

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Thomas Gress

Arbeitsgruppe Prof. Dr. Brigitte Lankat-Buttgereit

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Standort Marburg/Lahn



Der Einfluss von Pcd4 auf die Expression des Proteins Angiopoietin2

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt

von

Sebastian Krug

aus Bad Salzungen

Marburg 2011

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am: 24.5.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. B. Lankat-Buttgereit
1. Korreferent:	PD Dr. Meißner
2. Korreferent:	Prof. Dr. Oliver

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Pdc4	1
1.1.1 Struktur von Pdc4	1
1.1.2 Subzelluläre Lokalisation von Pdc4	2
1.1.3 Expression und Regulation von Pdc4	3
1.1.4 Funktionen von Pdc4	6
1.2 Angiopoietine	9
1.2.1 Struktur der Angiopoietine	9
1.2.2 Eigenschaften und Expression von Angiopoietin2	10
1.2.3 Physiologische Bedeutung von Angiopoietin2	11
1.2.4 Angiopoietin2, ein Antagonist und partieller Agonist am Tie2-Rezeptor	12
1.2.5 Angiopoietine und Malignität	13
1.2.6 Angiopoietin2 und Entzündung	14
1.2.7 Weitere Funktionen von Angiopoietin2	15
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien	17
2.1.2 Einwegartikel	18
2.1.3 Substanzen und Lösungen der Versuche	19
2.1.3.1 Zellkultur	19
2.1.3.2 Transiente Transfektion	20
2.1.3.3 Gesamtproteinextrakte	21
2.1.3.4 RNA Isolation	21
2.1.3.5 Western Blot	22
2.1.3.6 Semiquantitative RT-PCR	24
2.1.3.7 Real Time PCR	25
2.1.3.8 Tube Formation Assay	26
2.1.3.9 Boyden Chamber Assay	26

2.1.3.10 Cell Invasion Assay	26
2.2 Methoden	28
2.2.1 Kultivierung der Zellen	28
2.2.1.1 Zelllinien	28
2.2.1.2 Kulturbedingungen	28
2.2.1.3 Passagieren der Zellen	29
2.2.1.4 Kryokonservierung der Zellen	30
2.2.1.5 Auftauen der Zellen	31
2.2.2 Transiente Transfektion	31
2.2.3 Proteinchemische Methoden	32
2.2.3.1 Gesamtproteinextrakte	32
2.2.3.2 Western Blot	34
2.2.3.2.1 Herstellung des SDS-Polyacrylamidgels	35
2.2.3.2.2 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine	36
2.2.3.2.3 Blotting	36
2.2.3.2.4 Ponceau S-Färbung	37
2.2.3.2.5 Detektion	38
2.2.4 Molekularbiologische Methoden	41
2.2.4.1 RNA-Isolierung	41
2.2.4.2 PCR und RT-PCR	42
2.2.4.2.1 Agarosegelherstellung	47
2.2.4.3 Real-time detection PCR	48
2.2.4.3.1 Einzelstrang cDNA Synthese	49
2.2.4.3.2 Ds cDNA Synthese	50
2.2.4.3.3 Durchführung der RTD-PCR	53
2.2.5 Tube Formation Assay	56
2.2.6 Boyden Chamber Assay	57
2.2.7 Cell Invasion Assay	59
2.2.8 Statistik	60
3. Ergebnisse	61
3.1. Abhängigkeit der Ang2 Protein Produktion von der Pcd4 Protein	
Menge in Tumor-Zelllinien des pankreatiko-gastro-intestinalen Traktes	61
3.1.1. Pcd4 Suppression mittels siRNA	61

3.1.2. Ang2 Expression in den mit siPdc4 behandelten Zelllinien	62
3.2. Semiquantitative RT-PCR	64
3.3. Abhängigkeit der Ang2 Protein Produktion durch Pdc4	
Reduzierung in weiteren Zelllinien	65
3.3.1. Zelllinien die keine Regulierung von Ang2 durch Pdc4 aufwiesen	66
3.4. Real Time Detection PCR	67
3.5. Nachweis von sezerniertem Ang2 im Überstand von stabil transfizierten mit shPdc4 behandelten Zelllinien	72
3.6. Tube Formation Assays mit konditioniertem Medium	74
3.7. Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2	79
3.8. Boyden Chamber Assays mit konditioniertem Medium	83
3.9. Cell Invasion Assays mit konditioniertem Medium	86
4. Diskussion	87
4.1. Das Zusammenspiel von Malignität, Angiopoietin2 und dem Tumorsuppressor Pdc4	87
4.2. Funktionelle Bedeutung der gesteigerten Ang2 Konzentration	91
4.3. Modellvorstellung	93
Literaturverzeichnis	95

Anhang	114
a. Abkürzungen	114
b. Einheiten	117
Zusammenfassung	118
Abstract	120
Lebenslauf	122
Verzeichnis der akademischen Lehrer	123
Danksagung	124
Ehrenwörtliche Erklärung	125

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Pdc4

Programmed cell death 4 (Pdc4) wurde als ein Gen entdeckt, welches nach der Initiation der Apoptose hochreguliert wird. In diversen Säugetieren konnte Pdc4 unabhängig von verschiedenen Arbeitsgruppen kloniert werden, wodurch unterschiedliche Bezeichnungen für diese Homologe entstanden: MA-3 (1995) [93] oder TIS (1996) [189] in Mäusen, H731 (1997) [119] oder 197/15a (1998) [99] im Menschen, pdc4 (2001) [176] in Hühnern und DUG (2002) [3] in Ratten. Schließlich wurden diese Homologe zusammenfassend und zur Vereinfachung als **Pdc4** bezeichnet. Im Laufe der Zeit erhärtete sich der Verdacht, dass Pdc4 die Funktion eines Tumorsuppressor besitzt. In vielen Tumoren oder während maligner Transformation ließen sich supprimierte Pdc4 Mengen nachweisen. Gleichzeitig zeigten hohe Pdc4 Mengen stets auch antineoplastische Effekte. Somit scheint Pdc4 ein wichtiger Prognosefaktor und ein strategischer Angriffspunkt im Rahmen der Tumorbehandlung zu sein.

1.1.1 Struktur von Pdc4

Im menschlichen Genom befindet sich das Pdc4 Gen auf Chromosom 10q24 [59]. Das Pdc4 Protein besteht dabei aus 469 Aminosäuren und verfügt über ein Molekulargewicht von 64 kDa. Neben zwei möglichen „nuclear localization signals“ (NLS) am N- und C-Terminus und einer putativen RNA-bindenden Region (Position 1-157) besitzt Pdc4 auch zwei konservierte α -helikale MA-3 Domänen in der Mitte (MA-3m) und am C-Terminus (MA-3c) [3, 16, 117, 119] (siehe auch Abbildung 1.1). Diese MA-3 Domänen können einerseits direkt über eine Bindung an die RNA-Helikase

eIF4A die „cap-dependent“ Translation verhindern, zum anderen führt das konkurrierende Verhalten mit dem Adapterprotein eIF4G, welches auch an eIF4A bindet und somit schließlich zur Bildung des eIF4F Komplexes beiträgt, zu einer indirekten Hemmung der Translation [3, 27, 30, 64, 67]. Später durchgeführte detailliertere strukturelle Analysen der Bindungspartner und der Bindungskomplexe zeigten vielschichtiger Interaktionen zwischen den MA-3 Domänen und den eukaryotischen Translation Initiations Faktoren [27, 87, 103, 104, 140] als zuvor beschrieben.

Zusätzlich besitzt das Pdc4 Protein zwei Phosphorylierungsstellen an Position Ser⁶⁷ und Ser⁴⁵⁷ [7]. Des Weiteren besitzt die Pdc4 mRNA eine Bindungsstelle für miR-21 an Position 228-249 im 3'- nicht translatierten Bereich (UTR) [79]. Beides sind wichtige Ansatzpunkte für die Regulation von Pdc4 auf mRNA- und Proteinebene.

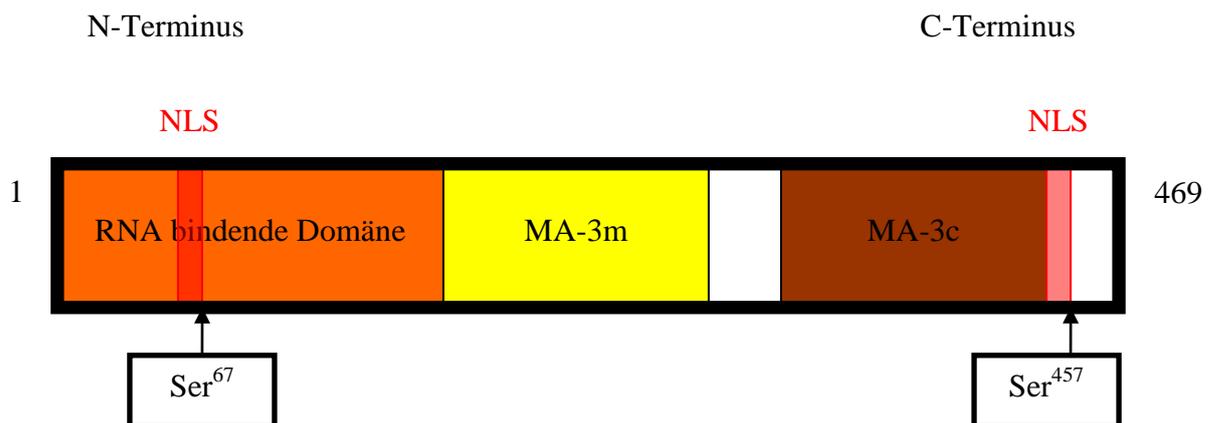


Abbildung 1.1: Struktur von Pdc4

1.1.2 Subzelluläre Lokalisation von Pdc4

Anhand von Antikörper-Untersuchungen und Immunfluoreszenzstudien wurde erstmalig gezeigt, dass Pdc4 vor allem im Zellkern [61, 176] oder im perinukleären Zytoplasma von gesunden Zellen lokalisiert ist [150]. Hingegen präsentierten Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen oder Zellen in der Übergangsphase von normalen Zellen zu Tumorzellen eher eine Anreicherung von Pdc4 im Zytoplasma [51, 53, 126, 102, 149, 153]. Darüber hinaus gibt es aber andere Studien, die

gegenteilige Effekte der Pdc4 Lokalisation aufgezeigt haben [117, 195]. Erklärungsversuche für diese Unterschiede beziehen die entdeckte Fähigkeit von Pdc4, zwischen Zellkern und Zytoplasma zu pendeln, mit ein [16], beschreiben aber auch eine veränderte Pdc4 Stabilität nach Reifung von Zellen, bewiesen bei Granulozyten [134]. Schließlich scheint auch eine Phosphorylierung von Pdc4 durch Akt zu einer nukleären Lokalisation von Pdc4 beizutragen, wohingegen nicht phosphoryliertes Pdc4 zytoplasmatisch liegt [7].

1.1.3 Expression und Regulation von Pdc4

Humanes Pdc4 wird ubiquitär exprimiert. Die höchsten Konzentrationen von Pdc4 konnten in der Leber und im Thymus nachgewiesen werden, gefolgt von Gehirn, Niere, Lunge, Milz und Hoden [93, 188]. In suprabasalen Schichten der menschlichen Haut zeigte sich ebenfalls eine starke Pdc4 Aktivität [149]. Die niedrigsten Messungen von Pdc4 wurden im Skelettmuskel und im Herz beschrieben [93, 188].

Eine Pdc4 Expressionssteigerung konnte durch proapoptische Substanzen wie Ionomycin, PMA, Dexamethason [93], durch Überproduktion des FAS-Liganden [3] oder SOX15 [69], durch die Differenzierungsstimulatoren ATRA, DMSO, Arsentrioxid [133, 134] oder durch Zytokine wie IL-12 erreicht werden [99]. Außerdem führte der Entzug von IL-2, IL-3 [93] oder Serum/Glukosemangel zu einer Steigerung der Pdc4 Level. Weiterhin wurde in Mausembryonen im 8-zellstadium eine erhöhte Pdc4 Produktion nachgewiesen [6]. Schließlich führte auch die zelluläre Alterung zu einer erhöhten Pdc4 Expression [117].

Daneben offenbarten Zytokine wie IL-2, IL-15 [99], COX-2 über IL-8 und PGE₂ [129] einige Wachstumsfaktoren (EGF, TGF-β1, HGF) [149] und Pioglitazone [105] verringern die Einflüsse auf Pdc4. Hingegen konnte eine Behandlung von HCC-Zellen mit TGF-β1 die Pdc4 Expression und dadurch die Apoptoserate erhöhen [62].

Neben Regulationen in normalen Geweben beschrieben im Laufe der Zeit immer mehr Studien die Herunterregulierung von Pdc4 auf Protein und/ oder mRNA Ebene in Tumoren. Dazu zählen Lungentumore [10, 183], Gliome [10, 45, 46, 108], Nierentumore [10], Zungentumore [44], die Karzinogenese in Kolontumoren [51, 148], Hautveränderungen (Plattenepithelkarzinome, Maligne Melanome, Basalzellkarzinome,

Umgebung von T-Zell Lymphomen) [149], Hepatozelluläre Karzinome [62, 185], Nasopharyngeale Tumore [178], duktale Mammakarzinome [195] und Ovarialkarzinome [17, 126, 182].

Die molekularen Mechanismen dieser Pdc4 Ausschaltung beziehen posttranskriptionale und proteinmodifizierende Prozesse ein. Wie schon angedeutet ist eine Regulationsmöglichkeit die Phosphorylierung von Pdc4 Protein am Ser⁶⁷ oder Ser⁴⁵⁷ durch den PI3K/Akt/S6K1 („mTOR ribosomal protein S6 kinase 1“) Signalweg [28, 127], der zentrale Bedeutung für das Zellwachstum, den Zellzyklus, die Zellproliferation und die Apoptose hat. Dies führte über die Ubiquitin Ligase SCF^{βTRCP} zur Ubiquitinmarkierung und dadurch zum schrittweisen proteosomalen Abbau von Pdc4 [33, 127, 168]. Eine Aktivierung des MEK-ERK Pfades erleichterte schließlich auch die Pdc4 Degradation im Stadium der Ubiquitynylierung [168]. Weiterhin zeigten BCR-ABL transformierte CML-Zellen auch eine Aktivierung des mTOR/S6K1 Komplexes und damit eine Suppression von Pdc4 [122]. Im Gegenzug erbrachten Experimente zur Blockade des BCR-ABL angeregten oder des durch ein Statin (Fluvostatin) verändernden mTOR/S6K1 Weges eine Pdc4 Protein Expressionssteigerung [86, 122].

Ein weiterer Vorgang der Pdc4 Verminderung bezieht sich auf die posttranskriptionale mRNA Regulierung durch MicroRNAs. MicroRNAs sind nicht codierende RNAs, die die Translation durch die Bindung an den 3'- nicht translatierten Bereich der Ziel mRNA beeinflussen [191]. Außerdem sind MicroRNAs an Prozessen der Differenzierung, Proliferation und Apoptosehemmung sowie an Karzinogenese, Tumorwachstum, Invasivität/ Metastasierungsfähigkeit und damit an Tumorprogression beteiligt [191]. Dies entspricht den gegenteiligen Funktionen von Pdc4. Dabei bestätigte sich, dass miR-21 in verschiedenen Tumoren zu einem vermehrten Abbau von Pdc4 mRNA beiträgt [79]. In einigen Fällen bestand zusätzlich eine inverse Korrelation zwischen der Pdc4 und der miR-21 Expression in normalen Geweben und malignen Tumoren [48, 92, 125, 184] (siehe auch Abbildung 1.2 und 1.3: Auswirkungen der Pdc4 Expression durch Beeinflussung von miR-21). Allerdings zeigte sich in einer neueren Veröffentlichung keine Regulierung von Pdc4 durch miR-21 in Prostatakarzinomen [109]. Eine Studie präsentierte Ergebnisse von Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses bei denen neben miR-21 möglicherweise miR-103 und miR-107 zu einer Verringerung der Pdc4 Expression führten [144]. Wie unlängst publiziert, könnte auch miR-155 Pdc4 regulieren [194].

Weiterhin wurde die Möglichkeit der transkriptionalen Regulierung von Pcd4 beschrieben. V-myb, ein Transkriptionsfaktor, bewies eine Pcd4 steigernde Wirkung in Hühnerzellen [163, 176]. Hingegen zeigte die Herunterregulierung von c-myb verringernde Einflüsse auf Pcd4 [54]. Die Ausschaltung von DNMT1 (DNA Methyltransferase 1), welche in der Regel CpG Bereiche am 5'-Ende methyliert und damit die Genexpression in Säugetieren kontrolliert, führte unter anderem in HCC-Zellen und Gliomen zu einer Pcd4 Expressionssteigerung [46, 55]. Im Einklang dazu bewies die Methylierung eine Erniedrigung von Pcd4 auf der mRNA Ebene in Gliomen [46].

Weitere Arbeiten mit Chemotherapeutika, wie Retinoiden/ Retinoid-Rezeptor-Agonisten, Antiöstrogenen, HER2/neu Antagonisten, COX-2 Inhibitoren, 5-FU [107, 130, 195, 198] oder sogar 13-HOA, einem Metaboliten der Linolsäure [115] führten zu einer Steigerung der Pcd4 Bildung.

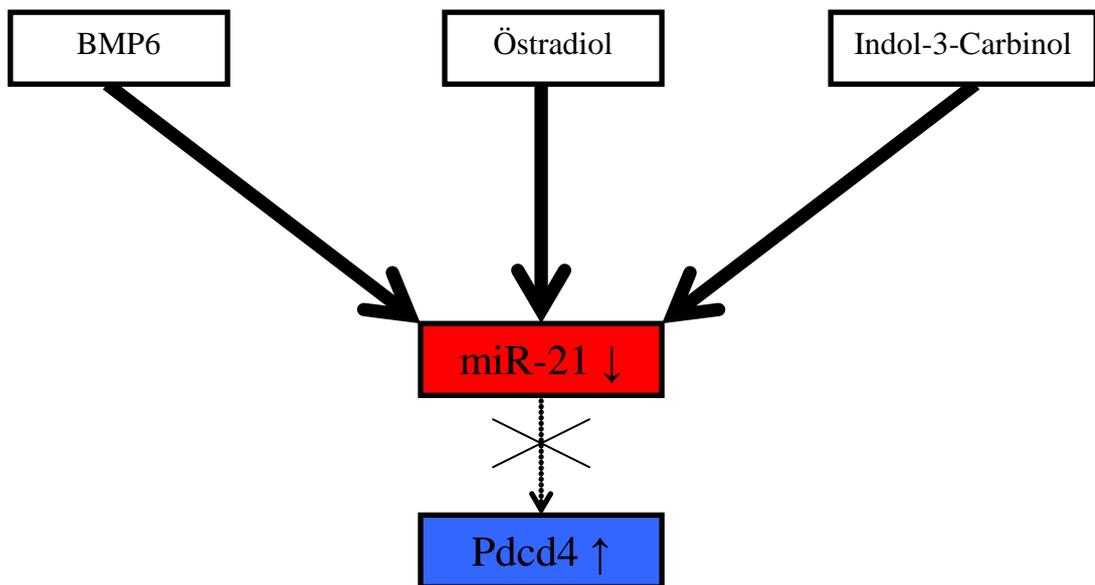


Abbildung 1.2: Pcd4 Steigerung durch Senkung von miR-21

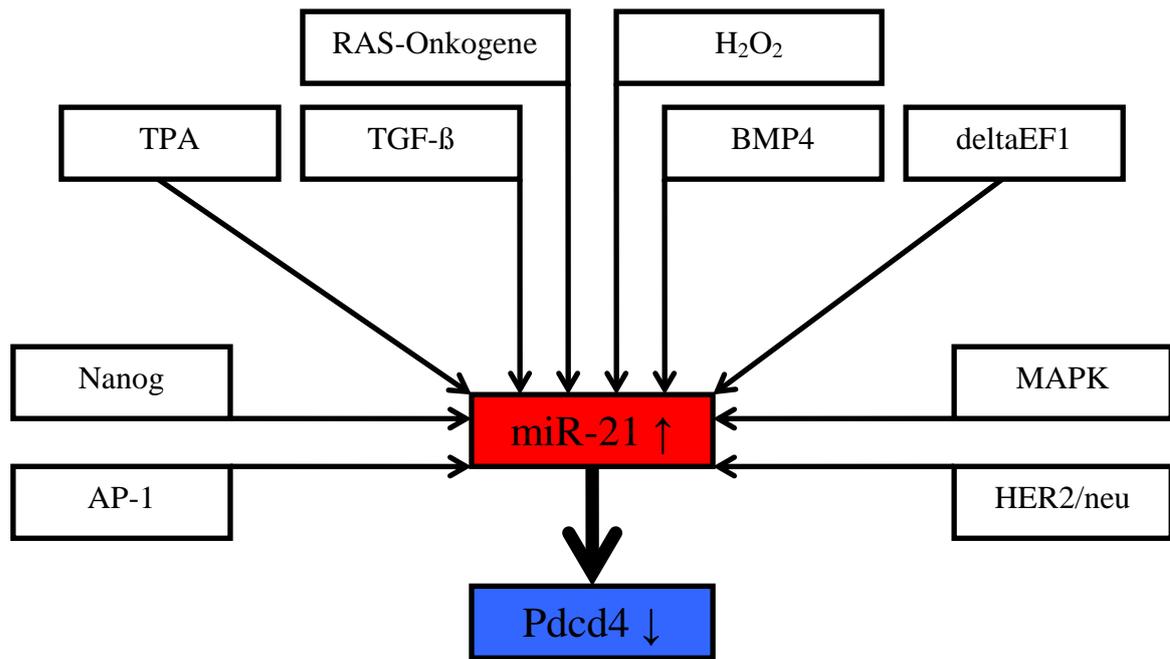


Abbildung 1.3: Pcd4 Senkung durch Steigerung der miR-21 Expression

1.1.4 Funktionen von Pcd4

Wie schon oben erwähnt kann Pcd4 aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften die Translation von bestimmten Proteinen hemmen. Ferner hat Pcd4 durch seine RNA bindende Domäne die Möglichkeit in metabolische RNA Prozesse einzugreifen [16], auch wenn die Komplexität dieser Vorgänge noch nicht vollständig untersucht ist.

In dem „JB6 - epidermal mouse model“ wurde früh festgestellt, dass Pcd4 neoplastische Transformation unterbinden kann und eventuell als Tumorsuppressor agiert [32, 65, 66]. Daneben zeigte Pcd4 die Fähigkeit, die Transaktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 durch Hemmung des MAP4K1 – JNK Pfades zu stören [65, 66, 68, 121]. AP-1 ist dafür bekannt verschiedene Signalwege zu aktivieren, die im Zusammenhang mit Zellinvasion, Zellmotilität und Tumorprogression stehen [15, 42, 101]. Eine wiederhergestellte oder erhöhte AP-1 abhängige Transkription konnte sowohl durch die Ausschaltung, als auch durch die Phosphorylierung von Pcd4 mittels Akt erreicht werden [7, 142]. Zusätzlich leitete die Herunterregulierung von Pcd4 Zellinvasion, Intravasation und Metastasenbildung von Tumoren über die erhöhte β -Catenin/ Tcf-abhängig Transkription [141, 142], die gesteigerte u-PAR Genexpression [88] und die hochregulierte c-Myc Bildung ein [141]. Ein Mangel an Pcd4 führte

ebenfalls zu wachsenden DNA Schäden nach UV Licht-, Etoposid- und Ethylmethylsulfonat-Exposition. Dadurch wurden Zellen in ihrer genomischen Stabilität beeinflusst und die entstandenen Mutationen der DNA trugen zur Tumorgenese und Apoptoseresistenz bei [120, 138]. Überdies reprimierte Pdc4 die Sekretion der neuroendokrinen Tumormarker CgA und Sg II sowie von PC1, einem in mehreren Tumoren oft erhöhten Protein [105]. Eine Überexpression von Pdc4 förderte über die vermehrte Sekretion von TIMP-2 [129] oder durch negative Steuerung der CA II [106] sowie der Lysyl-Oxidase [2] eine Wachstums- und Zellinvasionhemmung in Tumoren. Ein weiterer Mechanismus der Zellwachstumshemmung in Tumoren zeigte die Interaktion von Pdc4 mit dem Transkriptionsfaktor Twist1, wobei die Funktion von Twist supprimiert und damit die YB-1 Transkription unterdrückt wurde [113].

Hinzu kommt, dass eine starke Pdc4 Expression diverse Tumore für Chemotherapeutika sensibilisierte, z.B. Brust- oder Nierentumore für Geldanamycin [10], pankreatische Karzinoide für 5-FU oder Farnesol [107] und Prostataumore für Paclitaxel oder Cisplatin [113]. Die alleinige Pdc4 Expression stellte in einigen Tumoren sogar einen unabhängigen Prognosefaktor dar. Dabei gingen niedrige Pdc4 Level mit schlechterer Differenzierung, geringerem Überleben und Tumorprogression in Ovarialtumoren, Kolontumoren und Gliomen einher [46, 51, 126, 182]. Hohe Pdc4 Konzentrationen unterdrückten den malignen Phänotyp in Ovarialtumoren [199] und verringerten das Potential Metastasen von HCC zu bilden [153, 186].

Trotz alledem scheinen die Funktionen von Pdc4 auch zellspezifisch und abhängig vom genetischen Hintergrund zu sein [107], denn einige Studien präsentierten Effekte von Pdc4, die sich in anderen Tumoren nicht bestätigten, wie z.B. die unterschiedliche Regulierung von p21^{Waf1/Cip1} [53, 107, 120, 134] und von u-PAR [88, 129, 141] in verschiedenen Tumorzelllinien.

Neben vielen in vitro Experimenten haben einige Studien die Funktion von Pdc4 als Tumorsuppressor in vivo unterstrichen. Transgene Mäuse, die Pdc4 in der Epidermis überexprimierten, waren weniger anfällig für Papillome, für Karzinome oder für den Übergang von Papillomen zu Karzinomen [11]. Außerdem verkleinerte sich in Nacktmäusen die Tumormasse von Ovarialkarzinomen, die eine hohe Pdc4 Produktion aufwiesen [199]. In einem K-ras-Null Lungentumor Modell von Mäusen konnte Pdc4 als Dosieraerosol Apoptose fördern sowie Zellproliferation und wichtige proangiogenetische Faktoren (VEGF und EGF-2) unterdrücken [57]. Ähnliche Ergebnisse bestätigten sich in Lungen von Ap-1 Luciferase Reporter Mäusen. Dort

hemmte die Aerosolfreisetzung von Pcd4 die AP-1 Aktivität und erleichterte die Apoptose [160]. Ein weiterer Tierversuch mit Pcd4 defizienten Mäusen beschrieb eine spontane Lymphom, meistens B-Zell Lymphom Bildung, mit rascher Metastasierung. Als mögliche Ursache wurde eine erhöhte IL-4 und/ oder IL-10 Produktion identifiziert. Außerdem zeigten diese Mäuse eine Resistenz gegenüber Autoimmunerkrankungen wie Enzephalomyelitis und Diabetes [5]. Der Lipoxygenase Metabolit 13-HOA, welcher aus Linolsäure entsteht und in Getreidekörnern enthalten ist, förderte die Pcd4 Bildung in Mäusen. Dieser Mechanismus offenbarte antiinflammatorische Wirkungen in der Haut sowie antikarzinogene Eigenschaften, vermittelt über die Hemmung von AP-1 [115].

1.2 Angiopoietine

Die Angiopoietin Familie, bestehend aus den Liganden Angiopoietin1 (Ang1), Angiopoietin2 (Ang2), Angiopoietin3 (Ang3) und Angiopoietin4 (Ang4), bildet eine Gruppe von Wachstumsfaktoren, die eine große Bedeutung bei der Neubildung von Gefäßen hat. Gemeinsam ist den vier Proteinen die Bindung an den Tie2-Rezeptor [37, 76, 110, 139, 146]. Nachdem 1996 Ang1 identifiziert wurde, erfolgte 1997 mittels Homologiescreening die Entdeckung von Ang2 als Paralog von Ang1. Seit dem wurden die Angiopoietine 1 und 2 am gründlichsten untersucht. Beides sind sezernierte Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 75kDa [146]. Ang1 besteht aus 498 Aminosäuren und das zugehörige Gen ist auf dem Chromosom 8q22 lokalisiert, während Ang2 496 Aminosäuren besitzt und dessen Gen auf Chromosom 8q23 gelegen ist. Die Angiopoietine 1 und 2 sind dabei zu ~60% sequenzidentisch [139, 146].

1.2.1 Struktur der Angiopoietine

Der Grundaufbau der Angiopoietine ist charakterisiert durch eine am N-Terminus gelegene doppelt gewundene Domäne gefolgt von einem Verbindungspeptid und einer Fibrinogen ähnlichen Domäne nahe des C-Terminus [37, 139, 146] (siehe Abbildung 1.4). Während der doppelt gewundene Bereich verantwortlich für die Homo- oder Oligomerisierung (Trimere, Tetramere, Pentamere) der Liganden und damit für die Tie2-Rezeptor Aktivierung ist [96], spielt die Fibrinogen homologe Domäne eine wichtige Rolle bei der Tie2-Rezeptor Bindung [29, 145, 146, 179].

