernstedt C, Hagiwara K, Usuki K, Takaku F, Risau W, Heldin CH.**

Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 1989; 338: 557-562

**Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR.**

Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52: 2745-2756

**Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA.**

Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 11946-11950

**Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, Duarte CM, Park J, Chen H, Ferrara N.**

Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1996; 271: 5638-5646

**Lennox G, Lowe J, Morrell K, Landon M, Mayer RJ.**

Ubiquitin is a component of neurofibrillary tangles in a variety of neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett* 1988; 94: 211-217

**Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N.**

Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309

**Ling Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL, Hempstead B, Mark WH, Hajjar KA.**

Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J Clin Invest.* 2004; 113: 38-48

**Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT Jr.**

The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 2002; 111: 209-218

**Lowe J, Lennox G, Jefferson D, Morrell K, McQuire D, Gray T, Landon M, Doherty FJ, Mayer RJ.**

A filamentous inclusion body within anterior horn neurones in motor neurone disease defined by immunocytochemical localisation of ubiquitin. *Neurosci Lett* 1988; 94: 203-210

**Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S.**

Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *1999; 285: 895-898*

**Mattei MG, Borg JP, Rosnet O, Marme D, Birnbaum D.**

Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively. *Genomics 1996; 32: 168-169*

**Morris PB, Ellis MN, Swain JL.** Angiogenic potency of nucleotide metabolites: potential role in ischemia-induced vascular growth. *J Mol Cell Cardiol 1989; 21: 351-358*

**Murray RZ, Norbury C.**

Proteasome inhibitors as anti-cancer agents. *Anticancer Drugs 2000; 11: 407-417*

**Neuhaus T, Lutz C, Stier S, Totzke G, Gruenewald E, Fronhoffs S, Sachinidis A, Vetter H, Ko YD.**

The use of suppression subtractive hybridization for the study of SDF-1alpha induced gene-expression in human endothelial cells. *Mol Cell Probes 2003; 17: 245-252*

**Oh J, Seo DW, Diaz T, Wie B, Ward Y, Ray JM, Morioka Y, Shi S, Kitayama H, Takahashi C, Noda M, Stetler-Stevenson WG.**

Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. *Cancer Res 2004; 64: 9062-9069*

**O'Reilly MS.**

Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS 1997; 79: 273-294*

**O'Reilly MS Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Cao Y, Moses M, Lane WS, Sage EH, Folkman J.**

Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994 (a); 59: 471-482

**O'Reilly MS Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J.**

Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994 (b); 79: 185-188

**Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N**

Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994; 269: 25646-25654

**Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, Baker A, Anand-Apte B.**

A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 2003; 9: 407-415

**Rastinejad F, Poverini PJ, Bouck NP.** Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 1989; 56: 345-355

**Reiher FK, Volpert OV, Jimenez B, Crawford SE, Dinney CP, Henkin J, Haviv F, Bouck NP, Campbell SC.**

Inhibition of tumor growth by systemic treatment with thrombospondin-1 peptide mimetics. *Int J Cancer* 2002; 98: 682-689

**Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J, Iruela-Arispe ML.**

Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12485-12490

**Rothman JE.**

Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell* 1989; 59: 591-601

**Sakamoto N, Tamaka NG, Tohgo A, Ogawa H.** Heparin plus cortisone acetate inhibit tumor growth by blocking endothelial cell proliferation. *Cancer J* 1986; 1: 55-58

**Saunders WB, Bohnsack BL, Faske JB, Anthis NJ, Bayless KJ, Hirschi KK, Davis GE.**

Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3. *J Cell Biol* 2006; 175: 179-191

**Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R.**

Transforming growth factor- $\alpha$ : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 1986; 232: 1250-1253

**Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC.**

Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-66

**Shibuya M.**

Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39: 469-478

**Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E.** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-845

**Sidky YA, Borden EC.** Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res* 1987; 47: 5155-5161

**Siemeister G, Schnurr B, Mohrs K, Schächtele C, Marme D, Martiny-G.** Expression of biologically active isoforms of the tumor angiogenesis factor VEGF in E. coli. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222: 249-255

**Speck O, Hughes SC, Noren NK, Kulikauskas RM, Fehon RG.** Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity. *Nature* 2003; 421: 83-87

**Steiner R, Weisz PB, Langer R.**

Angiogenesis: Key principles – science, technology, medicine. *Basel: Birkhäuser, 1992*

**Taylor S, Folkman J.**

Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 1982; 297: 307-312

**Volpert OV, Pili R, Sikder HA, Nelius T, Zaichuk T, Morris C, Shiflett CB, Devlin MK, Conant K, Alani RM.**

Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. *Cancer Cell* 2002; 2: 473-483

**Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, Amin M, Bouck NP.**

Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* 2002; 8: 349-357

**De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT.**

The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255: 989-991

**Weller PA, Ogryzko EP, Corben EB, Zhidkova NI, Patel B, Price GJ, Spurr NK, Koteliansky VE, Critchley DR.**

Complete sequence of human vinculin and assignment of the gene to chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 5667-5671

**White CW, Wolf SJ, Korones DN, Sondheimer HM, Tosi MF, Yu A.**

Treatment of childhood angiomatous diseases with recombinant interferon alfa-2a. *J Pediatr* 1991; 118:59-66

**Yamagami I, Suzuki Y, Ito M, Fujimura H.**

Influence of various drugs on tissue permeability. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1970; 66: 19-35

**Yang S, Xin X, Zlot C, Ingle G, Fuh G, Li B, Moffat B, de Vos AM, Gerritsen ME.**

Vascular endothelial cell growth factor-driven endothelial tube formation is mediated by vascular endothelial cell growth factor receptor-2, a kinase insert domain-containing receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1934-1940

**Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS.**

Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis.

*J Biochem Mol Biol* 2003; 36: 128-1237

**Yoshida A, Anand-Apte B, Zetter BR.**

Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth

factor and vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 1996; 13: 57-64

**Ziche M, Jones J, Gullino PM.** Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 475- 481