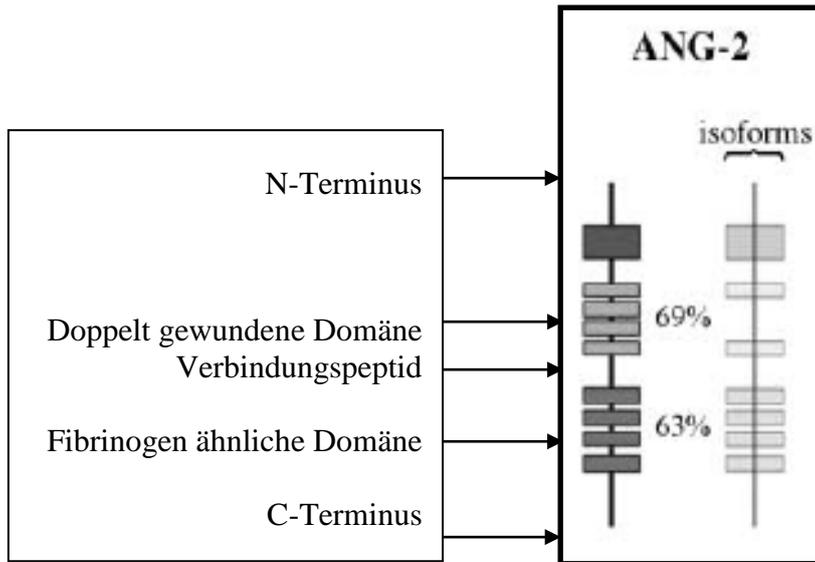


Abbildung 1.4: Schemazeichnung der Ang2 Struktur [181]. Rechts daneben ist eine Isoform dargestellt, die durch eine alternative Splicevariante des humanen Ang2 entsteht [75]. Die Prozentzahlen in der Mitte zeigen die Sequenzidentität zu den Ang1 Domänen.

1.2.2 Eigenschaften und Expression von Angiotensin II

Während die Bildung von Ang1 vorrangig in glatten Muskelzellen und Perizyten stattfindet, wird Ang2 fast ausschließlich von Endothelzellen produziert [9, 82, 128, 139, 157, 159, 174]. In Endothelzellen kann Ang2 neben dem von Willebrand-Faktor in den Weibel-Palade-Körpern, die im Zytoplasma liegen, gespeichert werden [174]. PMA, Ionomycin und Thapsigargin verursachen genauso wie die Zytokine Thrombin und Histamin eine schnelle Freisetzung von Ang2 aus den Weibel-Palade-Körpern [174, 196]. Daneben konnte auch S1P, ein Sphingolipid, die Exozytose von Ang2 induzieren, ohne eine unmittelbare Neusynthese von Ang2 zu erzeugen [21]. Im Gegensatz zu Ang1 wird Ang2 nach der Sekretion aber nicht in die extrazelluläre Matrix mit eingebunden, sondern diffundiert frei [192]. Trotzdem scheint Ang2 autokrin zu wirken, um die Reagibilität der Endothelzellen zu kontrollieren, hingegen Ang1 eher parakrin.

Im Gegensatz zu der relativ konstanten Expression von Ang1 wird Ang2 physiologisch vor allem in Geweben mit erhöhtem Gefäßumsatz exprimiert. Dazu zählt die Phase der Vaskularisierung der Retina genauso wie die Gefäßrückbildung des Corpus Luteum im weiblichen Reproduktionstrakt [139, 177]. Auch weisen Neurone der Retina und

Müller'sche Zellen eine Ang2 Produktion auf [34, 157]. Durch Angiogenese stimulierende Moleküle wie VEGF, bFGF, TNF- α oder FGF-2 scheint Ang2 unter hypoxischen und pathologischen Zuständen vermehrt gebildet zu werden [4, 9, 38, 50, 58, 77, 114, 137, 158, 159]. Hohe Glukosekonzentrationen und Superoxide können die Ang2 Bildung auch regulieren. Sowohl in Endothelzellen von Tumorzellen [35, 84, 200], als auch in Tumorzellen ist die Expression gesteigert [91, 152, 169].

Weitere Studien zeigten auch eine Regulation von Ang2 durch die Transkriptionsfaktoren Ets-1 [4] und FOXO1 [19], beides Proteine, die während destabilisierenden und umgestaltenden Prozessen hochreguliert werden.

1.2.3 Physiologische Bedeutung von Angiopoietin2 [43]

Wenn Ang2 in Gegenwart von VEGF an den Tie-2 Rezeptor von Endothelzellen bindet, lösen sich als Folge einer Signalkaskade Perizyten von den Endothelzellen. Dabei werden die Gefäße undicht, geweitet und damit durchlässig für bestimmte Proteasen und Matrixkomponenten des Blutstromes. Dieser Vorgang wird Extravasation genannt und charakterisiert die Destabilisierung der Gefäße. Dadurch können verschiedene angiogene Zytokine, wie VEGF, PDGF, FGF, EGF die Proliferation und Migration von Endothelzellen fördern. Es entstehen neue Zell-Zell-Verbindungen über Integrine und schließlich neue Endothelzellformationen, aus denen Blutgefäße werden. Die Stabilisierung der neuen Gefäße fordert dann letztlich die Bildung einer Basalmembran und das Umschließen durch Perizyten und glatten Muskelzellen. VEGF und Ang1 sind maßgeblich an der Stabilisierung der neuen Gefäße beteiligt [80, 146].

Schließlich zeigte sich, dass eine hohe Ang2 Expression in Verbindung mit einer gesteigerten VEGF-A Produktion zur Bildung neuer Gefäße führt, aber in Verbindung mit einer geringen Konzentration oder einer Hemmung von VEGF-A zur Gefäßrückbildung [80, 82, 139]. In verschiedenen in vivo und in vitro Experimenten konnte diese Beeinflussung bewiesen werden [80, 112, 190]. Damit bestätigte sich ein schon angenommenes Modell, welches Ang2 nicht als Aktivator von Tie-2 präsentiert, sondern als Gegenspieler zu den Ang1 vermittelten stabilisierenden Effekten und dadurch die Gefäße sensibel für angiogene Zytokine macht [83].

1.2.4 Angiotensin II, ein Antagonist und partieller Agonist am Tie2-Rezeptor

Zuerst wurde Ang1 als agonistischer Ligand des Tie-2 Rezeptors entdeckt. Ang2 hingegen gelang es nicht diesen endothelialen Rezeptor zu phosphorylieren und zu aktivieren. Damit zeigte Ang2 antagonistische Eigenschaften am Tie-2 Rezeptor [139]. Es wurde die Hypothese gestellt, dass Ang2 die Effekte von Ang1 blockieren kann und damit als natürlicher Antagonist von Ang1 wirkt [139]. Auch eine vermehrte Ang2 Exposition in in vivo und in vitro Experimenten konnte die Ang1/Tie2-Rezeptor Aktivierung verhindern [58, 63, 161, 174]. Spätere Studien bewiesen aber, dass Ang2 in Abwesenheit von Ang1 partiell agonistische Wirkungen besitzt und damit Phosphorylierungen des Tie2-Rezeptors induziert und wiederum in Anwesenheit von Ang1 den Tie2-Rezeptor antagonisiert [70]. Allerdings ist die Stimulation des Tie2-Rezeptors durch Ang2 weniger kräftig als die von Ang1, obwohl beide mit gleicher Affinität von über 3 nM an diesen Rezeptor binden [70, 139]. Wie nun Ang2 seine antagonistische/ agonistische Wirkung auf den Tie2-Rezeptor ausübt, bedarf zusätzlicher Forschungen, denn Ang1 und Ang2 beanspruchen eine nicht zu unterscheidende Tie2-Rezeptorsbindungsstelle [49]. Trotzdem wird angenommen, dass die Struktur der Fibrinogen ähnlichen Domäne, die für die Rezeptorbindung verantwortlich ist, Einfluss hat [145, 179]. Andererseits agiert Ang2 auch in Abhängigkeit vom Zelltyp, den experimentellen Gegebenheiten, wie Grad der Konfluenz der endothelialen Zellen, Dauer der Ang2 Stimulation, konzentrationsabhängigen Effekten und dem Vorhandensein von Kofaktoren wie Tie1 [20, 74, 82, 100, 128].

Gemeinsame Funktionen von Ang1 und Ang2 wurden in in vitro Versuchen gezeigt, zum Beispiel, dass Ang2 den Tie-2 Rezeptor phosphorylieren kann, wenn dieser außerhalb von Endothelzellen exprimiert wird [139]. Auch bei sehr hohen Konzentrationen der Tie-2 Rezeptoren auf der Endothelzelle oder bei langer Exposition mit Ang2 wurde eine Aktivierung erreicht [74, 172]. Ang2 kann Tube Formation, Chemotaxis und die Produktion von MMP-9 induzieren [1, 187] und besitzt die Fähigkeit Migration und Gefäßwachstum bei in Gel eingebetteten Endothelzellsphäroiden zu stimulieren [97].

1.2.5 Angiopoietine und Malignität

Die Balance zwischen Ang1 und Ang2 ist wichtig für die Gefäßintegrität und für die physiologische Gefäßneubildung. Neben VEGF konnte aber auch für die Angiopoietine nachgewiesen werden, dass sie an dem angiogenen Switch und damit an der Tumorangiose beteiligt sind [94, 155, 166]. Dabei wird das Gleichgewicht zwischen Förderung und Hemmung der Angiogenese zu Gunsten der Gefäßneubildung verschoben. Für die Angiopoietine würde dies bedeuten, dass Ang2 hochreguliert und Ang1 reduziert werden müsste. Damit kommen die destabilisierenden und proliferativen Eigenschaften von Ang2 zur Geltung.

Eine erhöhte Expression von Ang2 auf mRNA- und/ oder Proteinebene wurde in vielen Geweben von Tumoren nachgewiesen (siehe Übersichtsartikel [43, 151] und Abbildung 1.5). Darüber hinaus wurden im Blut von Patienten mit Krebsleiden, wie Plattenepithelkarzinome des Ösophagus [197], Mammakarzinome [52], Prostatakarzinome [52], HCCs [147] und Lungenkarzinomen [89], erhöhte Ang2 Spiegel gefunden. In Kolorektalen- und Magentumorzellen, die mit Ang2 transfiziert, damit zur Überproduktion angeregt und in Mäuse injiziert wurden, zeigte sich ein invasives Tumorwachstum. Diese Tumore proliferierten und metastasierten schneller als die Kontrollgruppe [155, 165]. In HCCs von Mäusen führte eine alleinige Überexpression von Ang2 nicht zum Tumorwachstum. Allerdings wurde in Verbindung mit einer erhöhter VEGF Bildung ein starkes Tumorwachstum und eine vermehrte Angiogenese festgestellt [60]. Im Gegensatz dazu führte eine Überexpression von Ang1 eher zu einer Reduktion der Tumormasse [72, 131, 132]. Neu entwickelte Ang2 Antikörper oder Peptid-Fc-Fusionsproteine, die die Verbindung zwischen Ang2 und dem Tie-2 Rezeptor störten, senkten ebenfalls das Tumorwachstum und die Angiogenese [84]. Schließlich präsentierten einige Studien aber auch Ergebnisse, die nicht in die Theorie des angiogenen Switch passen [9, 118, 180].

Letztendlich ist es von entscheidender Bedeutung, welchen Einfluss Angiopoietine bei Patienten mit Tumorerkrankungen haben. Dabei konnten die oben genannten Studien beweisen [26, 31, 78, 85, 116, 123, 124, 165], dass eine erhöhte Expression von Ang2 mit abgeschwächter Ang1 Bildung aufgrund von fortgeschrittenem Tumorstadium mit Lymphknoteninvasion, Gefäßinfiltration und Metastasen zu einer schlechteren Prognose führte. Dadurch ist die Überlebenszeit bei Patienten mit dieser Konstellation signifikant verringert.

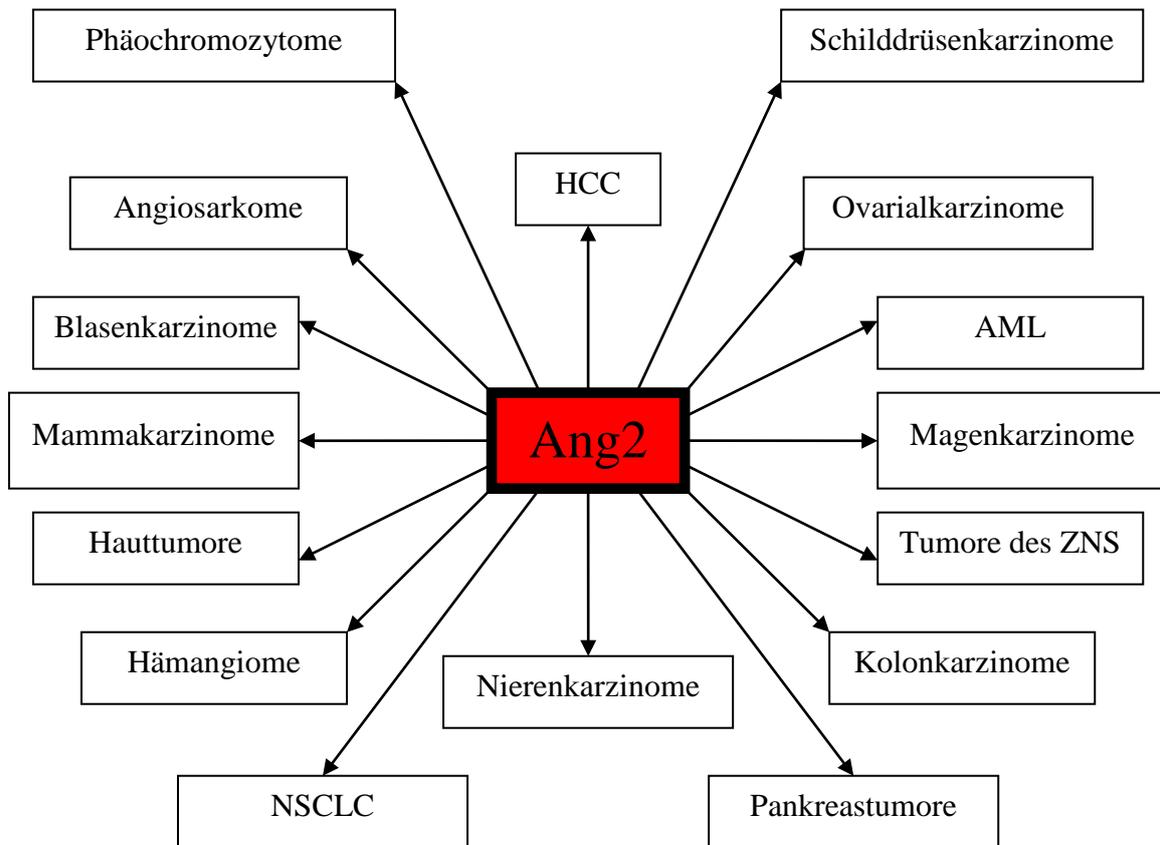


Abbildung 1.5: Erhöhte Ang2 Expression auf mRNA- und/ oder Proteinebene in verschiedenen Tumoren

1.2.6 Angiopoietin2 und Entzündung

Durch seine permeabilitäts steigernde, promigratorische und aktivierende Wirkung auf das Endothel [22, 47, 161] wird Ang2 auch als proinflammatorisches Zytokin angesehen. Die Serumkonzentrationen von Ang2 scheinen während einer Sepsis massiv erhöht zu sein (von 1-2 ng/ml auf 30ng/ml) und korrelieren zusätzlich mit der Mortalität. Patienten mit einem Ang2 Serumlevel über 20ng/ml verstarben zu 50% [36, 90, 156, 161]. In Erkrankungen wie Arthritis und Psoriasis bewiesen Studien zusätzlich eine Assoziation zwischen der Ang2 Produktion und der Gefäßneubildung. Außerdem führte bei in vivo Experimenten das Nichtvorhandensein von Ang2 in Mäusen zu fehlenden Entzündungsreaktionen [173].

1.2.7 Weitere Funktionen von Angiopoietin2

Tie2-Rezeptoren wurden auch in lymphatischen endothelialen Zellen entdeckt [98, 167, 171]. Eine Ausschaltung von Ang2 in Mäusen führte neben schweren Gefäßmissbildungen auch zu Fehlentwicklungen des lymphatischen Gewebes. Die lymphatischen Missbildungen konnten im Gegensatz zu den Gefäßmissbildungen durch vermehrte Ang1 Produktion behoben werden. Es ist anzunehmen, dass die Angiopoietine 1/2 über VEGF-C, VEGF-D und den dazugehörigen VEGFR-3 die Lymphangiogenese regulieren [167, 171].

Des Weiteren besteht ein Verdacht, dass Angiopoietine mit Integrinen, und damit Tie2-Rezeptor unabhängig, in Verbindung treten. In Fibroblasten, die keinen Tie2-Rezeptor besaßen, zeigte sich, vermittelt durch die Integrine $\alpha 5 \beta 1$ und $\alpha v \beta 5$, eine direkte Zelladhäsion mit Ang1 und Ang2 [170]. Endotheliale Zellen migrierten über Integrin $\alpha v \beta 3$ und $\alpha 5 \beta 1$ zu ortständigen Angiopoietinen, wobei eine direkte Bindung von Ang2 an das $\alpha 5 \beta 1$ Integrin zu gehäufeter Metastasierung von Mamma Karzinomen über den Akt Signalweg führte [81, 170]. Ebenfalls wurde die MMP-2 Produktion über eine Verbindung zwischen Ang2, $\alpha v \beta 1$ und FAK gesteigert, was schließlich die Invasivität von Gliomen förderte [12, 13].

In der Steuerung von mesenchymalen Zellen sowie im Hämatopoetischen System spielt die Tie2 – Angiopoietin Signalweiterleitung auch eine wichtige Rolle. Hierbei wurden bislang aber ausschließlich Untersuchungen mit Ang1 durchgeführt.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Pdcd4 (**programmed cell death 4**) wurde als ein Gen identifiziert, das während der Apoptose induziert wird, aber das Protein scheint auch als Tumorsuppressor zu wirken. Die Überexpression in epidermalen Zelllinien verhinderte eine neoplastische Transformation und führte in Karzinoidzellen zu einer Zellproliferationshemmung. In humanen Tumoren scheint die Pdcd4 Expression invers mit der Dignität zu korrelieren. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von Pdcd4 auch vom Zelltyp abhängen kann. Es wäre daher von besonderem Interesse, ein in mehreren Zelltypen reguliertes Zielgen von Pdcd4 zu identifizieren. cDNA Analysen gaben erste Hinweise, dass ein derartiges Gen Angiopoietin2 sein könnte. Dabei führte in stabil transfizierten BON-1- und HCT116 Zellen die Ausschaltung von Pdcd4 zu einer Angiopoietin2 Steigerung. Angiopoietin2 spielt bei soliden Tumoren eine wichtige Rolle während der Gefäßneubildung.

Ziel dieser Arbeit ist die Regulation der Angiopoietin2 Spiegel durch Unterdrückung der Pdcd4 Expression in verschiedenen Zelltypen zu überprüfen und damit erstmals eine zelltypübergreifende Funktion von Pdcd4 zu belegen. Dabei sollen molekularbiologische Methoden wie Zelltransfektion, RNA-Isolierung, RT-PCR, Real-time PCR und Western Blot zum Einsatz kommen. Des Weiteren soll die funktionelle Bedeutung einer erhöhten Angiopoietin2 Expression mit zellbiologischen Mitteln wie Boyden Chamber Assay und Tube Formation Assay untersucht werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Firma
Acrylamid (Rotiphorese Gel)	Roth, Karlsruhe, GER
Agarose NuSieve For Routine Use	Biozym diagnostic, Hameln, GER
APS (Ammoniumpersulfat)	Serva Heidelberg, GER
Borsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumdihydrophosphat	Merck, Darmstadt, GER
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe, GER
DTT (Dithiothreitol)	Serva Heidelberg, GER
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe, GER
Ethanol	Riedel-de Haen, Seelze, GER
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol	Merck, Darmstadt, GER
Glycin	Riedel-de Haen, Seelze, GER
H ₂ O bidest	Fresenius Kabi, Bad Homburg, GER
HCl	Merck, Darmstadt, GER
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, GER
Kaliumdihydrophosphat	Merck, Darmstadt, GER
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, GER
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, GER

N,N'-Methylenbisacrylamid	Amersham Biosciences AB, SW
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, GER
Natriumcarbonat	Riedel-de Haen, Seelze, GER
Natriumchlorid	Riedel-de Haen, Seelze, GER
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, GER
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natrium-Pyrophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Roth, Karlsruhe, GER
Natronlauge	Merck, Darmstadt, GER
Ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt, GER
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe, GER
Tris-Base	Roth, Karlsruhe, GER
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, GER
Triton-X 100	Boehringer Mannheim, GER

2.1.2 Einwegartikel

Material	Firma
Pipetten (2ml, 5ml, 10ml)	NUNC, Roskilde, DEN
Pipettenspitzen (1 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Eppendorf, Hamburg, GER
Eppendorfreaktionsgefäße (0,5ml, 1,5 ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg, GER
Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ² , 162cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, GER
6-well Platten	NUNC, Roskilde, DEN
24-well Platten	Falcon - Becton Dickinson Labware, USA
96-well Platten	NUNC, Roskilde, DEN

15ml Röhren	Sarstedt, Nümbrecht, GER
50ml Röhren	Greiner Bio-One, Frickenhausen, GER

2.1.3 Substanzen und Lösungen der Versuche

2.1.3.1 Zellkultur

Kulturmedium (bezogen auf 500ml)

HT-29-, PA-Tu-8988T-, Panc-,
Imim PC1-, Capan-1-, PSC-,
MDA435/231-Zellen:

DMEM – High Glucose (4,5g/l)
with L-Glutamine
(PAA Laboratories, Pasching,
Austria)

10 % FBS

(PAA Laboratories, Pasching,
Austria)

2,5ml Gentamicin (10mg/ml)
(PAA Laboratories, Linz, CH)

HEK-293 Zellen:

DMEM – Ham's F-12
with L-Glutamine

(PAA Laboratories, Pasching,
Austria)

10 % FBS

2,5ml Gentamicin (10mg/ml)

MCF-7 Zellen:

RPMI 1640 with L-Glutamine
(PAA Laboratories, Pasching,
Austria)

10% FBS

2,5ml Gentamicin (10mg/ml)

5ml 1mmol Natriumpyruvat

	(Cambrex Bio Sciences, Verviers, Belgien)
	5ml MEM – Nicht essentielle Aminosäuren (100x)
	(Invitrogen, Carlsbad, USA)
	Insulin (10µg/ml) bei 1,4mg/ 1ml
HMEC-1 Zellen:	DMEM – High Glucose (4,5g/l) with L-Glutamine
	10% FBS (oder 1% FBS)
	2,5ml Gentamicin (10mg/ml)
	5ml 1mmol Natriumpyruvat
Hep G2 Zellen:	RPMI 1640 with L-Glutamine
	10% FBS
	2,5ml Gentamicin (10mg/ml)
Dulbecco's PBS (1x) without Ca ²⁺ + Mg ²⁺ :	(PAA Laboratories, Pasching, Austria)
Trypsin EDTA:	(PAA Laboratories, Pasching, Austria)
Einfriermedium:	1 : 10 Verdünnung von DMSO in FBS

2.1.3.2 Transiente Transfektion

Spezifisches Kulturmedium:	siehe oben Zellkultur
siRNA Pdc4:	10µM (Qiagen, Hilden, GER)
siRNA Mock:	10µM (Qiagen, Hilden, GER)
OptiMEM:	(serumfreies Medium Fa. GIBCO, Eggenstein-Leopoldshafen, GER)
siLentFect Lipid Reagent:	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)

2.1.3.3 Gesamtproteinextrakt (GPE)

Puffer für Gesamtproteinextrakt:	1ml PBS 1µl EDTA 0,5M 10µl Phosphataseinhibitor (100fach konzentriert)
Optional:	20µl/ ml Na-Vanadat 100mM 10µl/ ml PMSF 100mM 25µl/ ml Na-Pyrophosphat 100mM 50µl/ ml Na-Fluorid 1M
Dulbecco's PBS (1x) without Ca ²⁺ + Mg ²⁺ :	(PAA Laboratories, Pasching, Austria)
Standardlösung/	1ml Bradfordlösung + 4ml H ₂ O bidest
Protein-Assay Lösung:	(Bio-Rad Laboratories, München, GER)
BSA:	(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

2.1.3.4 RNA Isolation

Dulbecco's PBS (1x) without Ca ²⁺ + Mg ²⁺ :	(PAA Laboratories, Pasching, Austria)
Zelllyse:	1ml RTL Puffer + 10µl β-Mercaptoethanol
RNeasy® Spin Column Purification Kit (Qiagen, Hilden, GER):	RW1, RPE und RTL Puffer RNase – freies Wasser
TE-Puffer:	20mM Tris-HCl pH 7,5 einstellen 1mM EDTA
70% und 100% Ethanol:	(Riedel-de Haen, Seelze, GER)
3M Natriumacetat	(Merck, Darmstadt, GER)

2.1.3.5 Western Blot

4 x SDS Probenpuffer pH 6,8:	2ml 1M Tris-HCl pH 6,8 0,8g 10% SDS 4ml Glycerol 1 Tropfen Bromphenolblau auf 7ml mit H ₂ O bidest auffüllen
- im Verhältnis 3:2 mit 1M DTT mischen und Lämmli-puffer zu jeweils 30% auf die Proben verteilen	
SDS-Laufpuffer (10fach konzentriert):	250mM Tris-Base 1,92M Glycin 1% SDS
SDS-Laufpuffer (einfach konzentriert):	100ml 10fach konz. SDS-Laufpuffer ad 1l H ₂ O bidest
Blotting Puffer (10fach konzentriert): (10 x Transferpuffer)	1,92M Glycin 250mM Tris-Base pH 8,2 ad 1l H ₂ O bidest
Blotting Puffer (1fach konzentriert): (1 x Transferpuffer)	100ml 10fach konzentrierte Lösung 200ml 100% Methanol ad 1l H ₂ O bidest
10 x TBS:	1,5M NaCl 0,1M Tris-Base pH 7,5 ad 1l H ₂ O bidest
TBST:	100ml 10x TBS 5ml Triton-X-100 20% Lösung ad 1l H ₂ O bidest
Blocking Puffer:	2,5g Magermilchpulver 50ml TBST
Ponceau S:	(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Prestained Protein Marker:	Broad Range 6-175kDa (BioLabs, Beverly, USA)

<u>Sammelgel</u>	<u>Trenngel</u>
280µl 1M Tris-HCl pH 6,8	4ml 1M Tris-HCl pH 8,8
220µl 30% Acrylamid	4ml 30% Acrylamid
1,5ml H ₂ O bidest	2ml H ₂ O bidest
8µl 10% SDS	80µl 10% SDS
4µl TEMED	10µl TEMED
40µl 10% APS	100µl 10% APS

Tabelle 2.1.1: Gelzusammensetzung für 12%iges Gel (Proteine von 30-150kDa Größe)

<u>Erstantikörper</u>			<u>Zweitantikörper</u>		
<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>
Pdcd4	PSL (Heidelberg, GER)	1:400	Anti- rabbit IgG	Cell Signaling (Biolabs, Hitchin, UK)	1:10000
Ang2	Alpha Diagnostik (San Antonio, USA)	1:400	Anti- rabbit IgG	Cell Signaling	1:10000
Aktin- HRP	Santa Cruz (Heidelberg, GER)	1:5000	entfällt		

Tabelle 2.1.2: Verwendete Antikörper

ECL Advanced Western Blotting-

ECL Plus Western Blotting-

ECL Western Blotting-

Detection Reagents:

(GE Healthcare, Buckinghamshire,
UK)

2.1.3.6 Semiquantitative RT-PCR

RNase freies Wasser
RNase Inhibitor
dNTP Mix, 10mM jedes dNTP
5 x Qiagen OneStep RT-PCR Puffer
Qiagen OneStep RT-PCR Enzym Mix
6 x Loading Dye

Tabelle 2.1.3: OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, GER)

Standard 100bp ladder:	(Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK)
Primer: (Sequenzen siehe Methoden)	Aktin 10pmol/ μ l (Life Technologies Gibco BRL, Gaithersburg, USA) Ang2 10pmol/ μ l (metabion, Martinsried, GER)
5 x TBE Puffer pH 8,0:	54g Tris-Base 27,5g Borsäure 20ml 0,5M EDTA ad 1l H ₂ O bidest
TBE Puffer:	Rotiphorese 10 x TBE (Roth, Karlsruhe, GER)
0,5 x TBE:	50ml 5 x TBE ad 0,5l H ₂ O bidest
Agarose Gel:	0,35 – 0,4 g (~1,5%) Agarose in 25ml 0,5 x TBE + 2 μ l Ethidiumbromid

2.1.3.7 Real Time PCR

10 x Buffer RT
dNTP Mix (5mM je dNTP)
Omniscript RT
RNase freies Wasser

Tabelle 2.1.4: Omniscript Reverse Transcriptase For First-strand cDNA synthesis (Qiagen, Hilden, GER)

Oligo-dT primer (10 μ M): (Applied Biosystems/ Ambion, Auston, USA)

RNase Inhibitor (10 units/ μ l): (Applied Biosystems/ Ambion, Auston, USA)

DNA Polymerase I (E.coli)	Fermentas, St. Leon-Rot, GER
dNTP Mix (2,5mM je NTP)	Applied Biosystems/ Ambion, Auston, USA
10 x Puffer Polymerase I	Fermentas, St. Leon-Rot, GER
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden, GER

Tabelle 2.1.5: Ds cDNA – Synthese

Aufreinigung der ds cDNA mit MinElute-

Clean up reaction Kit (Qiagen, Hilden, GER): ERC-Puffer
PE-Puffer
EB-Puffer

RTD – PCR

Primer: Ang2 10pmol/ μ l
(Sequenzen siehe Methoden) (biomers.net, Ulm, GER)
XS13 10pmol/ μ l
(biomers.net, Ulm, GER)

Power SYBR® Green PCR Mastermix: (Applied Biosystems, Warrington, UK)

RNase freies Wasser: (Qiagen, Hilden, GER)

2.1.3.8 Tube Formation Assay

HMEC-1 Zellen in Kultur und dazugehöriges Medium mit 1% und 10% FBS siehe 2.3.1
Growth Factor Reduced BD Matrigel™ Matrix (BD Biosciences, Bedford, UK)
Konditioniertes Medium von BON-1- und HCT-Zellen, stabil transfiziert mit shPdcd4
Rekombinantes Ang2 (biomol, Hamburg, GER)

2.1.3.9 Boyden Chamber Assay

HMEC-1 Zellen in Kultur und dazugehöriges Medium mit 1% und 10% FBS siehe 2.3.1
Konditioniertes Medium von BON-1- und HCT-Zellen, stabil transfiziert mit shPdcd4
24-well Platte mit passenden Inserts (Falcon - Becton Dickinson
Labware, USA)
Methanol 100% (Merck, Darmstadt, GER)
Crystal – Violet Pulver (Serva, Heidelberg, GER)
in Lösung (0,2% / 20% Methanol)
Dulbecco's PBS (1x) without Ca²⁺ + Mg²⁺: (PAA Laboratories, Pasching,
Austria)
H₂O bidest (Fresenius Kabi, Bad Homburg,
GER)

2.1.3.10 Cell Invasion Assay

HMEC-1 Zellen in Kultur und dazugehöriges Medium mit 1% und 10% FBS siehe 2.3.1
Growth Factor Reduced BD Matrigel™ Matrix (BD Biosciences, Bedford, UK)
Konditioniertes Medium von BON-1- und HCT-Zellen, stabil transfiziert mit shPdcd4
24-well Platte mit passenden Inserts (Falcon - Becton Dickinson
Labware, USA)

Methanol 100%	(Merck, Darmstadt, GER)
Crystal – Violet Pulver in Lösung (0,2% / 20% Methanol)	(Serva, Heidelberg, GER)
Dulbecco's PBS (1x) without Ca^{2+} + Mg^{2+} :	(PAA Laboratories, Pasching, Austria)
H ₂ O bidest	(Fresenius Kabi, Bad Homburg, GER)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Zellen

2.2.1.1 Zelllinien

Name	Tumor	Erscheinungsbild
Imim PC1	Adenokarzinom des Pankreas	Epithelial
HT 29	Adenokarzinom des Colons	Epithelial
Hek 293	Embryonale Niere	Epithelial
Panc	Adenokarzinom des Pankreas	Epithelial
Capan-1	Lebermetastase eines Pankreas-Adenokarzinoms	Epithelial
PA-Tu-8988T	Lebermetastase eines Pankreas-Adenokarzinoms	Epithelial
MDA-231	Duktales Adenokarzinom der Brust, (Malignes Melanom bei MDA-435?)	Epithelial
MDA-435		
MCF-7	Duktales Adenokarzinom der Brust	Epithelial
Hep G2	Hepatozelluläres Karzinom	Epithelial
PSC	(Myo)-Fibroblasten ähnliche Zellen im Pankreasgewebe	
HMEC-1	<u>immortalisierte</u> humane mikrovaskuläre endotheliale Zelllinie	

Tabelle 2.2.1: Tumorzelllinien

2.2.1.2 Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Inkubatoren (Heraeus, Hanau, GER) bei 37°C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Als Standardmedium wurde für die HEK-Zellen DMEM – Ham’s F-12 with L-Glutamine, für die MCF-7- und Hep

G2 Zellen RPMI 1640 with L-Glutamine, (zusätzlich 5ml 1mmol Natriumpyruvat, 5ml MEM, Insulin 10µg/ml für das MCF-7 Medium), für die HMEC-1 Zellen DMEM – High Glucose (4,5g/l) with L-Glutamine (zusätzlich 5ml 1mmol Natriumpyruvat) und für die 8988T-, HT-29-, Imim PC1-, Capan 1-,Panc-, MDA-435/231-Zellen und PSCs DMEM – High Glucose (4,5g/l) with L-Glutamine benutzt, alle Kulturmedien versetzt mit 10% fötalem Kälberserum (FBS) und 2,5ml Gentamicin (10mg/ml). Die Kulturmedien wurden zusammen mit dem Trypsin EDTA bei 4°C in einem Kühlschrank und das PBS bei Raumtemperatur gelagert. Außerdem ist vor jeder Zellkulturarbeit das Kulturmedium und das Trypsin EDTA in einem GFL 1083 Wasserbad (GFL, Burgwedel, GER) bei 37°C aufgewärmt worden. Die Handhabung der Zellen erfolgte unter einer sterilen Arbeitsbank (Heraeus, Hanau, GER oder Telstar-Prettl Typ Bio-II-A, Pfullingen, GER), die jeweils vor und nach der Zellkulturarbeit mit sterilen Lösungen, sterilem Arbeitsmaterial sowie unter Benutzung von Einmalhandschuhen (Nobaglove-Latex puderfrei, Danz GmbH und Co KG, Wetter, GER) desinfiziert wurde. Als Kulturgefäße wurden Einweg-Zellkulturflaschen (Greiner Bio-one, Frickenhausen, GER) verwendet.

2.2.1.3 Passagieren der Zellen (bezogen auf eine mittlere Kulturflasche 75cm²)

Um eine möglichst konstante, semikonfluente Zelldichte über die Zeit zu gewährleisten und um bei steigender Zellvermehrung eine Kontaktinhibition der Zellen untereinander mit der Folge eines Zellzyklusarrestes zu verhindern, wurden die Zellen bei ca. 80%iger Konfluenz subkultiviert. Hierzu wurde das Zellkulturmedium steril abgesaugt und die Zellen danach mit 5ml Dulbecco's PBS (1x) without Ca²⁺ + Mg²⁺ gewaschen, um Reste von FBS, welches stark albuminhaltig ist und damit die Loslösung der Zellen vom Flaschenboden unter Trypsin erschwert hätte, wegzuspülen. Nach dem Absaugen des PBS erfolgte dann die Zugabe von 2ml Trypsin EDTA, welches ca. 2min bei 37°C mit den Zellen im Brutschrank inkubierte. Anschließend wurden die Zellen durch Klopfen von der Kulturflasche gelöst und mit 10ml Kulturmedium suspendiert, um Zellklumpen zu vermeiden und um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellsuspension wurde dann in 15ml Rörchen überführt. Das Zentrifugieren der Zellen erfolgte in einer Tischzentrifuge (Herolab, Wiesloch, GER) für 3min bei 1200rpm. Danach wurde der Überstand

abgesaugt, das Zellpellet je nach gewünschter Dichte mit Standardmedium 1:2 –1:10 resuspendiert und davon 1-2ml in eine mit 10-12ml Kulturmedium gefüllte mittlere Zellkulturflasche gegeben.

Es erfolgte auch unabhängig von der Konfluenz der Zellen entweder einmal die Woche oder im Falle eines schnellen Mediumverbrauchs (pH Umschlag) ein Mediumwechsel. Dabei wurde das alte Kulturmedium steril abgesaugt und frisches zugesetzt.

2.2.1.4 Kryokonservierung der Zellen

Die Tiefkühlkonservierung von Zellkulturen ermöglicht eine Langzeitlagerung von Zellen oder Zelllinien unter Erhalt ihrer spezifischen Merkmale und Eigenschaften. Wesentliches Ziel der Kryokonservierung besteht darin, ungewollte Veränderungen, insbesondere Differenzierung oder Dedifferenzierung, den Verlust von Syntheseleistungen während fortlaufender Zellkultur zu verhindern und jederzeit auf genügend Zellen zurückgreifen zu können. Hierzu wurden die Zellen wie unter 2.2.1.3 beschrieben mit Trypsin EDTA gelöst und durch 3minütiges Zentrifugieren bei 1200rpm ein Zellpellet gewonnen. Dieses wurde dann in FBS mit 10% DMSO resuspendiert und jeweils 1ml hiervon in Kryotubes (Nunc, Roskilde, DK) gefüllt. DMSO ist eine kryoprotektive Substanz, verhindert die Dehydratation des Zytoplasmas und die Kristallwasserbildung und damit die Schädigung der Zellmembran. Das Einfrieren der Kryotubes erfolgte nach einem speziellen Schema:

30min in einem 3*Gefrierfach	Liebherr, Ochsenhausen, GER
24h bei -20°C	
24h bei -80°C	
Langzeitaufbewahrung bei -180°C in flüssigen Stickstoff	

Tabelle 2.2.2: Langzeitaufbewahrung von Zellen in Kultur

2.2.1.5 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden diese aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und ca. 2-3min bei 37°C im Wasserbad unter Schwenken erwärmt. Beim Auftauen der Zellen wurde das angetaute Einfriermedium schnell in eine Kulturflasche überführt und mit Medium verdünnt. Die rasche Verdünnung ist aufgrund der zelltoxischen Wirkung des DMSO notwendig. Um die abgestorbenen Zellen zu entfernen wurde das Medium nach 24h gewechselt. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte wie unter 2.2.1.2 beschrieben.

2.2.2 Transiente Transfektion

Einen Tag vor der transienten Transfektion wurden die Zellen wie unter 2.2.1.3 beschrieben passagiert. Zusätzlich erfolgte die Verdünnung von 1ml der übrig gebliebenen Zellsuspension mit 4ml Kulturmedium. In 4 wells der 6-well Platte wurden schließlich 3ml frisches Medium und 1ml der verdünnten Zellsuspension hinzupipettiert, da jeweils 2 wells Kontrolle (Mock siRNA, Qiagen, Hilden, GER) und 2 wells Probe (siPdcd4, Qiagen, Hilden, GER) darstellten. Die Zellen in der 6-well Platte sollten am nächsten Tag ungefähr eine Konfluenz von 50-70% haben. Dazu wurden sie bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag, ungefähr eine Stunde vor der transienten Transfektion, wurde das alte Medium sorgfältig abgesaugt und 1,5ml neues Medium zugesetzt. Für jedes transfizierte well wurden zuerst 150µl serumfreies Medium (OptiMEM, Fa. GIBCO, Eggenstein – Leopoldshafen, GER) mit 3µl siLentFect (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) in ein 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß und 150µl serumfreies Medium mit 3,6µl 10µM siRNA (Mock oder siPdcd4) in ein anderes Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. 4 wells ergaben dann insgesamt 600µl serumfreies Medium mit 12µl siLentFect sowie jeweils 300µl serumfreies Medium mit 7,2µl Mock siRNA (Kontrolle) und 300µl serumfreies Medium mit 7,2µl siPdcd4 in separaten 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäßen. Danach wurde jeweils 300µl des serumfreien Mediums mit siLentFect auf die siRNA Gefäße verteilt und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gemischt. Die Lösungen

inkubierten dann bei Raumtemperatur ungefähr 20min. Schließlich wurde jeweils 300µl der Lösung für Mock siRNA oder siPdc4 in die gekennzeichneten wells überführt. Es lag nun pro well, welches ungefähr 2ml Medium besaß, eine siRNA Konzentration von 20nM vor. Die 6-well Platte wurde in der Regel 48h im Inkubator inkubiert, bis die Zellen eine Konfluenz von >80% hatten. Einzelne Zelllinien, wie z.B. Capan1 – Zellen, die sehr langsam gewachsen sind, wurden auch bis zu 72h inkubiert.

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Gesamtproteinextrakte

Die hergestellten Gesamtproteinextrakte dienten in erster Linie der Analyse von Proteinen im Western-Blot. Zunächst wurde den transfizierten Zellen (ein well Mock siRNA und ein well siPdc4) nach entsprechend langer Inkubationszeit und hoher Konfluenz das Kulturmedium entfernt. Danach wurden die Zellen einmal mit 1ml PBS gewaschen und nach nochmaliger Zugabe von 1ml PBS mit einem „rubber police man“ (steriler Zellschaber 28cm Länge, Greiner Bio-One, Frickenhausen, GER) von der 6-well Platte gelöst und in ein 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Es folgte nun das Zentrifugieren (Micro β, Herolab, Wiesloch, GER) der Zellsuspension von max. 1min und daraufhin das Abziehen der PBS Lösung unter Erhalt des entstandenen Zellpellets. Je nach Größe des gewonnenen Zellpellet erfolgte dann die Resuspension mit 40-100µl Extrakt-puffer (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.3.3 Gesamtproteinextrakt). Die Eppendorfreaktionsgefäße wurden von nun an auf Eis gelagert. Um die intrazellulären Proteine der Zellen freizusetzen, erfolgte nun mittels eines Labsonic Ultraschallgerätes (B. Braun, Melsungen, GER) je nach Größe des Zellpellets die Zelllyse für 2-4 x 0,5sec. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate wurde der BioRad-Protein-Assay (Bio-Rad Laboratories, München, GER) angewendet und dabei die Protein-Assay Lösung 1:5 verdünnt (1ml Bradfordlösung + 4ml H₂O bidest). Der Bio-Rad-Protein-Assay fand als Doppelbestimmung statt, d.h., es wurde sowohl für den Leerwert als auch für den BSA-Standard, die Kontrollen oder Proben immer in 2 wells der 96-well Platte

150µl oder 200µl pipettiert und dazu 1µl des entsprechenden Proteingemisches. Der BSA-Standard (Sigma, St. Luis, USA) mit den Konzentrationen 1µg/ µl, 2µg/ µl und 4 µg/ µl sollte dazu dienen, eine Eichkurve zu erstellen, mit deren Hilfe die Proteinkonzentrationen der Proben abgelesen werden konnte. Die Absorption dieser Lösungen wurde bei 570nm in einem Photometer (MRX, Microplate Reader, Dynatech Laboratories Limited, West Sussex, GB) gemessen.

Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung wurden nun die Zelllysate mit Lämmli-puffer (4 x SDS Probenpuffer pH 6,8/ 1M DTT im Verhältnis 3:2) und H₂O bidest versetzt. Dabei war das Maximalvolumen der Lösung 100µl, wobei 30µl davon immer auf den Lämmli-puffer entfielen. Die restlichen 70µl konnten bei geringen Proteinmengen der Zellen komplett mit Zelllysate verwendet oder mit H₂O bidest aufgefüllt werden. Danach wurden sowohl die nicht mit Probenpuffer versetzten als auch die mit Probenpuffer versetzten Zelllysate bei -20°C eingefroren.

Leerwert	Blank	Blank
1 µg/ µl Proteinstandard	0,072	0,070
2 µg/ µl Proteinstandard	0,120	0,104
4 µg/ µl Proteinstandard	0,192	0,196
Kontrolle (Mock)	0,190	0,180
Probe (siPdcd4)	0,179	0,180

Tabelle 2.2.3

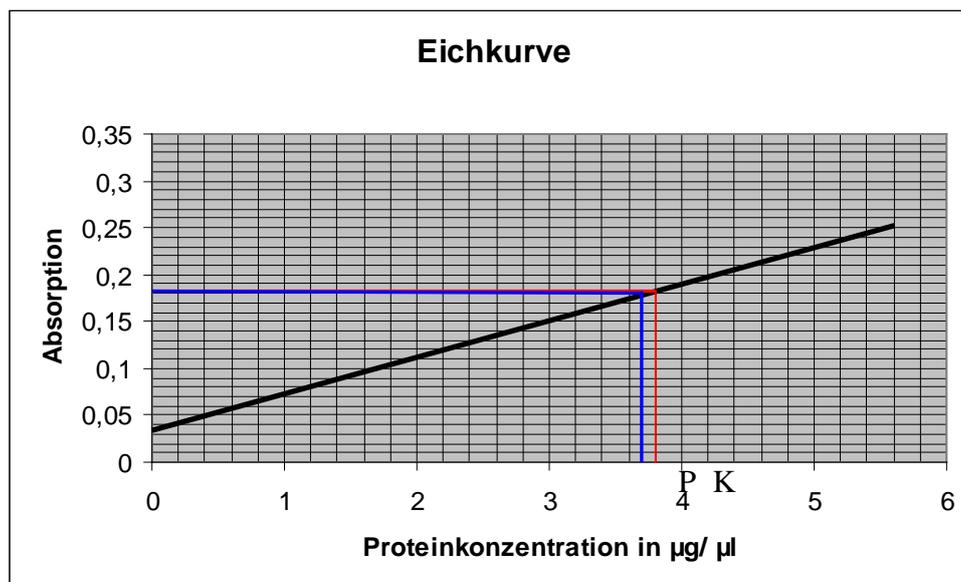


Tabelle 2.2.4

Beispiel einer am 26.2.2010 bei Hep G2 - Zellen durchgeführten Proteindoppelbestimmung mit Datentabelle (siehe Tabelle 2.2.3), dazugehöriger Eichkurve (Tabelle 2.2.4) und Ergebnissen der Probenkonzentrationen, wobei K für Mock transfizierte Zellen und P für siPdcd4 transfizierte Zellen steht. Die schwarze Linie entsteht durch Messen der Absorptionen der verschiedenen BSA-Standards (1,2 und 4µg/ µl) und deren Mittelung zu einer Geraden (Eichkurve). An dieser Gerade kann dann auch wieder durch Mittelung der gemessenen Absorptionen der Proben deren Proteinkonzentration abgelesen werden (P = 3,7µg/ µl und K = 3,8µg/ µl).

Unten aufgeführt ein Beispiel einer fertigen Auftragsprobe der oben bestimmtem Probenproteinmengen für den Western-Blot:

K 39,0µl	+ 30µl Lämmli Puffer	+ 31,0µl H ₂ O bidest	= 150,0µg/ 100µl
P 41,0µl	+ 30µl Lämmli Puffer	+ 29,0µl H ₂ O bidest	= 150,0µg/ 100µl

2.2.3.2 Western-Blot

Die Bezeichnung Western-Blot geht auf den Namen des Erfinders der Blotting Technik namens Edwin Southern zurück, der die Methode 1971 für die Auftrennung von DNA-Fragmenten und nachfolgender Hybridisierung als Southern Blotting eingeführt hat. In Anlehnung an seinen Namen wurde die entsprechende Auftrennung von RNA Fragmenten Northern Blotting und das Proteinblotting von W.N. Burnette als Western Blotting bezeichnet. Hierbei werden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Danach können die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden (eigentliches „Blotting“) und sind dadurch Antikörpern, Liganden oder Enzymsubstraten zugänglich. Damit erlaubt die Blotting-Technik eine qualitative und quantitative Bestimmung von Proteinen aus einem Proteingemisch.

2.2.3.2.1 Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels

Die Glasplatten, bestehend aus Rechteckplatte und „Öhrchen“ Platte, wurden in einem Gefüge mit 2 Spacern im Abstand von 1mm zusammengesetzt und die untere offene Seite mit einer Mischung aus 0,1g Agarose und SDS-Laufpuffer, welche erhitzt wurde, abgedichtet. Nun konnte das Glasgehäuse mit 2 Klammern und einer Plexiglasplatte als Gegenpart in dem dafür vorgesehenen Ständer mit 2 Klammern eingespannt werden.

Das Gel setzt sich aus zwei verschiedenen Abschnitten zusammen, dem sogenannten Sammelgel und dem eigentlichen Trenngel (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.3.5 Western-Blot Tabelle 2.1.1). Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit 70% Ethanol vorsichtig überschichtet, damit auch die äußerste Fläche polymerisiert. Nach der Polymerisation (~20min) erfolgte die Abschüttung des Ethanols, das Sammelgel wurde bei gleichzeitigem Einschub des Kamms, der für die Ausbildung der Probenauftragstaschen sorgte, darüber gegossen. Der Abstand zwischen Trenngel und Tasche betrug in der Regel zwischen 2-5mm. Falls das Gel an dem Tag der Herstellung nicht verwendet wurde, konnte es mit Haushaltsfolie und einem befeuchteten Tuch eingewickelt und im Kühlschrank einige Tage gelagert werden.

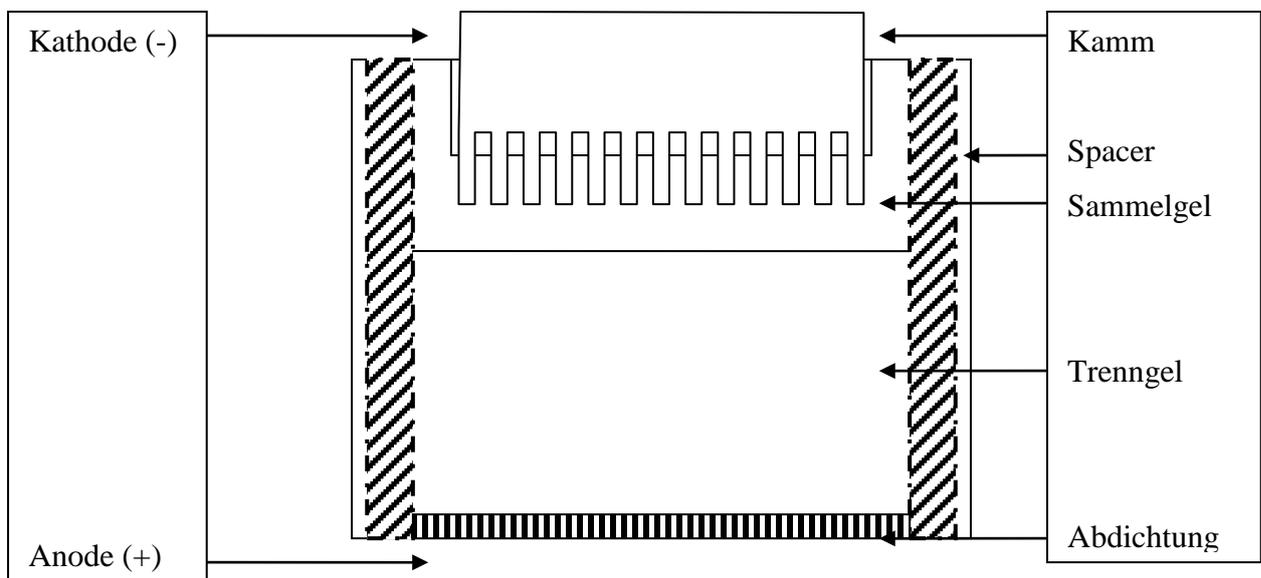


Abbildung 2.2.1: Gelzusammensetzung und Aufbau eines Western-Blot-Gels

2.2.3.2.2 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte in einem EC-Mini 120 vertical Gel System (BioRad, Hercules, USA). Je nach zu untersuchendem Protein wurden zwischen 5µg und 20µg Protein pro Tasche aufgetragen. Dabei wurden die schon nach dem Gesamtproteinextrakt hergestellten mit Lämmli-Puffer versetzten Proben 2-3min bei 95°C in einem Heizblock (Techne Dri-Block DB 2A, Cambridge, UK) denaturiert und darauf noch mal kurz zentrifugiert. In das EC-Mini 120 vertical Gel System wurde jetzt 1 x SDS-Elektrophoresepuffer bis zum Erreichen der Anodenelektrode des Gelständers gefüllt und dazu noch ~200ml des Puffers in den Gelständler selbst. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Bei zu großen Volumenunterschieden in den verschiedenen Geltaschen erfolgte die Auffüllung aller Taschen auf 20µl mit einer Mischung aus PBS und 4 x Ladepuffer und 1M DTT. Um später die korrekte Größe des zu untersuchenden Proteins nachvollziehen zu können, wurde bei jedem Gel ein Prestained Protein Marker (New England BioLabs, Beverly, USA) als Größenstandard mitgeführt. Der Gellauf erfolgte bis zum Ende des Sammelgels bei 21mA/ Gel (15min) und danach bei 33-40mA/ Gel (45-60min) bis zum unteren Ende des Trenngels.

Die Funktion von DTT besteht darin, vorhandene Disulfidbrücken zu reduzieren und Proteine zur Entfaltung zu bringen. Außerdem zerstört SDS, ein anionisches Detergenz, Sekundär- und Tertiärstrukturen von Proteinen. Die starke Bindung negativ geladener SDS-Moleküle an ein Proteinmolekül führt dazu, dass alle SDS-Protein-Komplexe negativ geladen sind und zur Anode wandern. Dadurch spielt der natürliche Ladungszustand eines Proteins keine Rolle mehr für seine Auftrennung.

2.2.3.2.3 Blotting

Nachdem das Gel durchgelaufen war, wurde mit einem Skalpell das Sammelgel vom Trenngel gelöst und entfernt. Das Trenngel hingegen wurde für 10min in 1 x Blotting Puffer (1 x Transferpuffer) gewaschen, um den restlichen Laufpuffer abzuspielen. Das Blotting erfolgte mit einem Trans-Blot[®] SD Semidry-Transfer Cell (BioRad, Hercules,

USA) für 1h bei $1,5\text{mA}/\text{cm}^2$ ($\sim 60\text{mA}$ pro Blot) auf eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von $0,45\mu\text{m}$ (Optitran BA-S 85, Schleicher und Schuell, Dassel, GER). Sowohl die Nitrocellulosemembran als auch das Blotpapier (Bio-Rad, Hercules, USA) wurde kurzzeitig in 1 x Blotting Puffer getränkt und dann wie folgt luftblasenfrei als Blot-Sandwich angeordnet:

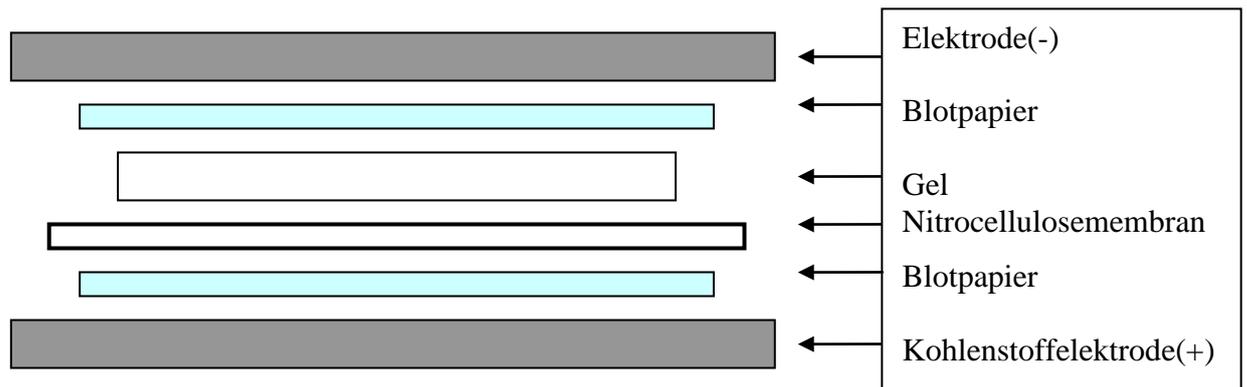


Abbildung 2.2.2: Zusammensetzung eines „Blot-Sandwichs“

Durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen bleiben die Proteine auf der Nitrocellulosemembran haften. Außerdem wird das im Gel erhaltene Trennmuster der Protein-Moleküle ebenfalls übertragen. Dieser Vorgang ist irreversibel.

2.2.3.2.4 Ponceau S-Färbung

Die Nitrocellulosemembran wurde nun für maximal 15min in Ponceau S (Sigma, St. Louis, USA) eingelegt und danach mehrmals mit H_2O bidest gewaschen. Ziel dieser reversiblen Färbung war es, erstens die aufgetragenen Proteinkonzentrationen zwischen Mock und siPdcd4 transfizierten Zellen zu vergleichen und zweitens auf Luftblasen aufmerksam zu werden, die unter Umständen die Qualität der Ergebnisse verschlechtern hätten.

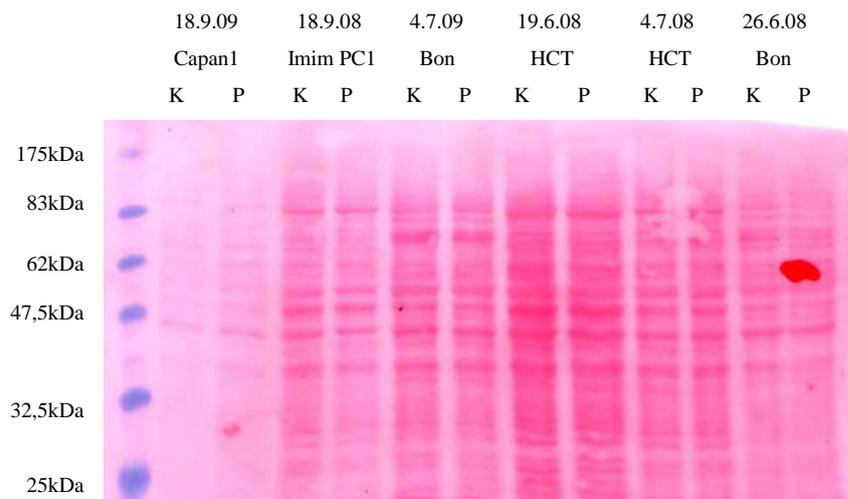


Abbildung 2.2.3: Ergebnis einer mit Ponceau S gefärbten Nitrocellulosemembran vom 2.8.08.

2.2.3.2.5 Detektion

Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers, der sonst jegliche Proteine binden würde, an die Membran zu verhindern, müssen freie Bindungsstellen der Membran vor der Antikörperbehandlung blockiert werden. Das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgt mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein (BSA, Milchpulver, Myoglobin oder Hämoglobin).

Zu diesem Zweck wurde die Membran 1h bei Raumtemperatur in 20ml Trockenmilch-Blockpuffer inkubiert, danach die Membran kurz mit TBST gewaschen und über Nacht bei 4°C auf einem Kippschüttler (PMR-30 Grant-Bio, Cambridgeshire, England) mit verdünntem Erstantikörper behandelt. Die Reihenfolge der Erstantikörpernutzung und deren Verdünnung gemäß den Herstellerangaben sind unter 2.1.3.5 Western-Blot Tabelle 2.1.2 zu finden.

Nun wurde die Nitrocellulosemembran 3 x 10min mit TBST gewaschen, um Reste des ungebundenen Erstantikörpers zu entfernen. Alle Waschvorgänge und Inkubationsvorgänge des Zweitantikörpers erfolgten auch unter Benutzung eines Kippschüttlers und bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte nun für 1h. Verwendet wurde ein Meerettich-Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in Trockenmilch-Blockpuffer. Vor

Zugabe des Peroxidase-Substrats wurde die Membran erneut 3 x 10min mit TBST gewaschen. Für die Pdc4 Erkennung wurde als Nachweis Detergenz das ECL Advanced Western Blotting Detection Kit verwendet und im Verhältnis 1:1, 1ml Lösung A zu 1ml Lösung B, gemischt. Bei Ang2 wurde das ECL Plus Detection Reagent benutzt, im Verhältnis 40:1 (2ml Lösung A und 50µl Lösung B). ECL Advanced ist im Vergleich zu ECL Plus sensitiver und erlaubt dadurch die Erkennung von 10mal niedrigeren Proteinkonzentrationen. Bei beiden Detergenzien erfolgte die Inkubation mit der Membran für 5min. Danach wurde die Membran abgetrocknet mit Softtüchern und in eine Kassette (Hypercassette, Fa. Amersham Biosciences, Freiburg, GER) gelegt. Das entstandene Chemilumineszenzsignal wurde mittels eines HyperfilmTM ECL Röntgenfilms (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) aufgenommen und in einer Entwicklermaschine (Curix 60, AGFA) entwickelt.

Nachdem Pdc4 und Ang2 detektiert wurden, erfolgte über Nacht die Inkubation der Membran mit dem HRP-konjugierten Aktin-Antikörper bei 4°C, im Falle eines Zeitmangels für 2h bei Raumtemperatur. Wiederum wurde danach die Membran 3 x 10min mit TBST gewaschen und diesmal für 1min mit der ECL Western Blotting Detection Reagents Lösung (1ml Lösung A und 1ml Lösung B) inkubiert. Die Signalerfassung erfolgte wie oben beschrieben. Aktin sollte als Kontrolle der aufgetragenen Proteinkonzentrationen dienen.

Normalerweise erfolgte die Detektion der 3 Proteine in 3 aufeinander folgenden Tagen. Wenn dies nicht möglich war wurde die Nitrocellulosemembran, nach Abschluss einer kompletten Antikörperbehandlung in TBST max. für 4 Tage bei 4°C aufbewahrt.

Es folgen in Abbildung 2.2.4 die Phasen des Blockens, die Antikörperbindung bis hin zur Detektion der Proteine.

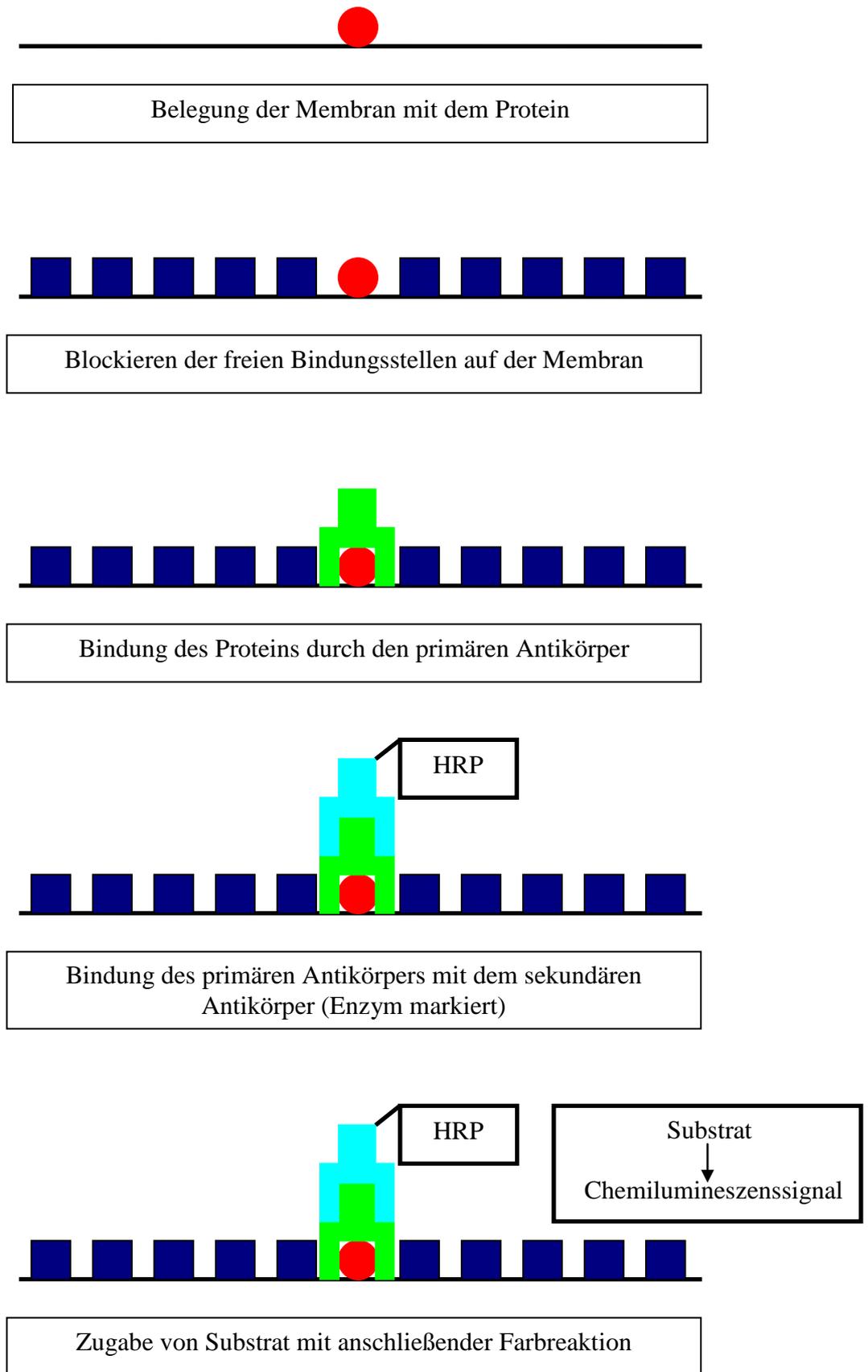


Abbildung 2.2.4

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung fand unter Anwendung des RNeasy[®] Spin Column Purification Kit (Qiagen, Hilden, GER) und unter Anleitung des RNeasy Mini Handbuches statt. Dabei wurde aus der 6-well Platte jeweils von einem Mock transfizierten well (Kontrolle) und einem siPdcd4 transfizierten well (Probe) bei entsprechender Konfluenz das Medium sorgfältig abgesaugt und danach die Zellen 2mal mit 1ml PBS vorsichtig gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von 350µl einer RTL-Puffer/ β-Mercaptoethanol Mischung, um die Zellen zu lysieren. Das Lysat konnte mit Hilfe eines „rubber police man“ von dem well gelöst und in eine QIA-Schredder-Säule pipettiert werden. Die Säule wurde für 2min bei 13000rpm zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus, Osterode, GER) und das homogenisierte Lysat mit 350µl 70%igen Ethanol vermischt. Die 700µl wurden in ein RNeasy mini column mit 2ml Sammelröhrchen überführt und dort für 15s bei 10000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss in dem 2ml Sammelröhrchen wurde entfernt. Nun folgte ein Waschschrift mit 700µl RW1 Puffer und 2 Waschschrift mit 500µl RPE Puffer jeweils bei 10000rpm für 15s, wobei nach der zweiten RPE Puffer Zugabe 2min bei 10000rpm zentrifugiert wurde. Dazwischen wurde einmal das Sammelröhrchen gewechselt und nach jedem Waschschrift der Durchfluss entfernt. Ziel dieser Waschungen war es eventuell vorhandene Kontaminationen der RNA mit DNA oder Proteinen zu entfernen. Vor der Zugabe von 30µl RNase freiem Wasser direkt auf die Silikanmembran und 1minütiger Zentrifugation bei 10000rpm in einem 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß ist das 2ml Sammelröhrchen nochmals gewechselt und das RNeasy mini column für 1min bei 13000rpm zentrifugiert worden, um letzte Pufferrückstände zu beseitigen. Dann wurde 2µl des RNA-Eluats mit 1ml TE-Puffer verdünnt und die Absorption in einer UV-Küvette mit einem Pharmacia GeneQuant RNA/DNA Calculator (LKB Biochrom, Cambridge, UK) bei 260nm gemessen.

	Absorption	Odds Ratio	RNA $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$	RNA $\mu\text{l}/\mu\text{l}$
Kontrolle	0,048	1,581	1,92	0,96
Probe	0,049	1,500	1,96	0,98

Tabelle 2.2.5: RNA-Isolierung vom 28.10.08 von HT-29 Zellen

Die Gesamt-RNA-Konzentration errechnete sich aus der Formel:

$$c[\text{RNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = 40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$10\text{D} \triangleq 40\mu\text{g RNA}/\text{ml}$$

Danach ist das RNA-Eluat mit 75 μl 100%igen Ethanol und 3 μl 3M Natriumacetat versetzt und bei -20°C gelagert worden. Mit dem 100%igen Ethanol wurde die RNA gefällt und damit vor Enzymen, Proteinen oder RNasen geschützt.

2.2.4.2 PCR und RT-PCR

1984 entwickelte Kary Banks Mullis eine raffinierte Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Man bezeichnet das Verfahren als Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR). Bei der PCR wird eine DNA-Probe in Einzelstränge getrennt und mit DNA-Polymerase, dNTPs und zwei Oligonucleotid-Primern inkubiert, deren Sequenzen das gewünschte DNA-Segment flankieren. Die Primer steuern die DNA-Polymerase so, dass sie komplementäre Stränge der gewünschten DNA synthetisiert. Dadurch ist es möglich, die Ziel-DNA exponentiell zu amplifizieren.

Eine PCR besteht aus drei Schritten (ein kompletter Zyklus), die in einem Thermocycler stattfinden:

1. Denaturierung: Die Matrizen-DNA wird durch Erhitzen auf 95°C in Einzelstränge aufgetrennt.
2. Annealing (Hybridisierung der Primer): Die Primer lagern sich durch Abkühlung der Lösung auf Temperaturen zwischen 40-70°C an den

komplementären Einzelstrang an. Die optimale Temperatur hängt von verschiedenen Faktoren ab, z.B. Primerlänge und deren Basenzusammensetzung.

3. Elongation (DNA-Synthese): Anschließend wird die Lösung auf 72°C erhitzt, die optimale Temperatur für die Taq-Polymerase (hitzestabiles Enzym aus *Thermus aquaticus*, 1988 von Saiki et al. etabliert) und die DNA-Synthese erfolgt von 5' nach 3'.

Im Anschluss an die Elongationsphase wird die Reaktion wieder auf die Denaturierungstemperatur erhitzt und ein neuer Zyklus beginnt. Die Anzahl der Zyklen richtet sich hauptsächlich nach der Ausgangskonzentration der Matrizen-DNA.

Die RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) ist prinzipiell eine Amplifikation von RNA-Sequenzen (Veres et al. 1987). Da jedoch RNA nicht als Matrize für die üblichen PCR-Polymerasen dient, wird der PCR eine reverse Transkription vorangestellt. Das Enzym Reverse Transkriptase synthetisiert einen DNA-Strang komplementär zu einer RNA-Matrize. Hierbei kann durch ein Oligo-DT Primer, welcher an den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende hybridisiert, mRNA transkribiert werden. Spezifische Primer werden eingesetzt um gezielt ein Genprodukt zu isolieren. Durch spezifische Primer werden statistisch mehr cDNA-Fragmente eines bestimmten Gens synthetisiert, was zur Erhöhung der Ausbeute führt. Die produzierte Erststrang cDNA kann dann in einer anschließenden PCR, wie oben beschrieben, amplifiziert werden.

In unserem Fall wurde das OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, GER) mit dem dazugehörigen Handbuch verwendet. Dabei erfolgte zuerst die Isolierung von 1µg RNA der Proben. Dazu wurde das entsprechende Volumen für 1µg RNA in ein 0,5ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und 3min bei 10000rpm zentrifugiert. Die ausgefällte RNA setzte sich ab, sodass nun der Überstand entfernt werden konnte. Die Gefäße standen danach maximal 1min offen, damit Reste des Ethanol verdampfen konnten. Danach wurde die RNA in 10µl RNase freiem Wasser aufgenommen und auf Eis gestellt. Als nächstes erfolgte die Herstellung des Mastermix gemäß der Tabelle, angegeben für 2 Ansätze. Der Mastermix wurde in einem 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß hergestellt und von insgesamt 33µl Ansatz 15µl auf die Mock und siPdcd4 verdünnte RNA gegeben. Die für die Umschreibung von RNA zu cDNA verwendeten spezifischen Primer sind in der Tabelle 2.2.7 dargestellt:

Mastermix	
5 x Qiagen Onestep RT-PCR Puffer	10µl
dNTP Mix, 10mM jedes dNTP	2µl
RNase Inhibitor	1µl
Aktin Primer 10pmol/ µl, jeweils für sense und antisense	1µl
Ang2 Primer 10pmol/ µl, jeweils für sense und antisense	1µl
RNase freies Wasser	14µl
Qiagen Onestep RT-PCR Enzym Mix (beinhaltet Reverse Transkriptase und HotStarTaq DNA-Polymeras)	2µl

Tabelle 2.2.6

Primer	Sequenz 5' - 3'
Aktin – Sense	AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA CC
Aktin – Antisense	GAA GTC CAG GGC GAC GTA GCA C
Ang2 – Sense	GTC CAA TGC TGT GCA GAG GGA CG
Ang2 – Antisense	CTG ATT TAA TAC TTG GGC TTC CAC

Tabelle 2.2.7

Die reverse Transkription und die Amplifikation erfolgten in einem Thermocycler (Techne, Cambridge, UK) nach folgendem Programm:

Reverse Transkription	30min bei 50°C
Initial PCR Aktivierungsschritt	15min bei 95°C
3-step-PCR:	
Denaturierung	30sec bei 94°C
Annealing	30sec bei 57°C
Elongation	1min bei 72°C
Anzahl der Zyklen	40
Final extension	10min bei 72°C
	4°C nach abgelaufenen Programm

Tabelle 2.2.8

In dem ersten Reaktionschritt wird mittels der im Qiagen Onestep RT-PCR Enzym Mix enthaltenen Reversen Transkriptase und den zugegebenen Primern aus RNA cDNA synthetisiert. Bei diesem Vorgang ist die HotStarTaq Polymerase zunächst noch inaktiviert. Jedoch wird sie bei der Erwärmung auf 95°C aktiviert (Initial PCR Aktivierungsschritt), wobei nun die Reverse Transkriptase deaktiviert wird. Danach erfolgte die PCR wie oben beschrieben.

Während der Annealing-Phase wurde im Zyklus 30, 35 und 40 jeweils 5µl der Kontrolle und Probe für die spätere elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate entnommen.

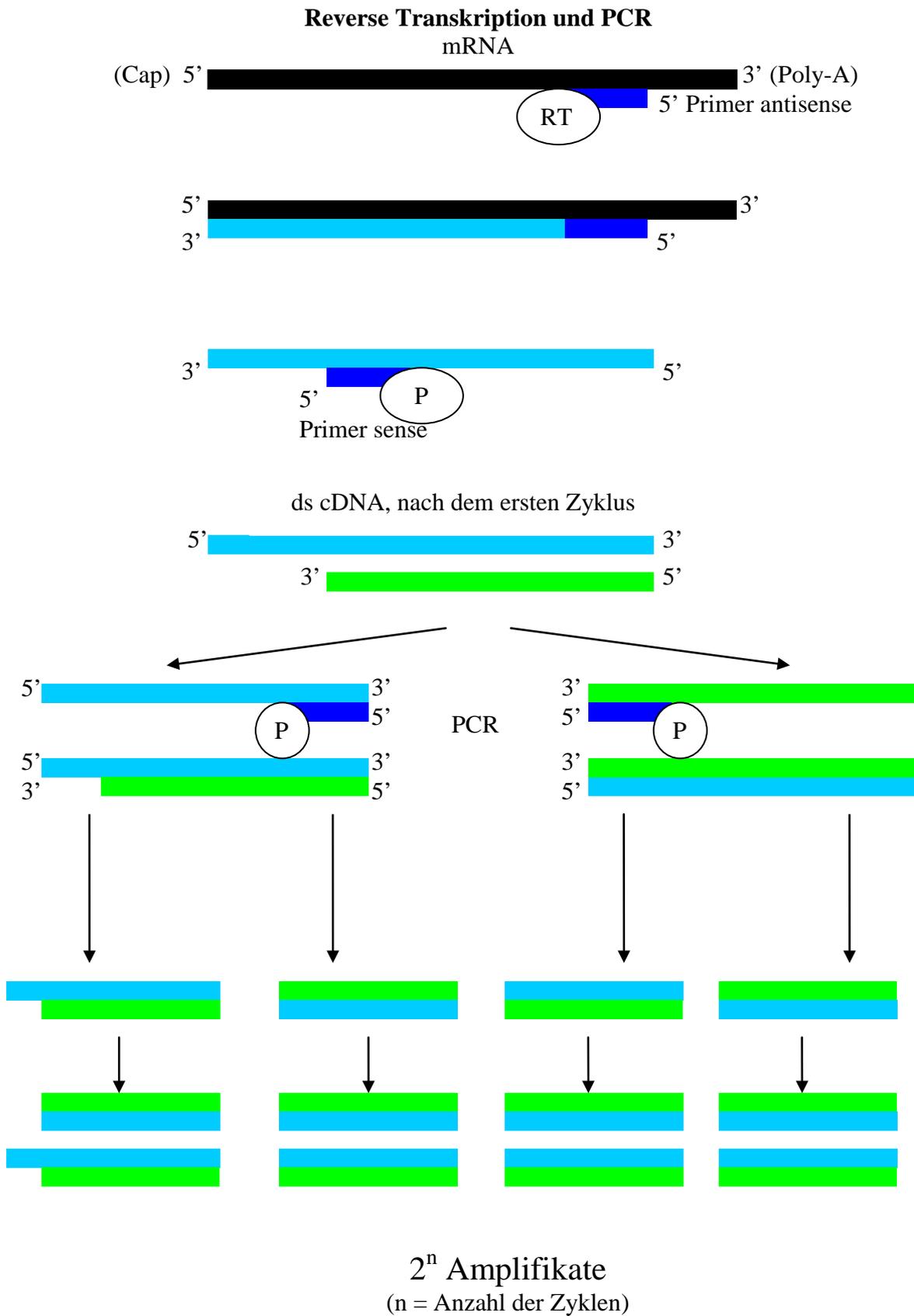


Abbildung 2.2.5: Beispiel einer RT-PCR mit anschließender PCR für ein Genprodukt.

2.2.4.2.1 Agarosegelherstellung und Gelelektrophorese

Zuerst erfolgte die Herstellung eines 1,5-2%igen Agarosegels. Dazu musste 25ml 0,5 x TBE Puffer (Zusammensetzung siehe 2.1.3.6 Semiquantitative RT-PCR) mit der entsprechenden Menge von Agarose 0,35-0,4g (Biozym diagnostic, Hameln, GER) vermischt und in einer Mikrowelle bei 95°C erhitzt werden, damit sich die Agarose löste. Die nun klare Lösung wurde mit 2µl Ethidiumbromid versetzt und in die Gelkammer gegossen. Dann erfolgte der Einschub des Kammes. Das Gel wurde bedeckt und zum Abkühlen der Agarose-Lösung in einen Kühlschrank gestellt.

Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren zwischen den Basen der DNA. Bei Anregung durch UV-Licht (260 – 360nm) bildet sich eine rot-orange Fluoreszenz aus und die DNA-Fragmente werden sichtbar gemacht. Die Lichtintensität verhält sich dabei proportional zur DNA-Konzentration und zur Länge der Nukleinsäuren.

In der Zwischenzeit wurden die gewonnenen Proben aus der PCR mit 1µl 6 x Loading Dye versetzt. Glycerin im Gelladepuffer sorgt dafür, dass die Proben in die Geltaschen des bereits im Elektrophoresepuffer befindlichen Gels absinken. Des Weiteren befinden sich die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol in dem Puffer. Die beiden Farbstoffe geben einen optischen Anhaltspunkt für das Fortschreiten der Gelelektrophorese. Als Standard, um zu schauen welche Größe die DNA-Fragmente haben, wurde ein Standard 100bp ladder (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) verwendet (3µl RNase freies Wasser, 2µl 100bp ladder und 1µl Loading Dye gemischt). Das abgekühlte und feste Agarosegel wurde nun in die Laufkammer (Micro Bio Tec Brand, Gießen, GER) gelegt und soviel 0,5 x TBE in die Kammer hinzugefügt bis das Gel bedeckt war und die Taschen sich füllten. Zuerst wurde 6µl des Standardgemisches in eine Tasche und danach wurden 6µl (1µl Loading Dye und 5µl Probe) der Proben, geordnet nach Zyklus und Mock und siPdc4, in die anderen Taschen pipettiert. Bis zur elektrophoretischen Auftrennung der beiden Farbstoffe lief das Gel bei 25mA, danach wurde die Stromstärke auf 30mA erhöht.

Die DNA-Fragmente wandern wegen ihrer negativen Phosphatgruppen zur positiv geladenen Anode. Dabei werden die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt, denn das Agarosegel besitzt je nach Agarosekonzentration bestimmte Porengrößen, die zu dem schon im Western Blot erwähnten Siebeffekt führen.

Die Gellaufzeit richtete sich nach der Laufweite des Bromphenolblau, welches das untere Ende des Gels erreichen sollte. Mittels eines Gel-Dokumentationssystems wurde

ein scharfes Bild der fluoreszierenden Banden eingestellt und ausgedruckt. Die Aktin-Bande sollte bei 332 bp und die Ang2 Bande bei 274 bp sichtbar werden.

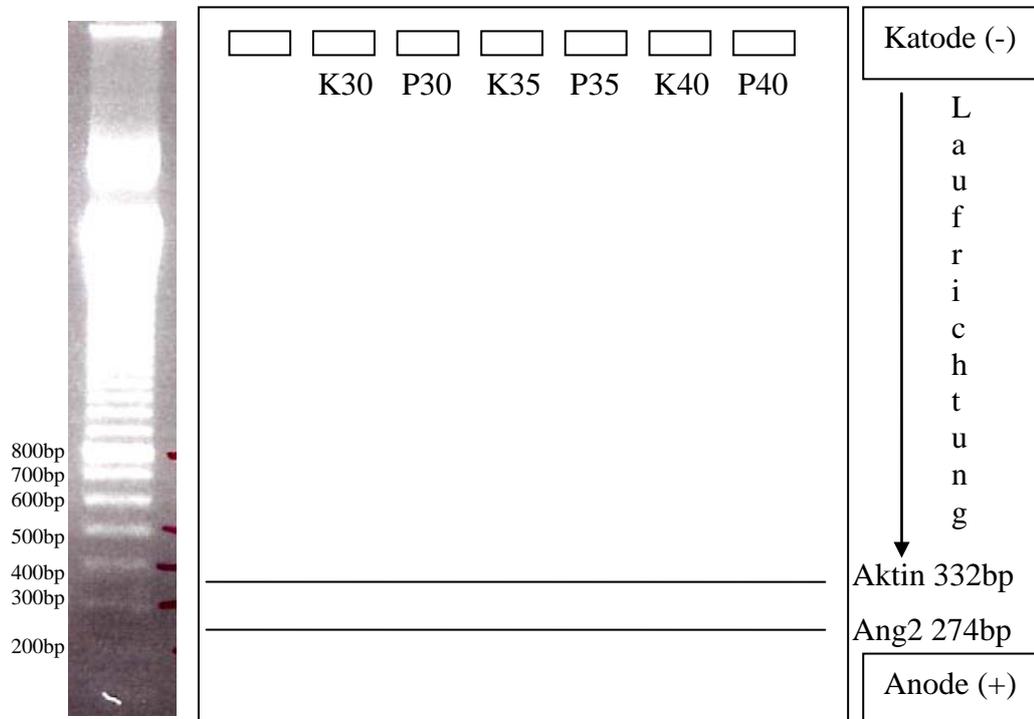


Abbildung 2.2.6: Aufbau eines Gels mit Standard und den erwarteten Banden Aktin und Angiopoietin2

2.2.4.3 Real-time detection PCR (RTD-PCR)

Die RTD-PCR erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR-Produkte über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Hierzu wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green (sequenzspezifische Signale) genutzt, der in doppelsträngige (ds) DNA interkaliert. Am Ende der Elongationsphase jedes PCR-Zyklus wird mittels lasergesteuerter Analyse der Fluoreszenzwerte des interkalierten SYBR-Greens bei einer Wellenlänge von 530nm gemessen. Sobald eine gewisse Anzahl an Kopien der DNA-Moleküle überschritten wird, kann entsprechend der PCR-Kinetik ein exponentieller Anstieg des Signals beobachtet werden (Exponentielle-Phase). Nach einer Übergangsphase (Lineare-Phase) nähert sich die Fluoreszenz einem Maximum an (Plateau-Phase). Dort ist die Menge an Ziel-DNA dann so stark

angestiegen, dass immer häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren und somit die PCR hemmen. Als Signalgrenzwert (engl.: threshold) wird ein Fluoreszenzwert definiert, der etwa der 10fachen Standardabweichung des Hintergrundsignals entspricht. Der Moment des Überschreitens des Signalgrenzwertes wird als Durchbruchzyklus CT (engl.: cycle threshold) bezeichnet. Für die relative Quantifizierung der Transkriptmenge wird der CT-Wert der Proben durch einen Abgleich mit dem CT-Wert eines Kontrolltranskripts (XS13) normalisiert.

Vorteile der Messung mit SYBR-Green sind die niedrigen Kosten sowie die hohe Empfindlichkeit. Ein Nachteil ist jedoch, dass jedes doppelsträngige PCR-Produkt Signale generiert. Dies führt dazu, dass auch ein unspezifisches Amplifikat detektiert werden kann und die Analyse ungenau wird. Mittels einer Schmelzkurvenanalyse kann dieser Nachteil ausgeglichen werden. Am Ende der PCR wird bei kontinuierlicher Fluoreszenzmessung die Temperatur langsam bis 95°C erhöht. Bei einer für das spezifische Amplifikat charakteristischen Schmelztemperatur wird der DNA-Doppelstrang denaturiert, wodurch SYBR-Green freigesetzt wird und eine Fluoreszenzabnahme registriert werden kann. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt aufweist als unspezifische Amplifikate, ist eine Unterscheidung möglich. Außerdem gibt die Höhe des Schmelzkurven-Peaks, verglichen mit mitgeführten Standards, annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments. (Beschreibung siehe unter www.bionity.com)

2.2.4.3.1 Einzelstrang cDNA Synthese

Für die durchzuführende RTD-PCR wurde in einem ersten Schritt die mRNA der isolierten Zelllinien in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Die Einzelstrang cDNA Synthese erfolgte unter Anleitung des Omniscript Reverse Transcription Handbuches. Allerdings wurde nicht das komplette Omniscript-Kit von Qiagen (Hilden, GER) verwendet, sondern nur der 10 x Buffer, die dNTPs und die Omniscript Reverse Transcriptase. Die Oligo(dt) Primer und der RNase Inhibitor waren von Ambion (Auston, USA) und wurden entsprechend ihrer Konzentration gemäß dem Qiagen Protokoll benutzt.

Nun erfolgte zuerst die Isolierung von 2 μ g RNA der Proben. Dazu wurde das entsprechende Volumen für 2 μ g RNA in ein 0,5ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und 3min bei 10000rpm zentrifugiert. Die ausgefällte RNA setzte sich ab und der Überstand konnte nun entfernt werden. Die Gefäße standen danach maximal 1min offen, damit Reste des Ethanol verdampfen konnten. Danach wurde die RNA in 14,9 μ l RNase freiem Wasser aufgenommen und auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Herstellung des Mastermix (siehe Tabelle 2.2.9) mit einem Endvolumen von 5,9 μ l. Zusammen mit der auf 14,9 μ l verdünnten RNA ergab sich ein Endvolumen von 20 μ l. Der Reaktionsansatz wurde dann für 2 Stunden bei 37°C in einem Heizblock inkubiert und konnte danach bei -20°C aufbewahrt werden.

Mastermix	Volumen	Finale Konzentration
10 x Buffer RT	2 μ l	1x
dNTP Mix (5mM je dNTP)	2 μ l	0,5mM
Oligo-dT primer	0,4 μ l	1 μ M
RNase Inhibitor (10 units/ μ l)	0,5 μ l	10units/ 20 μ l Reaktion
Omniscript RT	1 μ l	4units/ 20 μ l Reaktion

Tabelle 2.2.9

2.2.4.3.2 Ds cDNA Synthese

Für eine RTD-PCR kann sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige cDNA verwendet werden. Vorteile der ds cDNA sind, dass ein PCR Zyklus zusätzlich durch die Herstellung einer zweiten Matrize schon während der reversen Transkription gespart und eine bessere Qualität der Ergebnisse damit erreicht wird.

Zuerst wird wie unter 2.2.4.3.1 beschrieben einzelsträngige cDNA hergestellt, diese dann aber nicht eingefroren, sondern auf Eis gelagert. Die ds cDNA Synthese erfolgte in Anlehnung an das MessageAmp aRNA Amplification-Kit-Handbuch von Ambion, allerdings ohne Verwendung von Rnase H (Endonuklease), da die Reverse

Transkriptase vom Omniscript-Kit diese Funktion schon besitzt. Der Mastermix für einen Ansatz wurde wie folgt hergestellt:

DNA Polymerase I (E.coli)	2 μ l
dNTP Mix (2,5mM je NTP)	4 μ l
10 x Puffer Polymerase I	10 μ l
RNase freies Wasser	64 μ l

Tabelle 2.2.10

Zu den 20 μ l des Ansatzes für eine Probe der Erststrangsynthese wurde dann 80 μ l des Mastermixes für die Zweitstrangsynthese hinzu pipettiert und 2 Stunden bei 16°C inkubiert.

Schließlich erfolgte danach noch die Aufreinigung und Konzentrierung der ds cDNA. Dafür verwendet wurde des MinEluteTm-Clean up reaction Kit von Qiagen mit den dazu gehörigen Qiagen Säulen. Ziel dieser Aufreinigung war es, überschüssige dNTPs, Salz, Enzyme sowie RNA-Rückstände zu beseitigen. Zuerst erfolgte die Mischung von 100 μ l des Probenansatzes mit 300 μ l ERC-Puffer. Danach wurde das komplette Volumen von 400 μ l auf die MinElute-Säule gegeben und 1min bei 10000rpm zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss ist verworfen worden. Nun wurde 750 μ l des PE-Puffers auf die Säule pipettiert, 1min bei 10000rpm zentrifugiert und danach unter Verwendung eines neuen 2ml Tubes nochmals 1min bei 13000 zentrifugiert. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 10-20 μ l EB-Puffer direkt auf die Silikanmembran der MinElute-Säule, welche auf ein steriles 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäße gestellt wurde. Nach einer Inkubation von 1min bei Raumtemperatur erfolgte die erneute Zentrifugation für 1min bei 10000rpm. Die 10-20 μ l aufgereinigte und konzentrierte ds cDNA konnte dann bei -20°C aufbewahrt werden.

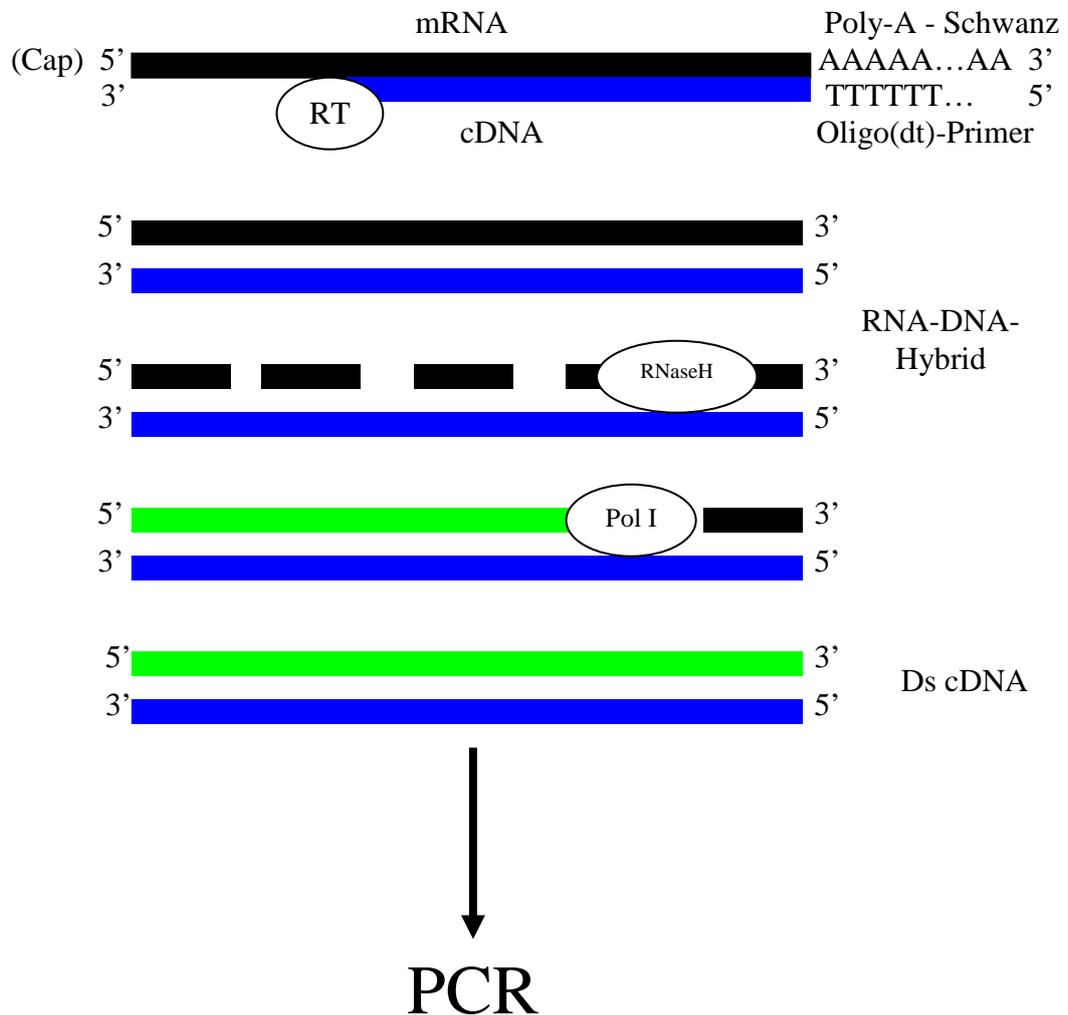


Abbildung 2.2.7

Die RT (Omniscript) synthetisiert DNA in 5'-3' Richtung ausgehend von einer RNA-Matrize, eingebrachten Oligo(dt)-Primern und dNTPs. Durch die RNase-H-Aktivität der RT wird dann die RNA des DNA-RNA-Hybrids in kleinere Fragmente hydrolysiert. Diese kleinen RNA Fragmente dienen als Primer während der Zweitstrangsynthese, aus welcher dann ds cDNA entsteht. Die Synthese des zweiten Stranges geschieht mit Hilfe der DNA-Polymerase I (Pol I). Neben der Polymerase-Funktion besitzt die Pol I eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, die es ihr erlaubt, eigene falsch eingebaute dNTPs zu korrigieren ("proofreading" Funktion), und eine 5'-3' Exonukleaseaktivität, die Einzelstrangbrüche in Doppelstrang-DNA/DNA-RNA erkennt und den gebrochenen

Einzelstrang jenseits des Bruchs abbaut. Letztere Funktion sorgt zusammen mit der Polymeraseaktivität dafür, dass die “RNA-Primer” entfernt und durch DNA ersetzt werden. Schließlich wird dadurch mit der Pol I auch der Rest des Zweitstranges gebildet (Abbildung 2.2.7).

2.2.4.3.3 Durchführung der RTD-PCR

Zuerst erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe der umgeschriebenen DNA, entweder der Einzelstrang- oder Doppelstrang cDNA. Dabei wurde 10 μ l der Proben in ein 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert und mit 10 μ l RNase freiem Wasser vermischt, danach 10 μ l der 1:2 Verdünnung wieder mit 10 μ l Rnase freiem Wasser verdünnt, bis schließlich eine Verdünnungsreihe von 1:2 bis zu 1:16 vorlag.

Nun erfolgte die Herstellung des Mastermixes für die RTD-PCR mittels Power SYBR® Green PCR Mastermix (bestehend aus SYBR Green 1 Dye, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP und optimierten Pufferkomponenten), RNase freiem Wasser und spezifischen Primern (10pmol/ μ l Konzentration). Da in jedes well 19 μ l des Mastermixes und 1 μ l der verdünnten Probe pipettiert wurde, musste vorher überlegt werden, wieviel Ansatz hergestellt werden sollte. Beachtet werden musste dabei auch, dass die Primer eine Endkonzentration von 0,05pmol/ μ l haben und dass 20 wells für ein Primerpaar benutzt wurden. Daraus ergab sich dann folgender Ansatz:

SYBR Green	200 μ l
Primer forward 10pmol/ μ l	2 μ l
Primer reverse 10pmol/ μ l	2 μ l
RNase freies Wasser	176 μ l
	400μl

Tabelle 2.2.11

Primer	Sequenz 5' - 3'
Ang2 – Sense	AAC GGT ATC ATG GCC TTG TAT CA
Ang2 – Antisense	CGT TTC CCT ACC TAA GTA TCC ATC A
XS13 – Sense	AGA TCC GCA TGT CCC TTC G
XS13 – Antisense	CCT TGC GCA TCA TGG TGT T

Tabelle 2.2.12

Dieser Ansatz wurde jeweils für die XS 13 Primer (biomers.net, Ulm, GER) und die Ang2 Primer (biomers.net, Ulm, GER) hergestellt.

Jeweils 19µl des angesetzten Mastermixes wurden nun nach dem unten aufgezeigten Schema in eine Fast Optical 96-well Reaction Plate 0,1ml (Applied Biosystems, Darmstadt, GER) pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1µl cDNA der Verdünnung 1:2 bis 1:16 der Proben (siehe Tabelle 2.2.14). Schließlich wurde für die XS13 und die Ang2 Primer ein Leerwert mitbestimmt, wobei hier zu den 19µl Mastermix 1µl RNase freies Wasser hinzupipettiert wurde. Auf die fertige 96-well Platte wurde dann ein Adhesive Optical Film (Applied Biosystems, Darmstadt, GER) geklebt. Um eventuell gebildete Luftblasen zu eliminieren, erfolgte eine Zentrifugation (Cryofuge 5000, Heraeus-Christ, Osterode, GER) bei 1500rpm.

Die RTD-PCR wurde an einer 7500 Fast Real-Time PCR System Maschine mit dem dazugehörigen Programm, 7500 Fast der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, GER), nach folgendem Schema durchgeführt:

Standard Thermocycler Settings	
Fakultativer Schritt für AmpErase UNG	2min bei 50°C
Initial PCR Aktivierungsschritt	10min bei 95°C
2-step-PCR:	
Denaturierung	15sec bei 95°C
Annealing + Elongation	1min bei 60°C
Anzahl der Zyklen	40
Dissoziationskurven-Analyse	

Tabelle 2.2.13

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	XS13 K 1:2	XS13 K 1:2	Ang2 K 1:2	Ang2 K 1:2	XS13 P 1:2	XS13 P 1:2	Ang2 P 1:2	Ang2 P 1:2
B	XS13 K 1:4	XS13 K 1:4	Ang2 K 1:4	Ang2 K 1:4	XS13 P 1:4	XS13 P 1:4	Ang2 P 1:4	Ang2 P 1:4
C	XS13 K 1:8	XS13 K 1:8	Ang2 K 1:8	Ang2 K 1:8	XS13 P 1:8	XS13 P 1:8	Ang2 P 1:8	Ang2 P 1:8
D	XS13 K 1:16	XS13 K 1:16	Ang2 K 1:16	Ang2 K 1:16	XS13 P 1:16	XS13 P 1:16	Ang2 P 1:16	Ang2 P 1:16
E	XS13 H2O		Ang2 H2O					

Tabelle 2.2.14: Pipettierschema in eine 96-well Platte mit dem internen Standard XS13 und Ang2 als zu untersuchendes DNA-Produkt

2.2.5 Tube Formation Assay

In der Regel 4h vor Versuchsbeginn ist ein eingefrorenes 500µl Aliquot von GFR (Growth Factor Reduced) Matrigel langsam im Eisbad (<4°C) aufgetaut worden. Zusätzlich wurden 200µl Pipettenspitzen und eine 96-well Platte in den Kühlschrank gestellt. Nachdem das Matrigel im Eisbad aufgetaut war, erfolgte unter der sterilen Arbeitsbank die Verteilung von 50µl Matrigel (weiterhin im Eisbad) pro well mit den gekühlten 200µl Pipettenspitzen in die gekühlte 96-well Platte. Die Kühlung der Pipettenspitzen und der 96-well Platte sollte eine vorzeitige Polymerisierung des Matrigels verhindern, welche ab >4°C geschieht. Danach wurde die 96-well Platte geschwenkt, um das Matrigel gleichmäßig zu verteilen, und bei 5% CO₂ und 37°C für 30min in den Inkubator gestellt, damit das Gel polymerisieren konnte. In der Zwischenzeit erfolgte die Passagierung der HMEC-1 Zellen wie unter 3.1.3 beschrieben. Mittels einer Neubauerkammer konnte die Zellzahl pro µl Zellsuspension bestimmt werden. Letztendlich sollte sie bei 20.000 Zellen/ 50µl liegen. Ein Teil der Zellsuspension ist erneut zentrifugiert und in Medium mit 1% FBS aufgenommen worden. Dann wurde nach folgendem Schema pipettiert:

1.well	2.well	3.well	4.well	5.well	6.well	7.well	8.well	9.well	10.well
Standard	Standard	K	P	K	P	K	P	K	P
Medium mit 1% FBS	Medium mit 10% FBS	Medium mit 10% FBS				Medium mit 1% FBS			
20.000 Zellen/ 150µl Medium	20.000 Zellen/ 150µl Medium	20.000 Zellen/ 50µl Medium				20.000 Zellen/ 50µl Medium			
		100µl BON-1 kond. Medium mit 10% FBS		100µl HCT kond. Medium mit 10% FBS		100µl BON-1 kond. Medium mit 1% FBS		100µl HCT kond. Medium mit 1% FBS	
		shMock	shPdcd4	shMock	shPdcd4	shMock	shPdcd4	shMock	shPdcd4

Tabelle 2.2.15: Tube Formation Assay

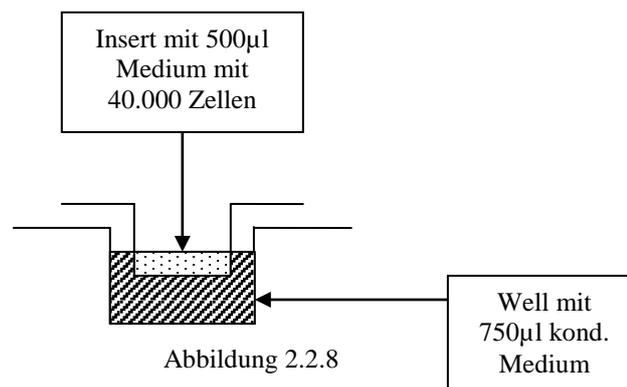
Das angewendete konditionierte Medium stammt von mit shRNA für Pdc4 stabil transfizierten BON-1- und HCT-Zellen. Eine erhöhte Angiopoietin2 Konzentration im Medium aufgrund der Ausschaltung von Pdc4 durch shPdc4 sollte hier der gefäßbildende Stimulus in der Probe sein. Um eventuelle proangiogenetische Störfaktoren zu reduzieren, wurde auch HMEC-1 Medium mit 1% FBS verwendet, da FBS diverse Wachstumsfaktoren beinhaltet.

Nach etwa 18 stündiger Inkubation wurden die tubes zuerst im Phasen-Kontrast Mikroskop bei 10facher Vergrößerung begutachtet und danach die wells bei 4 facher Vergrößerung mit einer EOS Canon Spiegelreflexkamera, die an das Mikroskop angeschlossen wurde, abfotografiert.

Ein ähnlicher Versuchsansatz nur diesmal mit rekombinanten Angiopoietin2 in Konzentrationen von 10ng/ml bis 400ng/ml in 100µl HMEC-1 Medium mit 1% oder 10% FBS, anstatt des konditionierten Mediums, ist auch durchgeführt wurden.

2.2.6 Boyden Chamber Assay

Zuerst erfolgte die Passagierung der HMEC-1 Zellen wie unter 2.1.1.3 beschrieben. Danach wurde aus der Zellsuspension die Zellzahl/ µl durch das Hematozytomer bestimmt. 40.000 Zellen/ 500µl pro well (24-well Platte), wiederum aufgenommen in 1%- und 10%-haltigem Medium, sind für den Versuch erforderlich. Zuerst wurden 750µl des konditionierten Mediums in ein well pipettiert, danach das Insert (für ein well einer 24-well Platte) mit einer Porengröße von 8,0 µm hineingestellt und darauf 500µl Medium mit 40.000 Zellen zugesetzt (siehe Abbildung 3.8). Nach folgendem Schema erfolgte der Versuch:



	1.well	2.well	3.well	4.well	5.well	6.well	7.well	8.well	9.well	10.well	11.well
	Standard	Standard	Standard	K	P	K	P	K	P	K	P
Well	750µl Medium mit 1% FBS	750µl Medium mit 10% FBS	750µl Medium mit 1% FBS	750µl kond. BON- 1 Medium mit 10% FBS		750µl HCT kond.Medium mit 10% FBS		750µl BON-1 kond. Medium mit 1% FBS		750µl HCT kond. Medium mit 1% FBS	
				shMock	shPdcd4	shMock	shPdcd4	shMock	shPdcd4	shMock	shPdcd4
Insert	500µl Medium mit 1% FBS + 40.000 Zellen	500µl Medium mit 10% FBS + 40.000 Zellen	500µl Medium mit 10% FBS + 40.000 Zellen	500µl Medium mit 10% FBS + 40.000 Zellen				500µl Medium mit 1% FBS + 40.000 Zellen			

Tabelle 2.2.16: Boyden Chamber Assay

Nach ca. 4 stündiger Inkubation wurde das Medium aus den Inserts und den Wells verworfen. Es musste immer darauf geachtet werden, dass die Inserts mit ihren Porenmembranen nicht an der Unterseite berührt werden. Danach erfolgte die Spülung der Inserts mit PBS und anschließend die Trocknung auf einem Zewa. Nun konnten die Zellen auf den Inserts 10min in 100% Methanol-Lösung fixiert werden. Jetzt wurden die Inserts 10min in Crystal-Violet-Lösung gefärbt, abgespült mit PBS, destilliertem Wasser und dann trocken gewischt mit einem Ohrstick. Schließlich erfolgte erneut die Spülung mit destilliertem Wasser und dann die Auswischung. Zur vollständigen Trocknung der Inserts wurden diese in eine neue 24-well Platte über Nacht gestellt. Am nächsten Tag konnten die Zellen auf der Unterseite der Inserts über einen Objektträger mit Raster (ein Quadrat = $0,1\text{mm}^2$) ausgezählt werden.

Ziel dieses Versuches ist es, die Zellen zur aktiven Migration durch die Porenmembran zu bewegen. Dabei sollte das konditionierte Medium wie unter 2.2.5 beschrieben durch höhere Angiopoietin2 Spiegel in der Probe (shPdcd4) promigratorisch wirken.

2.2.7 Cell Invasion Assay

Zuerst wurde auf die Anzahl der gebrauchten Inserts für eine 24-well Platte $100\mu\text{l}$ Matrigel aufgetragen (im Verhältnis 1:2 verdünnt mit HMEC-1 Medium). Die Inserts inkubierten dann bei 37°C über nacht, damit das verdünnte Matrigel polymerisieren konnte. Der weitere Versuch gleicht dem des Boyden Chamber Assay. Einziger Unterschied ist eine Matrigelschicht (siehe Abbildung 2.2.9). Hierbei sollten die Zellen aktiv durch das Matrigel und die $8,0\mu\text{m}$ Porenmembran migrieren. Die Inkubationszeit betrug bei diesem Versuch 6-24h. Die Auswertung erfolgte wie bei dem Boyden Chamber Assay.

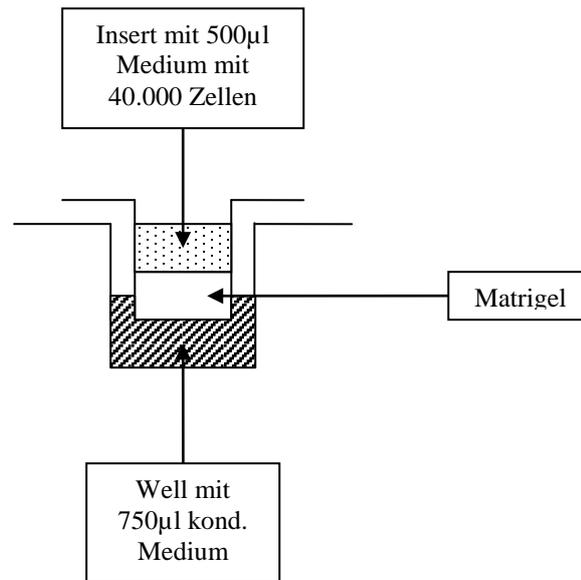


Abbildung 2.2.9

2.2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Tube Formation Assays mit konditioniertem Medium und rekombinanten Ang2 und der Boyden Chamber Assays mit konditioniertem Medium sowie die Erstellung der Diagramme erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel. Die Ergebnisse der Proben wurden als Prozentzahlen im Vergleich zur Kontrolle angegeben und daraus der Mittelwert, der Mittelwert der Standardabweichung sowie der P-Wert mit Hilfe des Student t-Tests (einseitiger gepaarter t-Tests) ermittelt. Signifikant war in allen Fällen ein P-Wert $\leq 0,05$.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Abhängigkeit der Ang2 Protein Produktion von der Pcd4 Protein Menge in Tumor-Zelllinien des pankreatiko-gastro-intestinalen Traktes

3.1.1 Pcd4 Suppression mittels siRNA

In verschiedenen humanen Tumor-Zelllinien des pankreatiko-gastro-intestinalen Traktes wurden transiente Transfektionen mittels siRNA (siPcd4) (siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.2) und siMock (Kontrolle) durchgeführt. Aus den gewonnenen Proteinextrakten zeigten die durchgeführten Western Blots eine erfolgreiche Unterdrückung der Pcd4 Expression. Dargestellt sind in der folgenden Abbildung diese Western Blot Ergebnisse:

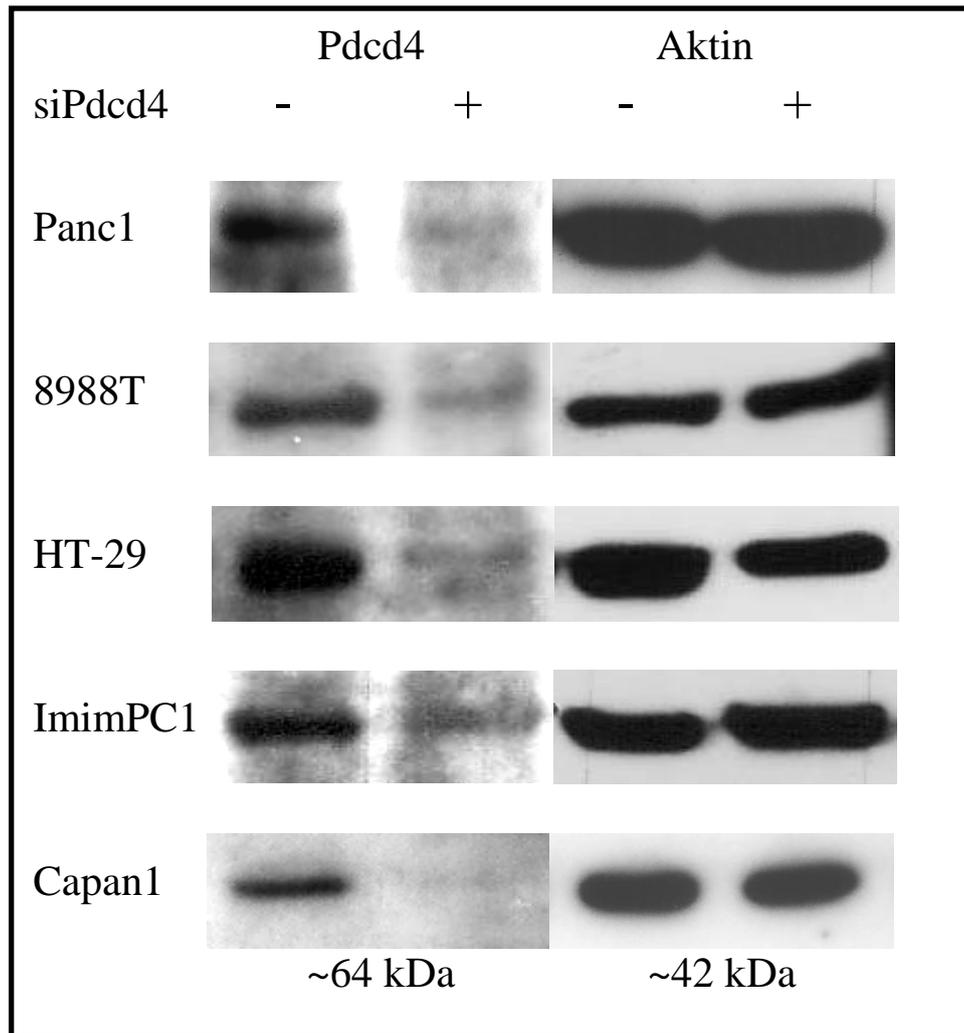


Abbildung 3.1: Western Blots von Gesamtproteinextrakten der links beschriebenen Zelllinien (Beschreibung in Material und Methoden Kapitel 2.2.1.1). Es zeigt sich eine Verringerung von Pdc4 Protein durch die Behandlung mit siPdc4 bei gleichen Aktin Mengen. Die Kontrollen (-) wurden mit siMock transfiziert.

3.1.2 Ang2 Expression in den mit siPdc4 transfizierten Zelllinien

Aufgrund der beschriebenen strukturellen Eigenschaften von Pdc4 und der daraus resultierenden Funktion über seine MA-3 Domänen eukaryotische Initiationsfaktoren zu binden, wird die Translation von mRNA Transkripten verhindert [27, 104]. Dies könnte einen Mechanismus der Ang2 Expressionssteigerung bei verminderter Pdc4 Bildung

darstellen. Daher wurden auch die Ang2 Proteinmengen in Gesamtproteinextrakten von den transient transfizierten Zelllinien mit siPdc4 und siMock mittels Western Blots untersucht. Die folgenden Western Blot Ergebnisse konnten mindestens dreimal unabhängig von einander wiederholt werden. Eine Reduzierung von Pdc4 Protein führte zu einer Erhöhung von Ang2 Protein bei gleichen Aktin Mengen.

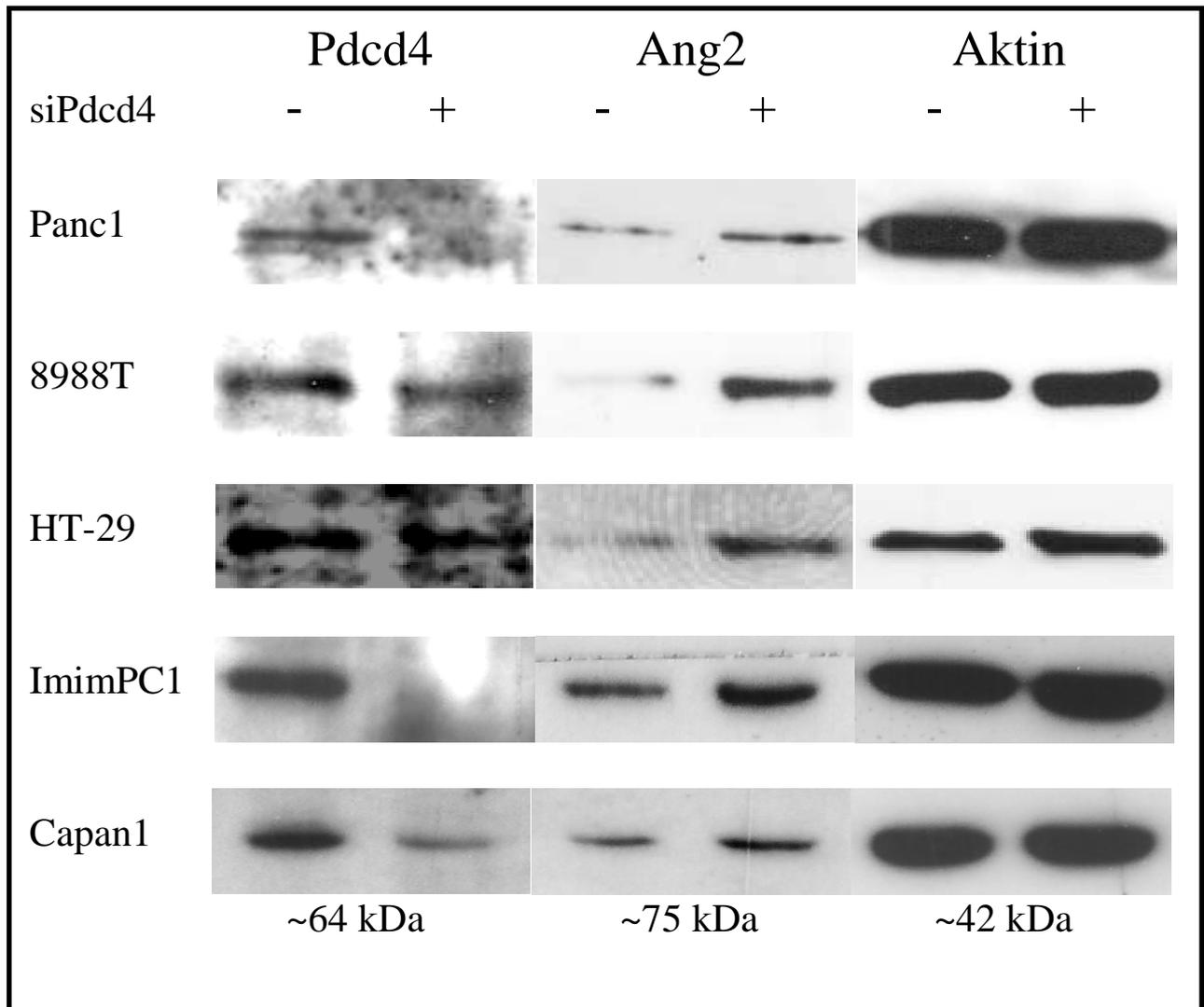


Abbildung 3.2: Western Blots von Gesamtproteinextrakten der links beschriebenen Zelllinien mit Steigerung von Ang2 Protein unter Verminderung von Pdc4 Protein mittels siPdc4. Die Kontrollen (-) wurden mit siMock transfiziert.

3.2 Semiquantitative RT-PCR

Da jeweils eine gleichzeitige Isolierung von Proteinen und RNA nach einer transienten Transfektion erfolgte (siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.3.1 und 2.2.4.1), konnten semi-quantitative RT-PCRs nach erfolgreichen Western Blots, mit Pdc4 Verringerung unter siRNA Gabe und gleichzeitiger Ang2 Steigerung, durchgeführt werden. Dabei wurde jeweils ein Aliquot der Proben nach Amplifikationszyklus 35 und 40 entnommen und auf einem Agarosegel analysiert. Hierbei zeigte sich eine Ang2 mRNA Hochregulierung in den mit siPdc4 transfizierten Zellen. Damit scheint Pdc4 nicht nur auf translationaler Ebene, sondern auch auf transkriptionaler Ebene Ang2 zu regulieren.

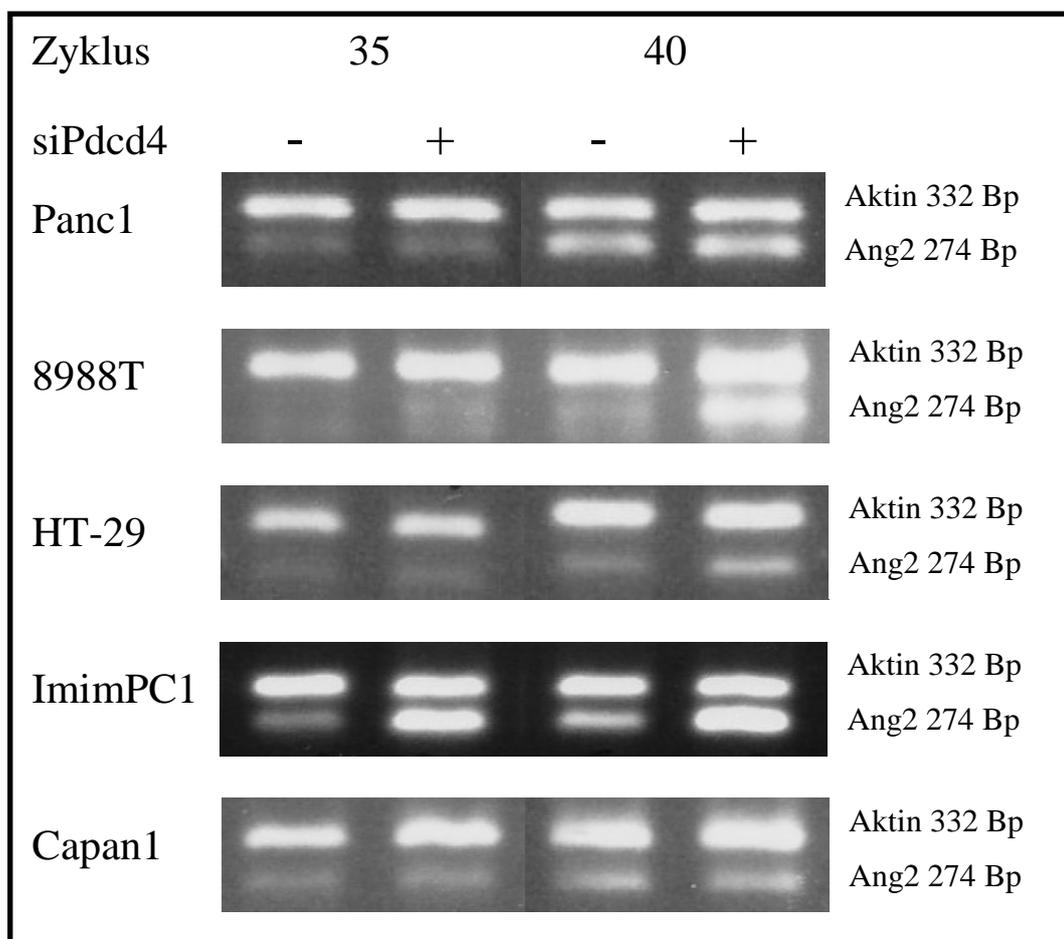


Abbildung 3.3: Semiquantitative RT-PCR von RNA Extrakten verschiedener Zelllinien. Gemäß der Versuchsdurchführung (Kapitel 2.2.4.2) wurden nach den Amplifikationszyklen 35 und 40 Proben entnommen und diese dann im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Kontrolle (-)). Hierbei lässt sich schlussfolgern, dass mehr Ang2 mRNA in den mit siPdc4 transfizierten Zellen synthetisiert wurde. Als Kontrolle diente die Amplifikation von Aktin.

3.3 Abhängigkeit der Ang2 Protein Produktion durch Pdc4 Reduzierung in weiteren Zelllinien

Zur Überprüfung, ob sich eine gesteigerte Ang2 Expression auch in nicht zum pankreatiko-gastro-intestinalen Trakt gehörenden Zelllinien zeigt, wurde in weiteren Tumorzelllinien eine Regulierung von Ang2 Protein durch Pdc4 untersucht. In Western Blot Arbeiten konnte eine Steigerung von Ang2 Protein unter Verminderung von Pdc4 Protein mittels siPdc4 bewiesen werden. Damit wäre eine zelltyp-übergreifende Regulierung der Ang2 Expression durch Pdc4 möglich.

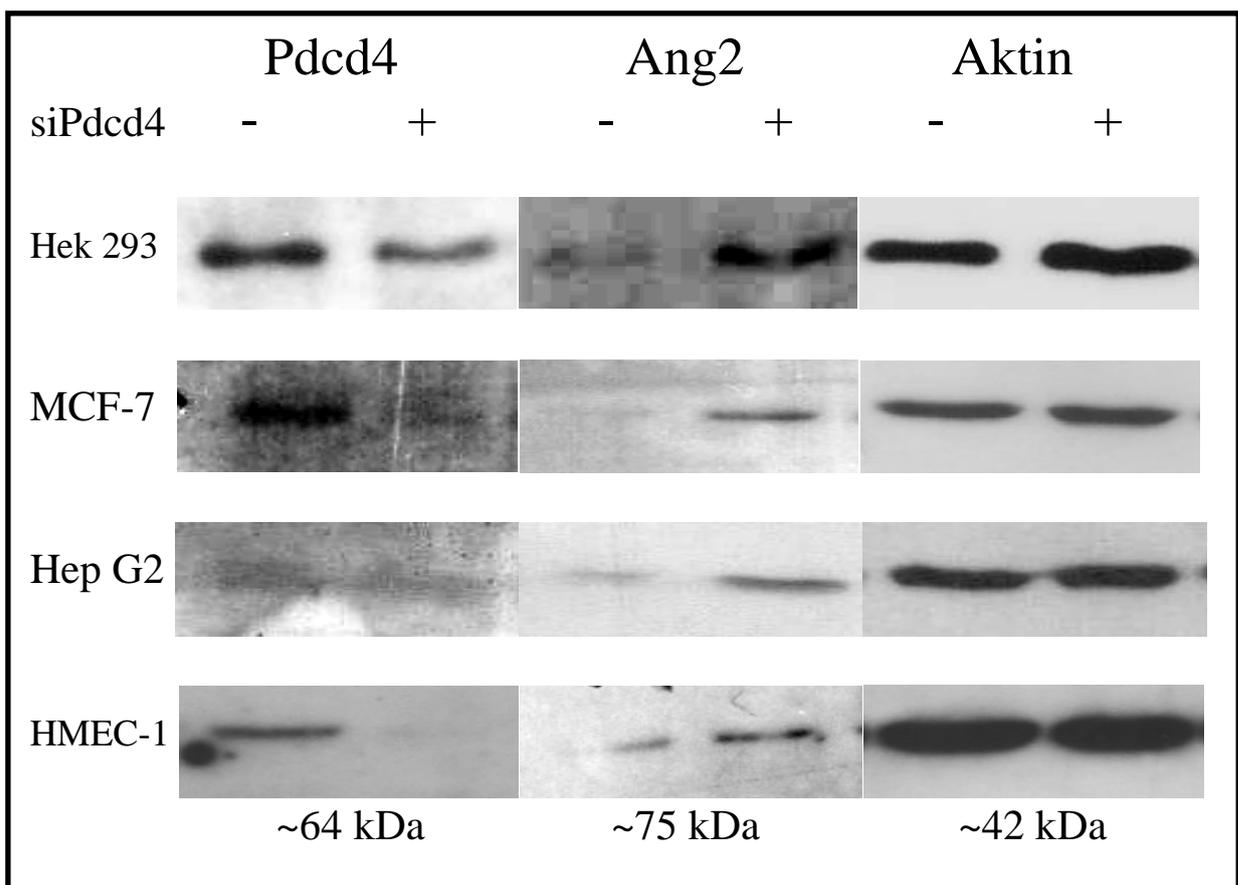


Abbildung 3.4: Western Blots von Gesamtproteinextrakten der links beschriebenen Zelllinien (Beschreibung in Material und Methoden Kapitel 2.2.1.1). Es zeigt sich eine Steigerung von Ang2 Protein bei Verminderung von Pdc4 Protein mittels siRNA. Die Kontrollen (-) wurden mit siMock transfiziert.

3.3.1 Zelllinien die keine Regulierung von Ang2 durch Pdc4 aufwiesen

In zwei Zelllinien konnte keine Regulierung der Ang2 Expression durch die Pdc4 Herunterregulierung mittels siPdc4 nachgewiesen werden. MDA-231 Zellen sind Adenokarzinomzellen der Brust mit epithelialer Herkunft, die aus einem malignen Pleuraerguss isoliert wurden. Obwohl sich eine Steigerung der Ang2 Expression in den mit siPdc4 transfizierten Zellen eruieren ließ, zeigte sich in mehreren Western Blots, aufgrund der geringen Mengen an Pdc4 Protein, kein Signal für Pdc4 Protein. Anders verhält es sich bei den „pancreatic stellate cells“ (PSCs). Diese sind (Myo)-Fibroblasten ähnliche Zellen im Pankreasgewebe und damit keine Tumorzellen, scheinen aber in die Entwicklung des Pankreaskarzinoms involviert zu sein. Die Western Blots der PSCs zeigten eine Verminderung der Pdc4 Expression unter siPdc4 Behandlung. Trotz kürzester Belichtung konnten aber keine Unterschiede in der Ang2 Expression festgestellt werden.

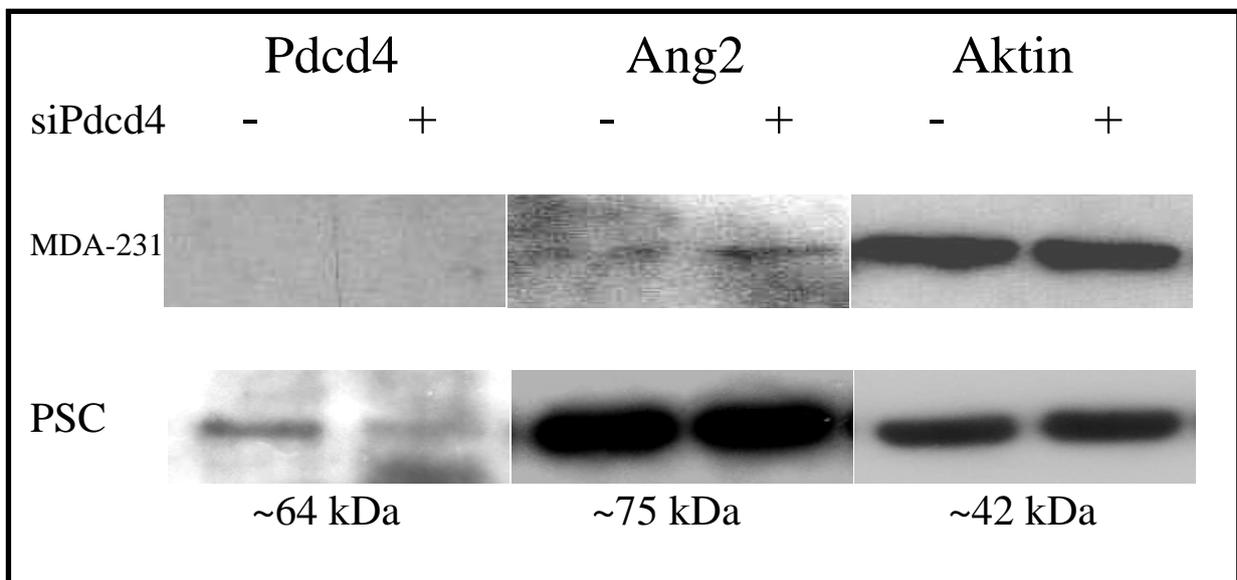


Abbildung 3.5: Western Blots ohne eindeutige Regulation von Ang2 Protein durch Pdc4 Protein mittels siRNA. Die Kontrollen (-) wurden mit siMock transfiziert.

3.4 Real Time Detection PCR

Die Real Time Detection PCR diente dazu exemplarisch die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR zu bestätigen. Die RTD-PCR stellt dabei eine neuere und sensitivere Methode gegenüber der semiquantitativen RT-PCR dar, DNA zu quantifizieren und damit Rückschlüsse auf die mRNA Expression zu geben. Die Durchführung des Versuches erfolgte wie in Kapitel 2.2.4.3 beschrieben. Im Folgenden wird die Auswertung einer von 8988T Zellen isolierten RNA, die umgeschrieben in cDNA und mittels PCR amplifiziert wurde, genau aufgezeigt.

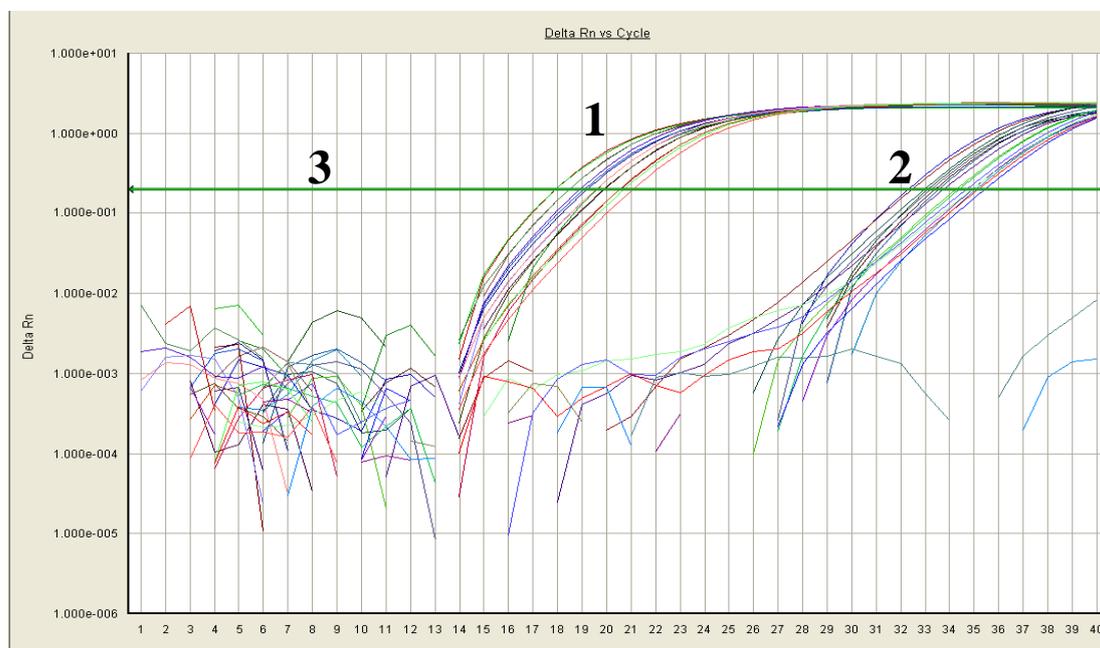


Abbildung 3.6: Ausschnitt eines Amplifikationsplots von 8988T Zellen isolierter RNA, umgeschrieben in DNA. Die horizontale grüne Linie (Nummer 3) gibt den „threshold“ Wert an, ein Signalgrenzwert, der etwa der 10fachen Standardabweichung des Hintergrundsignals entspricht. Der Moment des Überschreitens des Signalgrenzwertes wird als Durchbruchzyklus CT (engl.: cycle threshold) bezeichnet. Für die relative Quantifizierung der Transkriptmenge wird der CT-Wert der Proben durch einen Abgleich mit dem CT-Wert eines Kontrolltranskripts (XS 13) normalisiert. XS 13 (Nummer 1) erreicht den Signalgrenzwert schon nach 18 Amplifikationszyklen, je nach Verdünnungsreihe 1:2 verdünnt ab Zyklus 18 bis 1:16 verdünnt ab Zyklus 21. Ang2 (Nummer 2) hingegen erreicht den CT-Wert erst ab Zyklus 32, was rückschließend für eine viel geringere Menge an mRNA im Vergleich zu XS 13 spricht.

Die Verdünnungsreihen wurden angefertigt, um eine Kontrolle der Primereffizienz zu haben. Bei dem Primerpaar für XS 13, das eine sehr hohe Effizienz hat, geht man davon aus, dass sich pro Amplifikationszyklus die amplifizierte DNA verdoppelt. Für Ang2 gab es zu diesem Zeitpunkt der RTD-

PCR nur ein kommerziell verfügbares Primerpaar, welches eine geringere Effizienz im Vergleich zu den XS 13 Primern aufwies.

In dieser Abbildung zeigt sich sowohl für die Amplifikation von XS 13 als auch für Ang2 ein gleichmäßiger Anstieg der CT-Werte. Dies spricht für relativ gleiche Ausgangsmenge von cDNA und eine gute Qualität des Versuchs. Die Unterscheidung der Amplifikation von XS 13 und Ang2 von siMock und siPcd4 transfizierten Zellen erfolgt für dieses Beispiel in den Abbildungen 3.8-3.9.

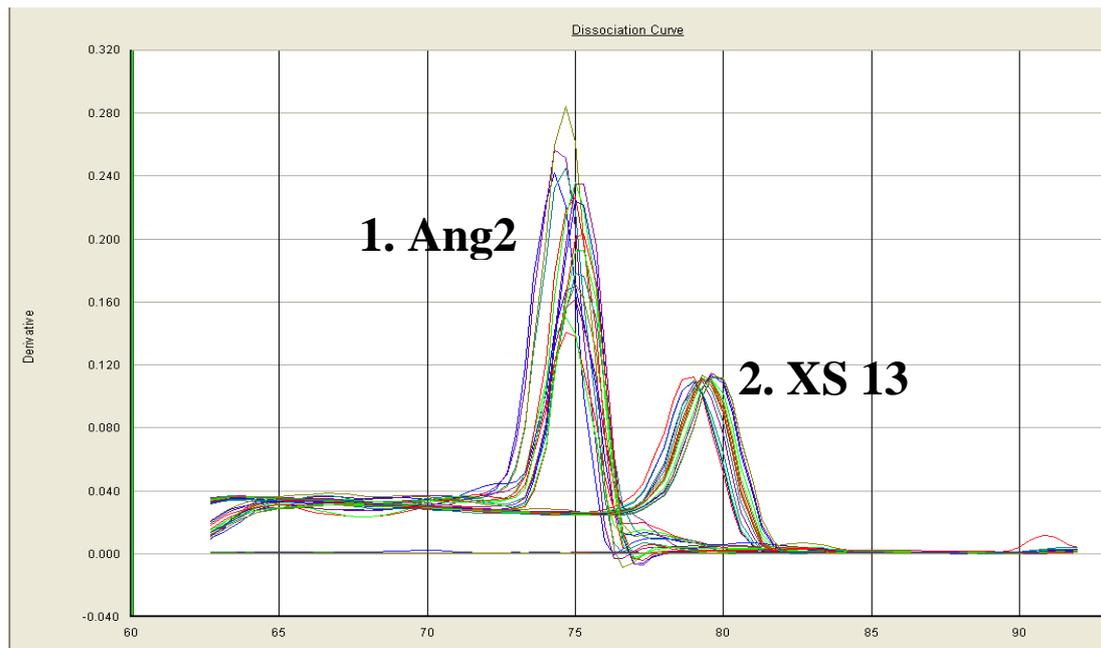
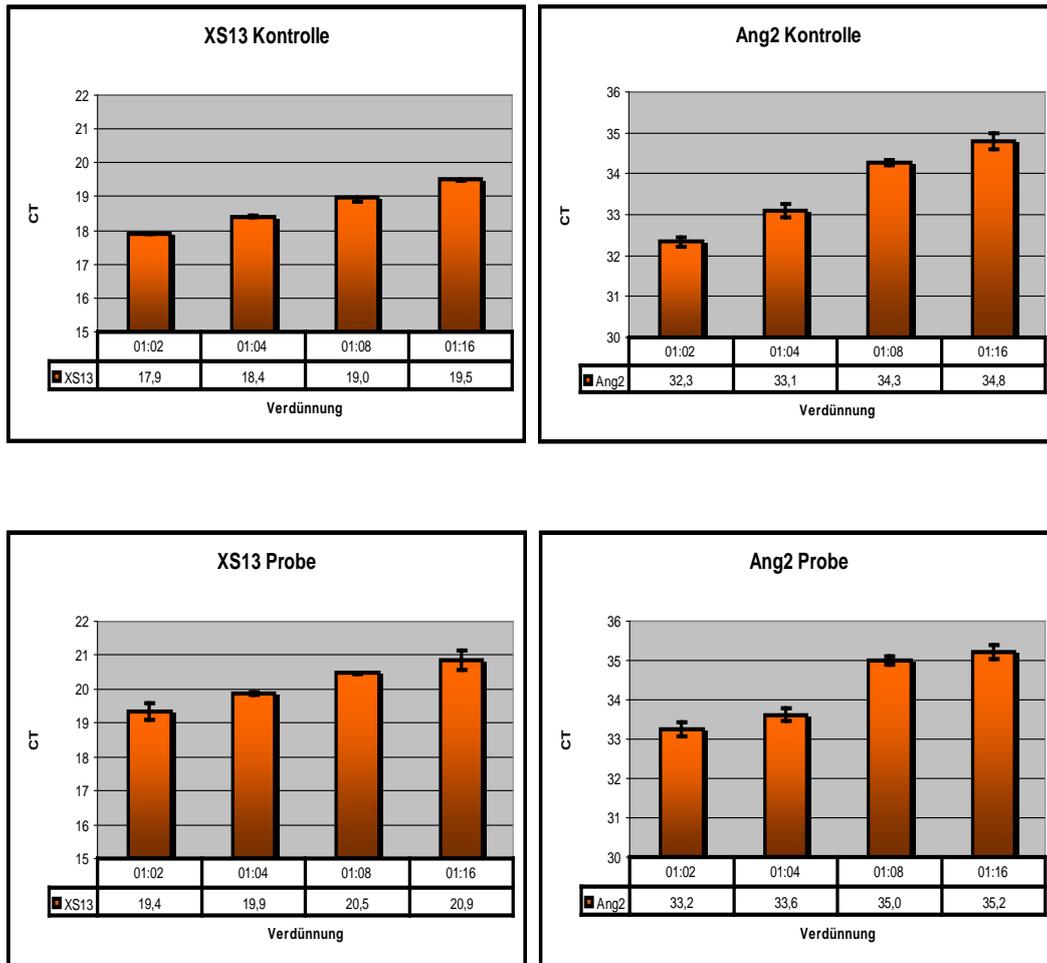


Abbildung 3.7: Dazugehörige Schmelzkurvenanalyse, die zwei spezifische Schmelzpunkte aufweist, nämlich für XS 13 (Nummer 2) bei 79°C und Ang2 (Nummer 1) bei 74-75°C.

Am Ende der PCR wird bei kontinuierlicher Fluoreszenzmessung die Temperatur langsam bis 95°C erhöht. Bei einer für das spezifische Amplifikat charakteristischen Schmelztemperatur wird der DNA-Doppelstrang denaturiert, wodurch SYBR-Green freigesetzt wird und eine Fluoreszenzabnahme registriert werden kann. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt aufweist als unspezifische Amplifikate, ist eine Unterscheidung möglich. Außerdem gibt die Höhe des Schmelzkurven-Peaks, verglichen mit mitgeführten Standards, annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments.



Abbildungen 3.8: CT-Werte der XS 13- und Ang2 Amplifikation von umgeschriebener cDNA aus RNA – Isolierungen von siMock (obere Zeile) und siPdcd4 (untere Zeile) transfizierten 8988T Zellen. XS 13 ist die unabhängige Variable, die in allen Zellen gleichmäßig transkribiert sein sollte, egal ob eine Behandlung mit siMock oder siPdcd4 statt gefunden hatte. Werden genau gleiche Mengen an cDNA aufgetragen, würde der „threshold“ Wert für XS 13 bei Kontrolle und Probe gleich beginnen. In diesem Beispiel zeigt sich ein leichter Versatz von 1,5 Zyklen, welches für eine geringe unterschiedliche cDNA Menge der Kontrolle und Probe spricht. Wichtig ist ein gleichmäßiger Anstieg der CT-Werte entsprechend der Verdünnungsreihe. Optimal wäre sowohl für XS 13 als auch für Ang2 eine stetige Zunahme von einem CT-Wert pro Verdünnungsreihe. Die obigen Abbildungen zeigen zwar einen gleichmäßigen aber nicht genau einheitlichen Anstieg um einen CT-Wert pro Verdünnungsreihe für XS 13 und Ang2. Geringe Abweichungen ergeben sich aus einer unterschiedlichen cDNA Ausgangsmenge, wahrscheinlich bedingt durch Pipettierunregelmäßigkeiten. Allerdings ergibt sich eine korrekte Auswertung der Ergebnisse der Amplifikation erst durch rechnerische Verfahren wie z.B. der unten beschriebenen Livak Methode.

Die Auswertung der RTD-PCR erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Livak Methode. Die Livak Methode ist eine Möglichkeit eine relative Quantifizierung von einem Testgen (Ang2) im Vergleich zu einem Referenzgen (XS 13) zu berechnen. Hierdurch kann ein Wert berechnet werden, der eine relative Expression des Testgens der Probe im Vergleich zur Kontrolle anzeigt. Exemplarisch konnten an drei Tumorzelllinien die in der semiquantitativen RT-PCR gewonnenen Ergebnisse bestätigt werden.

Verdünnungsreihe	1:2		1:4		1:8		1:16	
	CT Ang2	CT XS 13	CT Ang2	CT XS 13	CT Ang2	CT XS 13	CT Ang2	CT XS 13
CT-Wert Kontrolle	32,3	17,9	33,1	18,4	34,3	19,0	34,8	19,5
CT-Wert Probe	33,2	19,4	33,6	19,9	35,0	20,5	35,2	20,9
ΔCT Kontrolle CT Ang – CT XS 13	14,4		14,7		15,3		15,3	
ΔCT Probe CT Ang – CT XS 13	13,8		13,7		14,5		14,3	
$\Delta\Delta CT$ ΔCT Probe – ΔCT Kontrolle	-0,6		-1		-0,8		-1	
$2^{\Delta\Delta CT}$	1,52		2		1,74		2	

In den Verdünnungsreihen zeigt sich eine Erhöhung der Ang2 DNA der Probe im Vergleich zur Kontrolle um Werte von 1,5 – 2,0. Daraus lässt sich schließen, dass dementsprechend 1,5 bis 2,0fach mehr mRNA in den mit siPdcd4 transfizierten Zellen gebildet wurde.

Tabelle 3.1: Auswertung der graphischen Darstellungen der Abbildungen 3.8 und 3.9 für die 8988T RTD-PCR.

Schließlich bestätigten sich die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR auch in RTD-PCR Versuchen mit HT-29- (Tabelle 3.2) und Panc1-Zellen (Tabelle 3.3).

Verdünnungsreihe	1:2	1:4	1:8	1:16
$2^{\Delta\Delta CT}$	2,3	2,6	0,7	1,5

In den Verdünnungsreihen zeigt sich eine Erhöhung der Ang2 DNA der Probe im Vergleich zur Kontrolle um Werte von 0,7-2,6. Daraus lässt sich schließen, dass dementsprechend bis 2,6fach mehr mRNA in den mit siPdc4 transfizierten Zellen gebildet wurde. Allerdings zeigt sich durch den Wert 0,7 in der 1:8 Verdünnung auch eine geringere Ang2 DNA Menge der Probe im Vergleich zu Kontrolle, wahrscheinlich bedingt durch einen Effizienzverlust der Ang2 Primer oder durch Pipettierunregelmäßigkeiten.

Tabelle 3.2: Auswertung für die HT-29 RTD-PCR.

Verdünnungsreihe	1:2	1:4	1:8	1:16
$2^{\Delta\Delta CT}$	169	169	210	169

In den Verdünnungsreihen zeigt sich eine Erhöhung der Ang2 DNA der Probe im Vergleich zur Kontrolle um Werte von ~170-210. Daraus lässt sich schließen, dass dementsprechend max. bis 210fach mehr mRNA in den mit siPdc4 transfizierten Zellen gebildet wurde. In Relation zu den oberen Ergebnissen und auch im Vergleich zu der semiquantitativen PCR der Panc1 Zellen scheint diese Erhöhung der Ang2 Menge eher unrealistisch.

Tabelle 3.3: Auswertung für die Panc1 RTD-PCR.

3.5 Nachweis von sezerniertem Ang2 im Überstand von stabil und transient transfizierten Zelllinien

Ang2 ist ein sezerniertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 75kDa. In vorausgegangenen Arbeiten in unserem Labor wurden Überstände gesammelt von Zelllinien die mit shPdc4 (Pdc4 Knock-down) stabil transfiziert und mit siPdc4 transient transfiziert wurden. Da die endogene Produktion von Ang2 unter Pdc4 Ausschaltung mittels siRNA sich steigerte, sollte möglicherweise eine erhöhte Sekretion von Ang2 statt finden. Es ergeben sich Hinweise in den unten dargestellten Ergebnissen (Abbildung 3.9), dass Ang2 vermehrt sezerniert wird.

Die Western Blots mit Mediumüberständen erfolgten ähnlich wie unter Kapitel 2.2.3.2 beschrieben. Statt dem üblichen 12%igen Polyacrylamidgel wurden niedrigere prozentige Polyacrylamidgele verwendet (7,5-10%) um eine bessere Auftrennung der Albumin – Ang2 Bande zu erreichen. Des Weiteren erfolgte das Blocken für mindestens 2h um ausreichend unspezifische Bindungsstellen, wie die des Albumins zu erfassen.

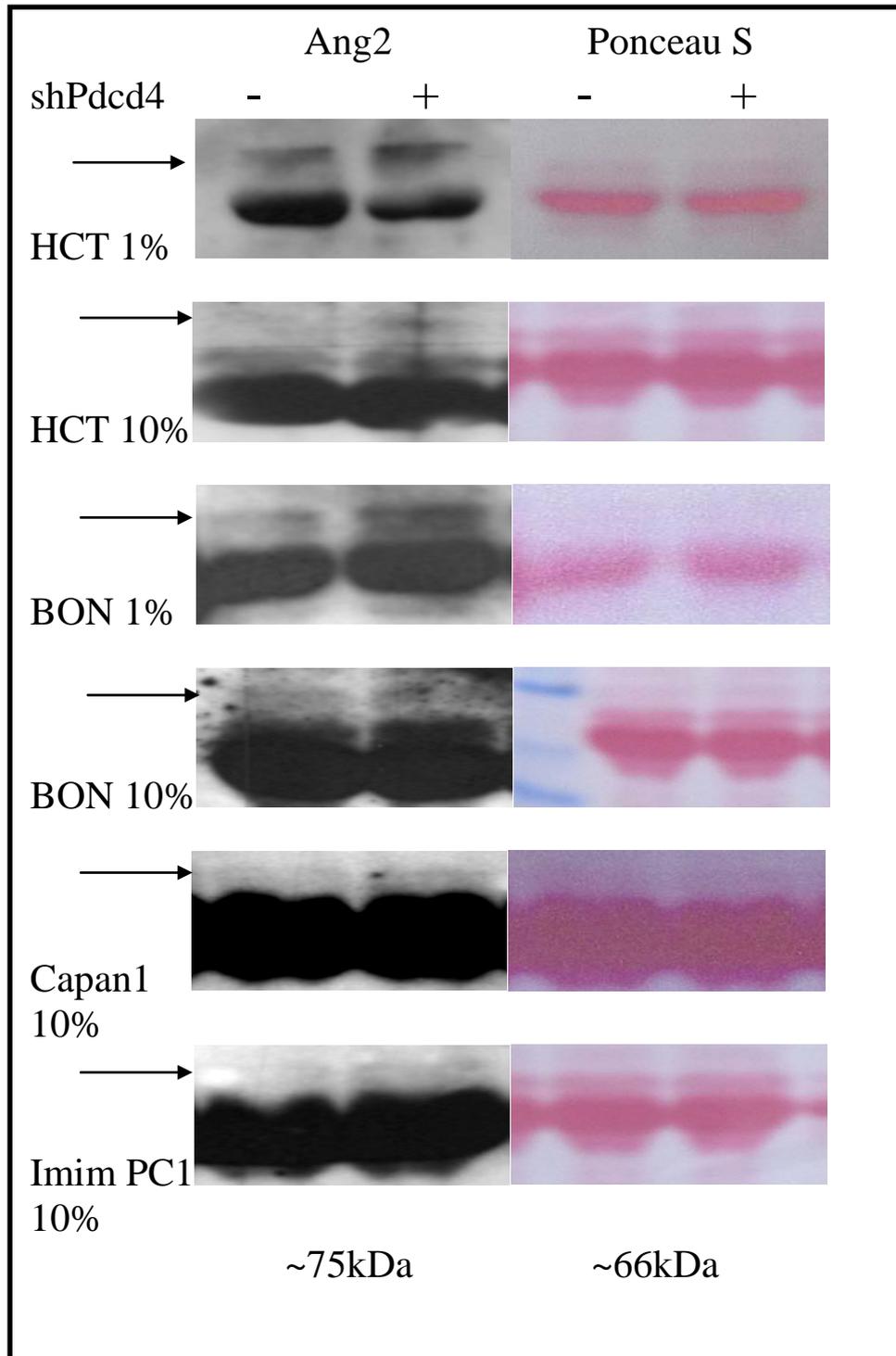


Abbildung 3.9: Western Blots von Mediumüberständen. Die links genannten stabil mit shPcd4 transfizierten HCT116- und BON-1 Zellen und die transient mit siPcd4 transfizierten Capan1- und Imim PC1 Zellen wurden für kurze Zeit (bis 72h) in Kultur gehalten und das Medium gesammelt. Die Zelllinien wurden in Medium mit 10% FBS oder 1% FBS kultiviert, dementsprechend stehen dafür die Prozentzahlen. Auf der rechten Seite ist die Ponceau S Färbung als Zeichen der gleichen Proteinmenge aufgezeigt. Hier ist als dicke Bande das Albumin zu erkennen mit einem spezifischen Molekulargewicht von ~66kDa. Links daneben ist der dazugehörige Western Blot mit einer spezifischen Ang2 Bande bei ~75kDa (mit Pfeil gekennzeichnet) über der Albumin Bande zu sehen. Es scheint vermehrt Ang2 sezerniert zu werden in den stabil und transient transfizierten Zelllinien.

3.6 Tube Formation Assays mit konditioniertem Medium

Aufgrund der Hinweise in den oben gezeigten Western Blots, dass Ang2 in Überständen von shPdcd4/ siPdcd4 transfizierten Zelllinien vermehrt sezerniert wurde, sollten weitere in vitro Versuche eine Beeinflussung anderer Zellen durch diese erhöhte Ang2 Sezernierung zeigen. Für diese Versuche wurde eine humane mikrovaskuläre endotheliale Zelllinie genutzt, kurz genannt HMEC-1, die durch eine Virustransfektion unsterblich gemacht wurde [39, 41]. Diese Zelllinie ist morphologisch und funktionell endothelialen Zellen ähnlich und damit in der Lage migratorische und angiogenetische Aufgaben zu erfüllen.

In Kapitel 2.2.5 ist die Versuchsdurchführung des Tube Formation Assay beschrieben. In eine 96-well Platte wurde in jedes verwendete well gemäß den Vorschriften 50µl GFR Matrigel pipettiert. Danach sollte das Matrigel 30min bei 37°C polymerisieren. 20.000 HMEC-1 Zellen in 50µl Standardmedium sowie 100µl konditioniertes Medium (shMock/ shPdcd4 von HCT116- oder BON-1-Zellen) wurden dann in jeweils ein well zugesetzt und für 16 bis maximal 24h inkubiert. Die entstandenen Tubes wurden mit einer EOS 2 Canon Spiegelreflexkamera, die an das Phasen-Kontrast-Mikroskop angeschlossen wurde, abfotografiert (Abbildung 3.10). Durch ein, von unserem Medizininformatiker Johannes Huth, modifiziertes Programm (TimeLapseAnalyzer) konnten diese Fotografien ausgewertet werden. Dabei erfolgte eine Auswertung in Verzweigungen („junctions“), für gebildete Verbindungen zwischen den HMEC-1 Zellen und eine Auswertung in Länge („length“), angegeben als Anzahl von Pixel, für die Länge der gebildeten Tubes (Abbildung 3.11). Anfänglich wurden die HMEC-1 Zellen mit dem konditionierten Medium von BON-1- und HCT116-Zellen mit 1% FBS inkubiert. Entgegen der beschriebenen Literatur [39] wuchsen HMEC-1 Zellen in Medium mit wenig FBS (1% oder kein FBS) schlecht oder starben sogar ab. Deshalb beziehen sich alle nachfolgenden Auswertungen auf konditioniertes Medium mit einem FBS Gehalt von 10%.

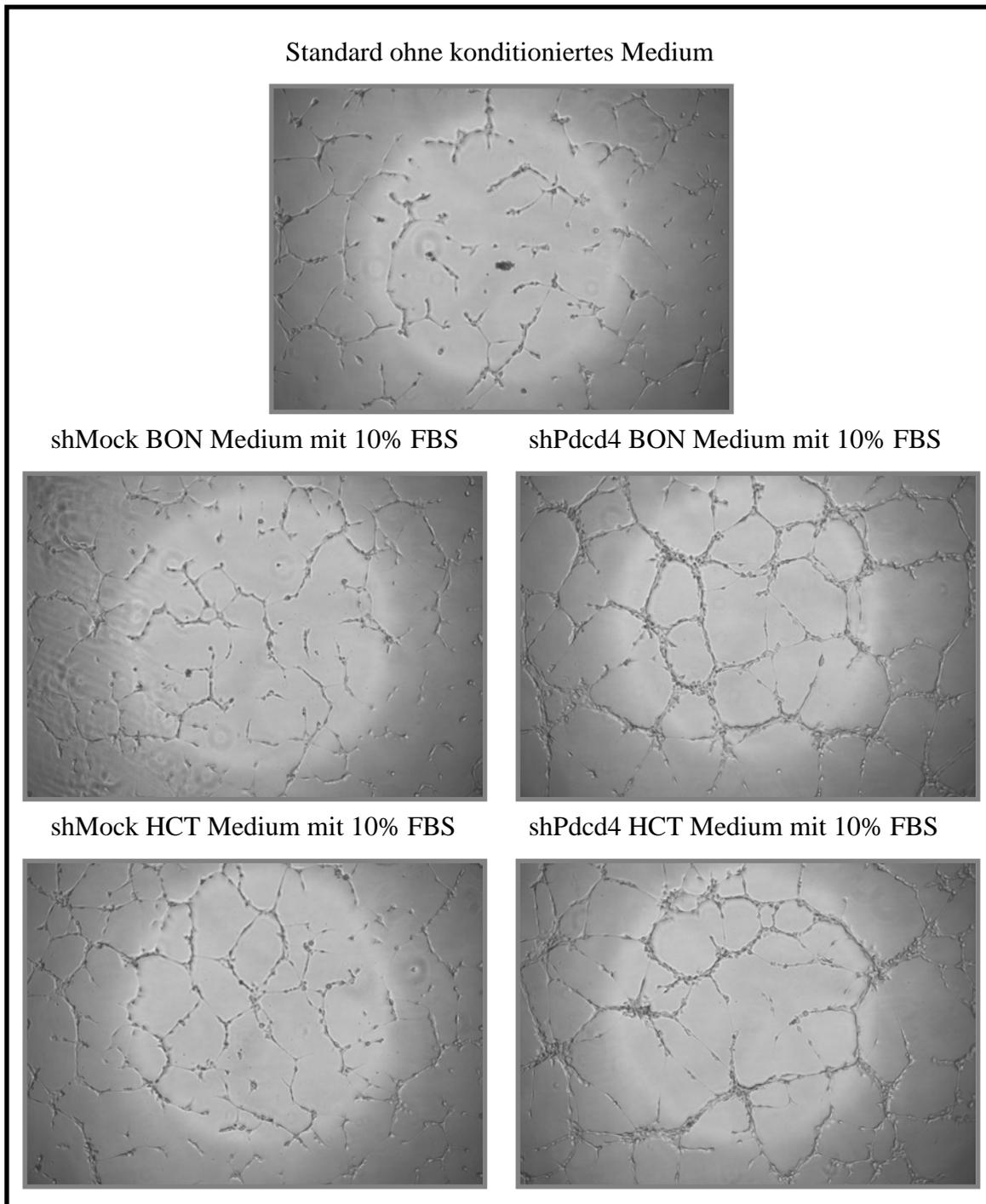


Abbildung 3.10: Beispiel eines Tube Formation Assay vom 12.03.2010. Die Photographien wurden standardisiert, dass heißt bei 4facher mikroskopischer Vergrößerung und durch Zentrierung der kreisrunden Aufhellung im Mittelpunkt durchgeführt. Dadurch gelang eine Auswertung der Photographien eines genau definierten Fensters. Optisch fällt die Auswertung wie viele und wie lange Gefäße sich gebildet haben schwer. Auffällig ist aber, dass im Vergleich zum Standard, welcher ohne konditioniertes Medium behandelt wurde, in den mit konditioniertem Medium behandelten Proben mehr Tubes sich gebildet haben, die auch stärker verzweigt sind. Des Weiteren erscheinen auf den ersten Blick die Tubes der HMEC-1 Zellen, die mit shPdc4 Medium behandelt wurden kräftiger und länger zu sein.

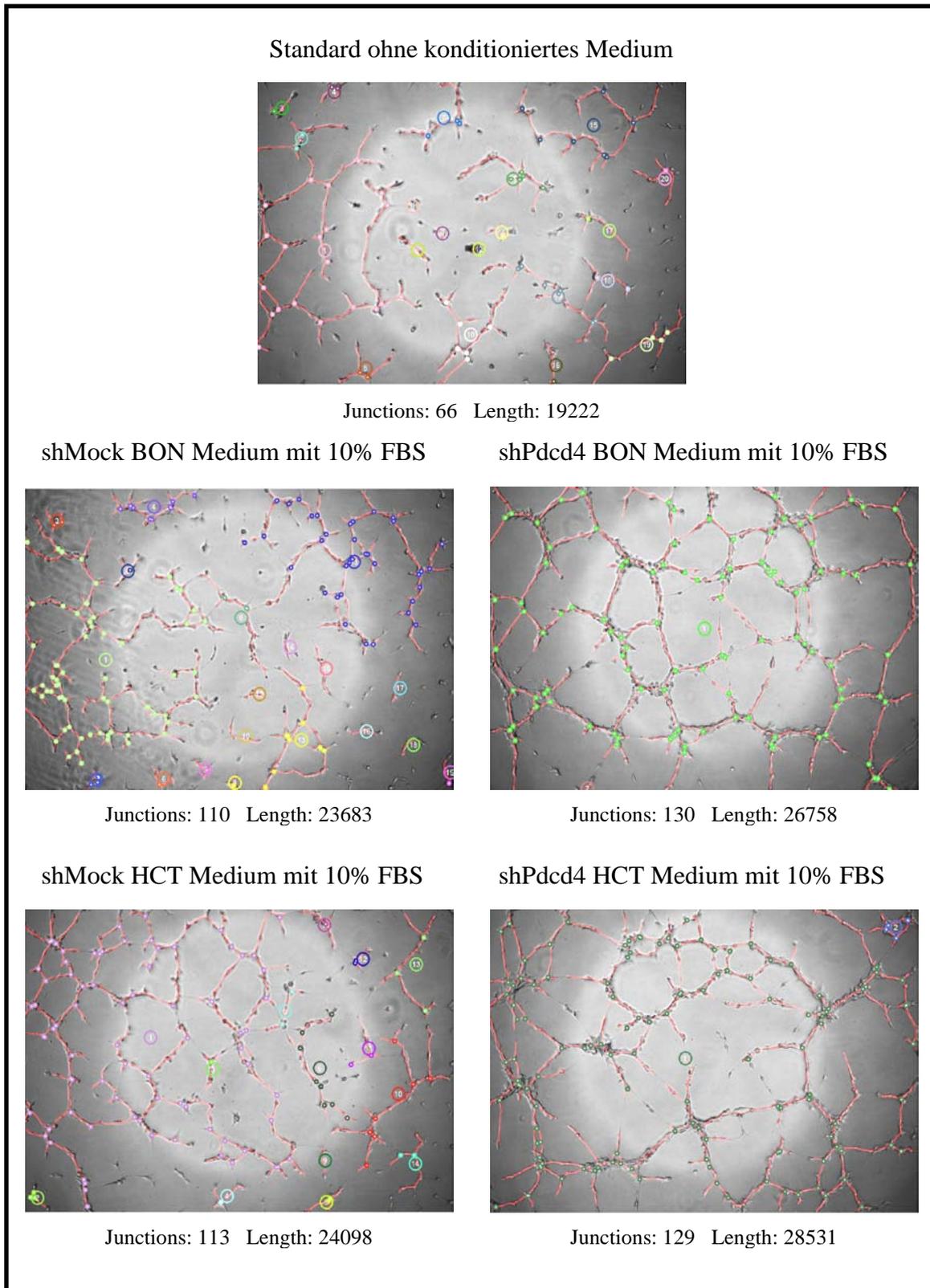


Abbildung 3.11: Beispiel eines Tube Formation Assay vom 12.03.2010 mit computerbasierter Auswertung. Jede Zell-Zell-Verbindung wird als Verzweigung („junction“) und damit als Punkt markiert. Die Linien zwischen den Verzweigungen stellen die Länge („length“) der Verbindungen dar, die als Pixel ausgewertet werden. Die verschiedenen Farben kennzeichnen Tube-Verbände, d.h. zusammenhängende Tubes, die untereinander in Verbindung stehen. Unter jedem Bild ist die Anzahl der Verzweigungen und

der Länge angegeben. Es werden mehr Verzweigungen und längere Tubes in dem mit BON oder HCT shPdcd4 behandelten HMEC-1 Zellen gebildet im Vergleich zu den mit shMock behandelten Zellen.

Schließlich erfolgte eine graphische und statistische Auswertung (siehe Tabelle 3.4, 3.5 und Abbildung 3.12, 3.13) der durchgeführten Tube Formation Assays. Einbezogen wurden alle Versuche, die keinerlei Durchführungsmängel aufwiesen. Zu den möglichen Fehlerquellen in der Versuchsdurchführung gehörten vor allem: ungleichmäßige Verteilung der Zellen oder des Matrigels, unterschiedliche Zellzahl, Luftblasen im Matrigel, Luftblasen entstanden durch das Pipettieren der Zellen und des Mediums auf das Matrigel und zu lange oder zu kurze Inkubationszeit des Assays.

Sowohl graphisch als auch statistisch zeigt sich, dass verzweigtere und längere Tubes in den mit shPdcd4 konditioniertem Medium, von BON- oder HCT-Zellen, kultivierten HMEC-1 Zellen gebildet werden. Statistisch gesehen sind die ausgewerteten Versuche hinsichtlich ihrer untersuchten Kriterien signifikant. Wie in unserem Modell beschrieben, könnte das konditionierte Medium der mit shPdcd4 transfizierten BON- und HCT-Zellen, welches vermehrt Ang2 beinhaltet, der auslösende Stimulus für eine gesteigerte Tube Formation sein.

Tube Formation Assays mit konditioniertem BON Medium				
Versuchsdatum	Verzweigungen		Länge	
	Angaben in Prozent		Angaben in Prozent	
	shMock	shPdcd4	shMock	shPdcd4
19.11.09	100	102,8	100	106,4
04.03.10	100	126,2	100	108,2
12.03.10	100	107,1	100	112,9
29.04.10	100	147,8	100	129,9
30.04.10	100	116,5	100	112,1
Mittelwert		120		114
STAB		17,9		9,3
P-Wert		0,033		0,015

Tabelle 3.4: Statistische Auswertung der Tube Formation Assays mit konditioniertem BON Medium.

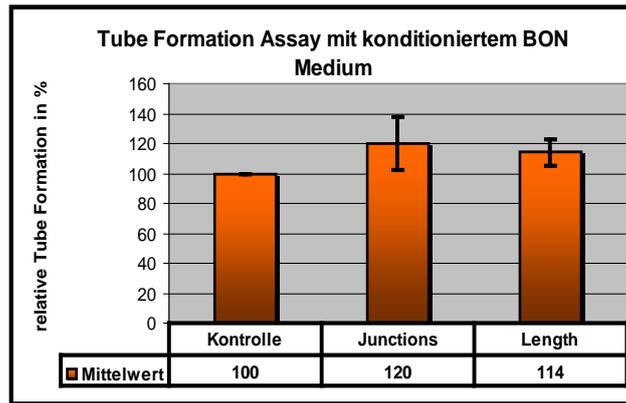


Abbildung 3.12: Graphische Auswertung der Tube Formation Assays mit konditioniertem BON Medium.

Tube Formation Assays mit konditioniertem HCT Medium				
Versuchsdatum	Verzweigungen		Länge	
	Angaben in Prozent		Angaben in Prozent	
	shMock	shPcd4	shMock	shPcd4
18.11.09	100	136,1	100	124,9
12.03.10	100	114,2	100	118,4
29.04.10	100	231,8	100	181,6
30.04.10	100	149,4	100	121,1
07.05.10	100	137,2	100	106,9
Mittelwert		154		131
STAB		45,5		29,3
P-Wert		0,029		0,040

Tabelle 3.5: Statistische Auswertung der Tube Formation Assays mit konditioniertem HCT Medium.

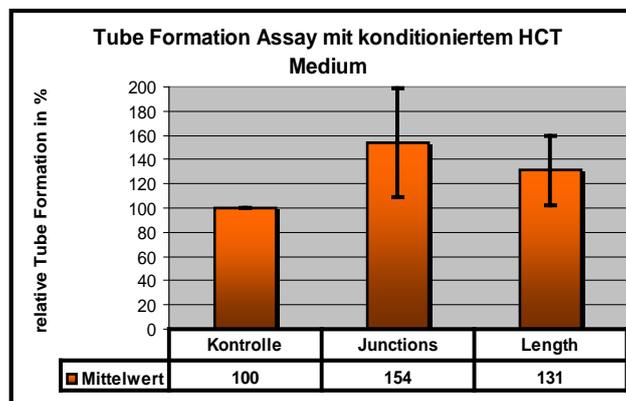


Abbildung 3.13: Graphische Auswertung der Tube Formation Assays mit konditioniertem HCT Medium.

3.7 Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2

In verschiedenen Veröffentlichungen wurden Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2 durchgeführt [71, 187]. Rekombinantes Ang2 wurde hinsichtlich seiner biologischen Aktivität geprüft und scheint die Funktionen seines natürlichen Proteins zu vermitteln [97]. In Tube Formation Assays mit steigenden Ang2 Konzentrationen (siehe Versuchsdurchführung Material und Methoden Kapitel 2.2.5) sollten zum einen die gefäßproliferativen Wirkungen auf HMEC-1 Zellen in Medium mit 10% FBS, zum anderen die gefäßregressive Veränderungen auf HMEC-1 Zellen in Medium mit 1% FBS, untersucht werden. Dabei wird angenommen, dass Ang2 in Gegenwart von VEGF (welches auch in FBS vorhanden ist) gefäßstimulierend und während des Fehlens von VEGF gefäßrückbildend wirkt [83, 139, 154].

Die folgenden Ergebnisse (Tabellen 3.6-3.9 und Abbildungen 3.14.-3.17) unterstützen die oben beschriebene Hypothese. Ang2 wirkt in Gegenwart von anderen Wachstumsfaktoren, die in hohen Konzentrationen in FBS vorhanden sind, neo-angiogenetisch und unter Karenz dieser angio-suppressiv. Für die Verzweigungen und die Länge zeigt sich in den Tube Formation Assays, mit 10% FBS im Medium, eine Ang2 konzentrationsabhängige Steigerung (Tabelle 3.6, 3.7 und Abbildung 3.14, 3.15). Im Einklang damit steht die Unterdrückung der Angiogenese in Versuchen mit 1% FBS im Medium (Tabelle 3.8, 3.9 und Abbildung 3.16, 3.17). Die Ergebnisse der HMEC-1 Zellen mit 1% FBS und Ang2 sind nicht wie bei 10% FBS und Ang2 konzentrationsabhängig aufgetragen, sondern zusammengefasst wurden. Gründe dafür sind: das nicht optimale Medium für die HMEC-1 Zellen, damit verbunden weniger und kleinere Tubes und daraus resultierend schlechter nachweisbare gefäßregressive Effekte. Letztendlich bestätigte sich auch, dass die angiogenetischen Effekte des konditionierten Mediums mit 10% FBS der BON-1- und HCT116-Zellen wirklich nur auf die erhöhten Konzentrationen von Ang2 zurück zuführen waren und nicht von anderen Wachstumsfaktoren stammten.

Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2						
Versuchsdatum	Verzweigungen (Angaben in Prozent)					
	Standard 10%	10ng/ml	50ng/ml	100ng/ml	200ng/ml	400ng/ml
20.01.10	100	142,9	156,3	169,6	197,3	
21.01.10	100	101,7	108,1	91,9	141,9	
29.01.10	100	57,6	115,2	181,8	169,7	
22.04.10	100		110,4	121,9	132,3	138,5
29.04.10	100		127,9	75,4	116,4	181,9
30.04.10	100		148,5	169,7	172,7	209,1
07.05.10	100		128	172,0	236,0	324,0
Mittelwert		101	128	140	167	213
STAB		42,7	18,7	43,5	41,1	79,3
P-Wert		0,49	0,004	0,025	0,003	0,032

Tabelle 3.6: Statistische Auswertung der Verzweigungen von Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2 in verschiedenen Konzentrationen in Medium mit 10% FBS.

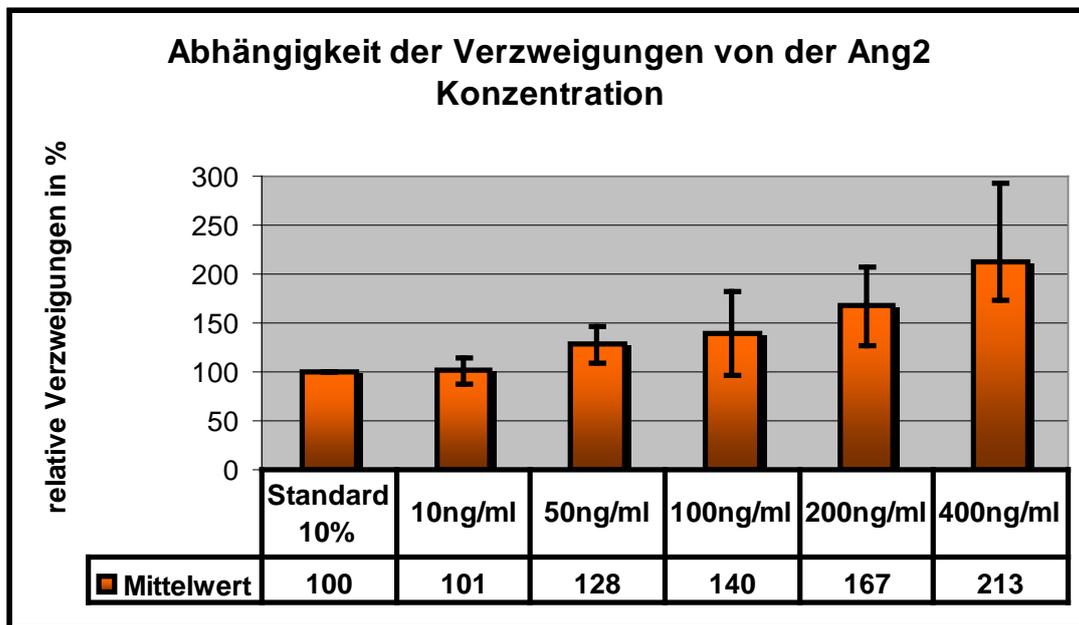


Abbildung 3.14: Graphische Auswertung der Verzweigungen von Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2 in verschiedenen Konzentrationen in Medium mit 10% FBS.

Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2						
Versuchsdatum	Länge (Angaben in Prozent)					
	Standard 10%	10ng/ml	50ng/ml	100ng/ml	200ng/ml	400ng/ml
20.01.10	100	84,2	105,8	75,6	44,9	
21.01.10	100	103,4	121,8	95,9	137,4	
29.01.10	100	72,0	131,1	226,6	148,1	
22.04.10	100		100,9	114,7	123,2	123,5
29.04.10	100		96,6	70,5	105,4	140,4
30.04.10	100		166,0	188,7	139,1	195,0
07.05.10	100		114,4	143,9	164,0	205,5
Mittelwert		87	120	131	123	166
STAB		15,8	23,8	59,0	39,1	40,3
P-Wert		0,139	0,036	0,108	0,084	0,023

Tabelle 3.7: Statistische Auswertung der Länge von Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2 in verschiedenen Konzentrationen in Medium mit 10% FBS.

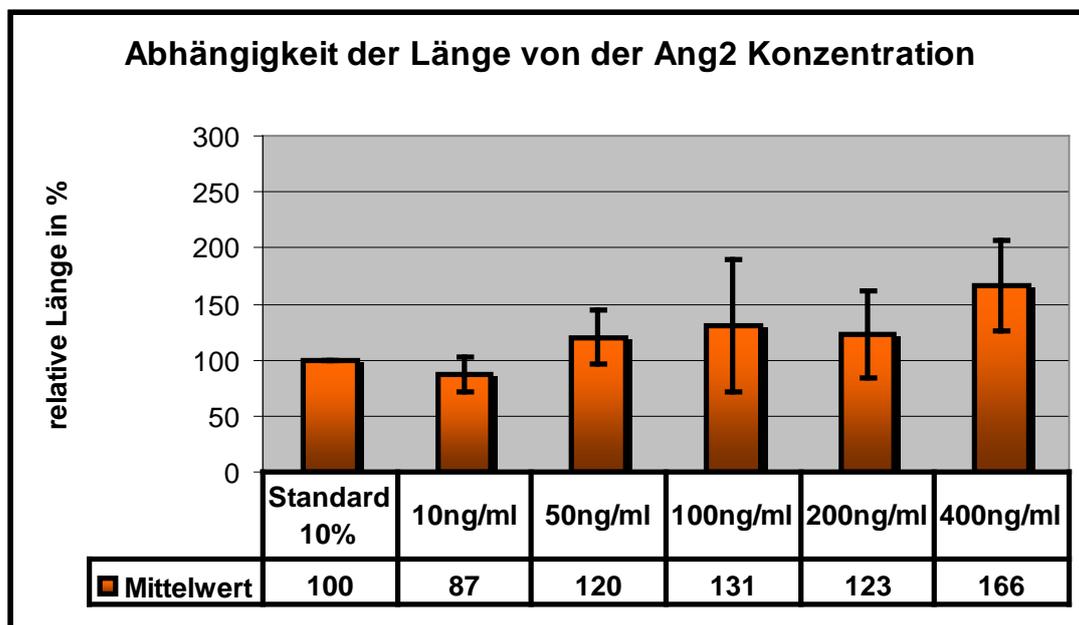


Abbildung 3.15: Graphische Auswertung der Länge von Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2 in verschiedenen Konzentrationen in Medium mit 10% FBS.

Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2					
Versuchsdatum	Verzweigungen (Angaben in Prozent)				
	Standard 1%	10ng/ml	50ng/ml	200ng/ml	400ng/ml
14.01.10	100				87,7
20.01.10	100	68,3		29,2	
21.01.10	100	75,6		80,2	
29.01.10	100			51,4	
22.04.10	100		53,8		80,2
29.04.10	100		82,9		77,1
Mittelwert		69			
STAB		18,3			
P-Wert		0,0002			

Tabelle 3.8: Statistische Auswertung der Verzweigungen von Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2 in verschiedenen Konzentrationen in Medium mit 1% FBS.

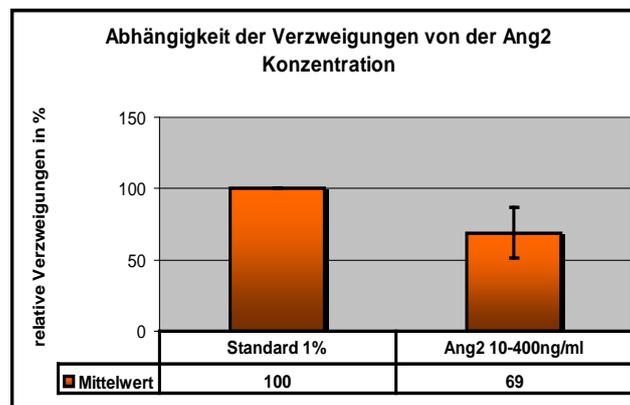


Abbildung 3.16: Graphische Auswertung der Verzweigungen von Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2 in verschiedenen Konzentrationen in Medium mit 1% FBS.

Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2					
Versuchsdatum	Länge (Angaben in Prozent)				
	Standard 1%	10ng/ml	50ng/ml	200ng/ml	400ng/ml
14.01.10	100				96,1
20.01.10	100	76,3		29,9	
21.01.10	100	93,2		92,3	
29.01.10	100			59,0	
22.04.10	100		72,1		86,6
29.04.10	100		84,1		72,5
Mittelwert		76			
STAB		20,0			
P-Wert		0,0022			

Tabelle 3.9: Statistische Auswertung der Länge von Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2 in verschiedenen Konzentrationen in Medium mit 1% FBS.

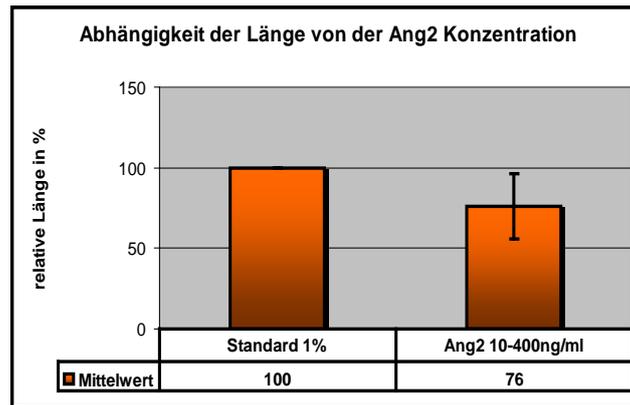


Abbildung 3.17: Graphische Auswertung der Länge von Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2 in verschiedenen Konzentrationen in Medium mit 1% FBS.

3.8 Boyden Chamber Assays mit konditioniertem Medium

Der Boyden Chamber Assay ist eine *in vitro* Methode um die Migrationsfähigkeit von Zellen zu untersuchen. Dabei können Zellen innerhalb eines Inserts durch eine Porenmembran zu dem stimulierenden Agens in ein Well wandern. Aufgrund der Annahme das Ang2 neben der Gefäßbildung auch die Migration von endothelialen Zellen fördert, wurde der Einfluss von konditioniertem BON-1- oder HCT116-Medium auf HMEC-1 Zellen untersucht. Gemäß der Versuchsdurchführung (siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.6) sind 40.000 HMEC-1 Zellen pro Insert in ihrem Standardmedium (500µl mit 10% oder 1% FBS) mit 750µl konditioniertem Medium (mit 10% oder 1% FBS) pro Well für 4-6h inkubiert wurden. Die erhöhte Ang2 Konzentration in dem Mediumüberstand von shPdcd4 transfizierten BON-1- oder HCT116-Zellen sollte die Migration anregen.

Die nachstehenden statistischen und graphischen Auswertungen der Boyden Chamber Assays belegen einen deutlichen promigratorischen Effekt von dem konditionierten Medium auf die HMEC-1 Zellen. Dieser Effekt zeigt sich sowohl in Versuchen mit 10% FBS in HMEC-1 Medium und konditioniertem Medium als auch für Versuche mit 1% FBS. Neben den Erkenntnissen der Tube Formation Assays konnten die Ergebnisse der Boyden Chamber Assays die vermutete erhöhte Ang2 Sekretion im

Mediumüberstand von BON-1- oder HCT116-Zellen, in denen Pcd4 stabil herunterreguliert wurde (durch shPcd4), bestätigen.

Boyden Chamber Assays mit 10% FBS im konditionierten BON Medium		
Versuchsdatum	Migration Angaben in Prozent	
	shMock	shPcd4
29.10.09	100	125,0
17.12.09	100	123,8
22.12.09	100	170,0
26.02.10	100	114,3
25.03.10	100	120,8
Mittelwert		131
STAB Mittelwert		22,3
P-Wert		0,018

Boyden Chamber Assays mit 1% FBS im konditionierten BON Medium		
Versuchsdatum	Migration Angaben in Prozent	
	shMock	shPcd4
29.10.09	100	115,2
25.11.09	100	110,2
25.11.09	100	149,9
17.12.09	100	114,0
25.03.10	100	102,8
Mittelwert		118
STAB Mittelwert		18,3
P-Wert		0,043

Tabelle 3.10 und 3.11: Statistische Auswertung der Boyden Chamber Assays mit 10% und 1% FBS im konditionierten BON Medium.

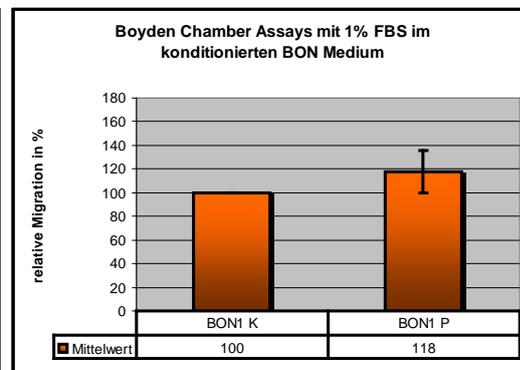
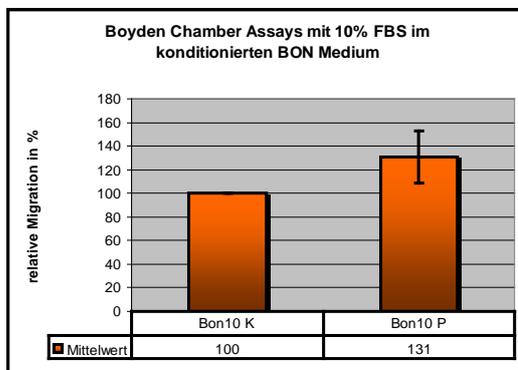


Abbildung 3.18 und 3.19: Graphische Auswertung der Boyden Chamber Assays mit 10% und 1% FBS im konditionierten BON Medium.

Boyden Chamber Assays mit 10% FBS im konditionierten HCT Medium		
Versuchsdatum	Migration Angaben in Prozent	
	shMock	shPdc4
29.10.09	100	104,8
25.11.09	100	107,4
17.12.09	100	112,5
26.02.10	100	126,8
25.03.10	100	105,9
Mittelwert		111
STAB Mittelwert		9,1
P-Wert		0,024

Boyden Chamber Assay mit 1% FBS im konditionierten HCT Medium		
Versuchsdatum	Migration Angaben in Prozent	
	shMock	shPdc4
29.10.09	100	125,6
25.11.09	100	113,2
22.12.09	100	135,4
26.02.10	100	128,5
25.03.10	100	112,5
Mittelwert		123
STAB Mittelwert		10,0
P-Wert		0,003

Tabelle 3.12 und 3.13: Statistische Auswertung der Boyden Chamber Assays mit 10% und 1% FBS im konditionierten HCT Medium.

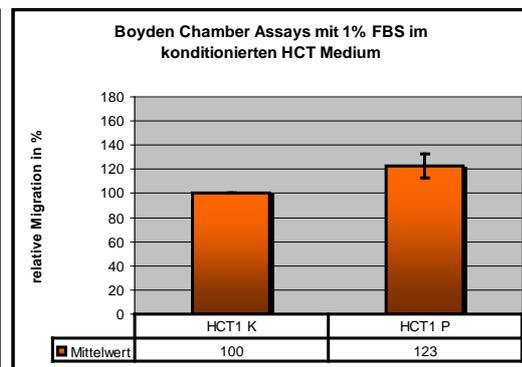
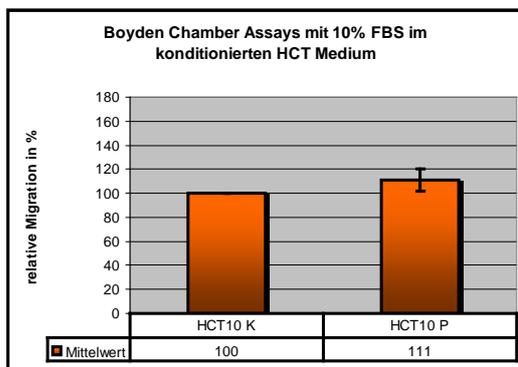


Abbildung 3.20 und 3.21: Graphische Auswertung der Boyden Chamber Assays mit 10% und 1% FBS im konditionierten HCT Medium.

3.9 Cell Invasion Assays mit konditioniertem Medium

Dieser Versuch ist in seinem Aufbau ähnlich dem des Boyden Chamber Assay. Allerdings befindet sich hier auf dem Insert zusätzlich eine Matrigelschicht (Durchführung siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.7). Dabei sollen die Zellen zuerst aktiv durch das Gel und dann durch die 8,0 μm dicke Porenmembran migrieren. Das Experiment funktionierte nicht, da die HMEC-1 Zellen in dem Matrigel nicht migrierten, sondern ausschließlich Tubes bildeten. Auch über einen Zeitraum von 48h fand keine Migration statt. Daraufhin wurden weitere Durchführungen abgebrochen.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Das Zusammenspiel von Malignität, Angiopoietin2 und dem Tumorsuppressor Pdc4

Im Jahr 2006 erkrankten alleine in Deutschland ca. 426.800 Menschen an Krebs. Für das Jahr 2010 erwartet das RKI (Robert-Koch-Institut) einen weiteren Anstieg der Inzidenz auf ca. 450.200. Ein Grund für den stetigen Aufwärtstrend ist der demographische Wandel in unserer Gesellschaft. Vor 30 Jahren gab es in Deutschland in der männlichen Bevölkerung ca. 80% und in der weiblichen ca. 35% weniger Krebsneuerkrankungen. Insgesamt lebten in der Bundesrepublik 2006 ca. 1,4 Millionen Krebskranke, deren Diagnose nicht länger als 5 Jahre zurücklag, bzw. 2,1 Millionen, deren Diagnose nicht länger als 10 Jahre zurücklag - bei steigender Prävalenz bis heute (Quelle: RKI, Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends). Dabei bildet Krebs mit rund 25% die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit ca. 40%. Während an malignen Erkrankungen ca. 216.010 Menschen verstarben, erlagen ca. 356.729 Menschen Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Zahlen von 2008, Statistisches Bundesamt Deutschland).

Maligne Neoplasien zeichnen sich durch unreguliertes Wachstum, Neoangiogenese, Gewebeinvasion und Metastasierung aus. Für das Wachstumsverhalten von primären Tumoren und deren Metastasierung ist der angiogene Switch von entscheidender Bedeutung [94, 151]. Dieser Vorgang beschreibt die Fähigkeit eines Tumors Gefäßneubildung (Neoangiogenese) zu induzieren und damit das dynamische Gleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren zu Gunsten der Gefäßneubildung zu kippen. Die Tumorzellen sezernieren angiogene Signalstoffe und fördern damit die Proliferation und Einwanderung von Endothelzellen. Unter den angiogenen Faktoren nehmen VEGFs und Angiopoietine eine besondere Stellung ein.

Ang2, eines von vier Mitgliedern der Angiopoietin-Familie, wird physiologisch in Geweben mit vermehrtem Gefäßumsatz exprimiert, vorrangig in Endothelzellen, und fördert Angiogenese durch Destabilisierung von Blutgefäßen [80, 82, 175]. Die destabilisierenden Effekte beziehen die Fähigkeit von Ang2 als Antagonist oder partieller Agonist am Tie-2 Rezeptor ein, die stabilisierenden Funktionen von Ang1 zu unterbinden [70]. Bei der Hemmung von Ang2 konnte dadurch auch eine erhöhte Gefäßbeständigkeit und herabgesetzte Angiogenese beobachtet werden [18]. In einer Vielzahl von Tumoren bewiesen verschiedene Arbeitsgruppen eine erhöhte Ang2 Expression auf mRNA- und/ oder Proteinebene [43, 151]. Die Funktion dieser erhöhten Ang2 Spiegel könnte darin bestehen, das gefäßstabilisierende Ang1-/ Tie-2 Signal zu stören, damit tumorexprimiertes VEGF das Sprossen von bestehenden Gefäßen induzieren kann. Es verstärkt dadurch die VEGF Antwort [35, 80, 82], wobei VEGF in endothelialen Zellen auch direkt die Ang2 Erzeugung erhöhte [200], im Sinne einer positiven proangiogenetischen Rückkopplung. Für Ang2 konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von VEGF Ang2 die Angiogenese induziert und - wie oben beschrieben - zu einer gesteigerten Stimulation des VEGF-Signals führt. Allerdings supprimiert Ang2 ohne VEGF die Angiogenese und fördert die Gefäßrückbildung [80, 82]. Neben der Angiogenese in Verbindung mit VEGF war eine übermäßige Ang2 Bildung auch eng mit Tumorprogression, Tumordinfiltration und Metastasierung in verschiedenen Tumorentitäten verknüpft [26, 81, 85, 155]. Zusätzlich zeigten sich erhöhte Ang2 Serumwerte in einigen Karzinomen mit wichtiger prognostischer Relevanz, da sie die Tumorprogression und das klinische Ergebnis/ Patientenüberleben beeinflussten [8, 25, 52, 73, 89, 95]. Zusammenfassend betrachtet ist Ang2 ein interessanter therapeutischer Angriffspunkt, um die Angiogenese in Tumoren zu inhibieren. Für VEGF z.B. wurde in bislang vier randomisierten klinischen Phase-III-Studien, metastasierte Kolon-, Mamma-, und nicht kleinzellige Bronchialkarzinome ohne Plattenepithelkarzinome betreffend, mit Bevacizumab (Avastin®: humaner monoklonaler Antikörper, der VEGF bindet und inaktiviert) in Kombination mit Chemotherapie eine signifikante Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zur Chemotherapie alleine erzielt. Verschiedene Inhibitionsmöglichkeiten konnten für Ang2 auch schon beschrieben werden [24, 135, 136, 143, 162], daneben auch spezielle Antikörper [84]. Neuere Studien präsentierten vielversprechende Daten über Ang2-Antikörper/ Peptidfusionsproteine, auch in Verbindung mit VEGF-Inhibitoren, die das

Tumorwachstum und die Angiogenese hemmen und damit das Überleben verlängern könnten [14, 18, 56].

Nun stellt sich die wichtige Frage, aufgrund welcher molekularbiologischer Grundlagen Ang2 reguliert wird? Neben der direkten antikörpergebundenen Hemmung wäre es von besonderem Interesse herauszufinden, wie Ang2 in Tumoren verstärkt exprimiert wird, um eventuell diesen initialen Weg zu unterbinden. Der physiologische Hauptproduktionsort von Ang2 befindet sich in Endothelzellen [82, 139]. Dazu passend bewiesen einige Studien eine vermehrte Ang2 Bildung in Endothelzellen von Tumoren [35, 84, 200]. Eine Möglichkeit der Regulierung von Ang2 in Endothelzellen stellt die transkriptionale Kontrolle durch die Transkriptionsfaktoren FOXO1 und FOXC2 dar. Eine siRNA induzierte Reduzierung von FOXO1 führte dabei zu einem Abfall der Ang2 Bildung [111]. Die FOXC2 Überexpression in transgenen Mäusen steigerte die Ang2 Bildung und kippte damit das angiogene Gleichgewicht zu Gunsten der Neoangiogenese [193]. Eine indirekte transkriptionale Regulierung von Ang2 konnte sich auch durch Glukose nachweisen lassen. Erhöhte Glukosespiegel beeinflussten den transkriptionalen Kosuppressor mSin3A, der über weitere Signalwege eine zunehmende Ang2 Expression in Endothelzellen einleitete [34]. Einen positiven Einfluss auf die Ang2 mRNA Expression und Protein Synthese induzierten auch hypoxische Zustände [38, 50, 114].

Weshalb neben Endothelzellen auch Tumorzellen vermehrt Ang2 produzieren, ist weniger ausreichend untersucht [91, 152, 169]. Die Ergebnisse in dieser Arbeit (Abbildung 3.2-3.4, 3.6-3.8) zeigen eine Regulierung von Ang2 durch Pdc4 auf Transkriptionsebene mit daraus resultierender Verminderung von Ang2 mRNA und Protein. Diese Steuerung findet sich nicht nur in einer Vielzahl von reinen Tumorzelllinien des pankreatiko-gastro-intestinalen Traktes, sondern lässt sich auch in Tumorzelllinien der Mamma, der Leber und in der embryonalen Niere nachweisen. Zusätzlich wurde in der immortalisierten humanen mikrovaskulären endothelialen Zelllinie HMEC-1 ebenfalls diese Regulierungsmöglichkeit von Ang2 durch Pdc4 belegt. Damit könnte Pdc4 einen übergeordneten Regulator von Ang2 in Tumorzelllinien und in endothelialen Zellen darstellen.

Allerdings konnte in PSC- und MDA-231 Zellen keine Regulierung der Ang2 Proteinexpression durch Pdc4 nachgewiesen werden. In MDA-231 Zellen zeigte sich zwar eine gesteigerte Ang2 Expression in den mit siPdc4 transfizierten Zellen, aber der Nachweis von verringertem Pdc4 Protein gelang nicht. In mehreren Western Blots

konnte kein Signal für Pdc4, wahrscheinlich bedingt durch eine zu geringe Menge dieses Proteins, nachgewiesen werden. Die Western Blots der PSCs zeigten eine Verminderung der Pdc4 Expression unter siPdc4 Behandlung. Trotz kürzester Belichtung konnten aber keine Unterschiede in der Ang2 Expression festgestellt werden.

Programmed cell death 4 (Pdc4) Protein wird schon seit längerer Zeit als neuer Tumorsuppressor oder „transformation inhibitor“ gehandelt. Die putative Steuerung von Ang2 würde sich in einer Vielzahl solcher Funktionen einreihen. Pdc4 steuert über den MAP4K1 – JNK Pfad die Transaktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 [68, 121] und verhindert das Zellwachstums und die Zellinvasion in Tumoren [106, 113, 129]. Andere Arbeiten bestätigten, dass hohe Pdc4 Mengen die maligne Transformation und Tumorprogression in vitro [32, 66, 153, 186] und in vivo [11, 199] unterdrückten. Nicht zuletzt aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften und der damit verbundenen Hemmung der „cap-dependent“ Translation scheint Pdc4 dafür prädestiniert zu sein [3, 30, 140, 186]. Parallel dazu und der Auffassung entsprechend, dass Pdc4 ein Tumorsuppressor ist, zeigte sich in diversen Tumoren eine Herunterregulierung von Pdc4 auf mRNA- und/ oder Protein Ebene [10, 44, 45, 149, 178, 182, 185, 195] mit der Folge einer Tumorprogression und geringeren Patientenüberlebens [46, 51, 126, 182]. Auf der einen Seite wird dabei das Pdc4 Protein vorrangig durch den PI3K/Akt/S6K1 („mTOR ribosomal protein S6 kinase 1“) Signalweg schrittweise abgebaut [28, 127, 168], auf der anderen Seite führt miR-21 zu einer Hemmung der Pdc4 mRNA Translation [23, 79, 184]. Beides sind Pfade, die stark in die Karzinogenese involviert sind und während dieser hochreguliert werden [33, 191].

Aus der Tatsache, dass Pdc4 als ein vielversprechender Faktor im Rahmen neuer anti-neoplastischer Therapien angesehen wird, ergibt sich nun die Frage, wie Pdc4 auf therapeutischer Ebene angewendet werden könnte. Einige Studien zeigten, dass hohe Pdc4 Level größere Ansprechraten für Chemotherapeutika bei diversen Tumoren bewirkten [10, 107, 113], wobei Chemotherapeutika wiederum die Pdc4 Konzentrationen erhöhen konnten [130, 195, 198]. Dadurch wären Pdc4 Konzentrationsbestimmungen in Tumoren ein relevanter prognostischer Faktor vor Beginn einer Therapie. Weiter bewiesen in vivo Versuche an Mäusen mit oder ohne Lungentumoren, dass die Aerosolfreisetzung von Pdc4 gekoppelt an ein Trägersystem Apoptose fördern sowie zellproliferatorische und tumorangiogenetische Wege

inhibieren konnte [57, 160]. Hinzu kommt nun ein weiterer therapeutischer Ansatz. Mit der möglichen Steuerung von Ang2 durch Pcd4 bindet sich der Tumorsuppressor direkt in die Neoangiogenese von Tumoren ein und unterstreicht damit seine Bedeutung in der Entwicklung maligner Neoplasien. Insgesamt gesehen ist eine Wiederherstellung („restoring“) der Pcd4 Expression in Tumoren und die damit verbundene Überführung in die aktive Rolle als Tumorsuppressor ein Hauptanliegen möglicher therapeutischer Ansätze.

4.2 Funktionelle Bedeutung der gesteigerten Ang2 Konzentration

Ob die nachgewiesene vermehrte Ang2 Bildung in den verschiedenen Tumor-Zelllinien wirklich zu neoplastischen Effekten beiträgt, sollten weitere in vitro Versuche bestätigen. Vorarbeiten in unserem Labor wurden an BON-1- und HCT116 Zellen durchgeführt. BON-1 Zellen stammen aus einem neuroendokrinen Tumor des Pankreas und HCT116 Zellen aus einem Kolonkarzinom. Diese Zelllinien sind hinsichtlich ihrer Herkunft, ihres Expressions- und Sekretionsverhaltens sehr unterschiedlich. Pcd4 inhibierte die Expression der Carboanhydrase II und korrelierte invers mit dem Zellwachstums in BON-1 Zellen [53, 106]. Außerdem scheint Pcd4 an der Tumorentwicklung und Progression in neuroendokrinen Zellen beteiligt zu sein [164]. Eine Ausschaltung von Pcd4 mittels stabiler Transfektion steigerte dort die Sekretion von Chromogranin A und Sekretogranin II [105]. Vor allem aber der direkte Vergleich von BON-1- und HCT116 Zellen, die Pcd4 überexprimierten, offenbarte hinsichtlich verschiedener Proteine des Zellzyklus und der Apoptose keine Übereinstimmungen [107]. Danach lag der Verdacht nahe, dass Pcd4 eher zelltypspezifisch und in Abhängigkeit des genetischen Hintergrundes agiert. In weiteren Untersuchungen wurde in diesen Zelllinien diesmal die Pcd4 Expression durch stabile shPcd4 Transfektion herunterreguliert. Eine cDNA Microarray Analyse bewies eine massive Steigerung von Ang2 unter Pcd4 Verlust in BON-1- und HCT116 Zellen, welches sich in semiquantitativen RT-PCRs und Western Blots bestätigte. Fraglich war aber, ob eine erhöhte endogene Expression von Ang2 auch zu einer gesteigerten Sekretion führen

könnte [174]. In Western Blot-Versuchen mit Mediumüberstand von BON-1- und HCT116 Zellen, die mit shPdc4 stabil transfiziert und Mediumüberstand von Capan1- und Imim PC1 Zellen, die mit siPdc4 transient transfiziert wurden, ergaben sich Hinweise, dass Ang2 tatsächlich vermehrt sezerniert wird (Abbildung 3.9). Kritisch zu betrachten war dabei das Einfrieren des Mediumüberstandes zwecks einer längeren Lagerfähigkeit. Wahrscheinlich bewirkte das Aliquotieren, das mehrmalige Einfrieren und Auftauen des Mediumüberstandes für die Durchführung mehrerer Versuche einen sichtlichen Wirkungsverlust, vermutlich durch sukzessiven Abbau von Ang2. Nichtsdestotrotz zeigten die Tube Formation Assays mit dem konditionierten Medium von BON-1- und HCT116 Zellen (Abbildung 3.11-3.13, Tabelle 3.4, 3.5) einen signifikanten angiogenetischen Stimulus vermittelt über Ang2. Sowohl die Kontrollen (siMock) als auch die Proben (siPdc4) sind immer mit Medium mit gleichen Mengen an FBS behandelt wurden, das heißt in dem Medium der HMEC-1 Zellen und in dem konditionierten Medium waren stets 10% FBS und damit gleich viele Wachstumsfaktoren vorhanden. Eine Reduzierung von FBS war aus unten genannten Gründen nicht möglich. Neben den angiogenetischen Eigenschaften von Ang2 führten einige Studien zu dem Ergebnis, dass Ang2 auch die Migration *in vitro* fördert [70, 71]. Die Resultate der Boyden Chamber Assays (Abbildung 3.18-3.21, Tabelle 3.10-3.13), ebenfalls mit konditioniertem Medium von BON-1- und HCT116 Zellen durchgeführt, wiesen eine promigratorische Wirkung von Ang2 auf die endothelialen Zellen nach. Sowohl für die Tube Formation als auch für die Boyden Chamber Assays wurden Versuche mit 0% FBS im Standardmedium der HMEC-1 Zellen und des konditionierten Mediums angestrebt. Dabei offenbarte sich, dass die HMEC-1 Zellen entgegen der beschriebenen Literatur nicht in Abwesenheit von FBS überleben konnten [39]. Eine Reduzierung der Wachstumsfaktoren im FBS war daher nicht möglich. Das zweite Problem stellte die unterschiedliche Zusammensetzung der Medien von HMEC-1 Zellen und der konditionierten Medien von BON-1- und HCT116 Zellen dar. In Vorversuchen zeigte die alleinige Inkubation von HMEC-1 Zellen mit konditioniertem Medium kein gut reproduzierbares Ergebnis, da das optimale Wachstumsmilieu für die Zellen nicht gegeben war. Erst die Kombination zwischen HMEC-1 Standardmedium mit konditioniertem Medium erwies sich als sinnvoll. Schließlich sollten die Ergebnisse des endogen vermehrt exprimierten und dadurch vermehrt sezernierten Ang2 auch durch Versuche mit rekombinanten Ang2 bestätigt werden [97]. Einige Arbeitsgruppen arbeiteten damit bereits erfolgreich an Tube Formation Assays [71, 187]. Ang2 steigerte

konzentrationsabhängig die Länge und Verzweigungen von Gefäßen, beides zusammen ein indirektes Maß für die Angiogenese in Gegenwart von HMEC-1 Medium mit 10% FBS. Weiterhin präsentierten sich gefäßrückbildende Wirkungen in Gegenwart des HMEC-1 Mediums mit 1% FBS. Dies steht im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen VEGF-Abhängigkeit der Ang2 Funktionen [80, 82, 139]. Die Ergebnisse mit rekombinanten Ang2 und 10% FBS im Medium bestätigten aber, auch im Hinblick auf die Versuche mit konditioniertem Medium, dass der gefäßbildende Stimulus wirklich nur von der erhöhten Ang2 Expression stammt und nicht von weiteren Wachstumsfaktoren.

4.3 Modellvorstellung

Die nachfolgenden zwei Modelle fassen in Kürze das Zusammenspiel zwischen dem putativen Tumorsuppressor Pcd4 und dem gefäßdestabilisierenden Protein Ang2 zusammen. Nicht berücksichtigt in diesen Abbildungen, aber sicherlich von entscheidender Bedeutung, ist die VEGF-Abhängigkeit von Ang2.

Abbildung 4.1 beschreibt die Konstellation von hohen Pcd4 Mengen und geringer Ang2 Expression wie sie charakteristisch für normale, d.h. gesunde Zellen ist. Unter Einbeziehung der vorhandenen Datenlage würde in vielen Tumoren diese Vergesellschaftung zum einen ein nicht fortgeschrittenes Krankheitsstadium vermuten lassen bzw. ein weiteres Fortschreiten der Erkrankung verhindern und zum anderen einen günstigen Heilungsverlauf bei adäquater Therapie fördern.

Die Konstellation wie sie in Abbildung 4.2 zusehen ist, mit reduzierten Pcd4 Mengen und gesteigerter Ang2 Expression, ist in vielen bösartigen Tumoren zu finden. Dabei scheint dieses Zusammenspiel hinsichtlich Tumorwachstum, Metastasierung und schließlich auch Überlebenszeit einen negativen prognostischen Vorhersagewert zu liefern. Neben der Möglichkeit, über gezielte Antikörpertherapien die Ang2 Produktion und damit die Neoangiogenese zu unterbrechen, stellt die Wiederherstellung der unterdrückten Pcd4 Expression einen wichtigen Grundpfeiler dar. Dieser Zustand gleicht eher dem als physiologisch geltenden Modell von Abbildung 4.1. Wie bereits erwähnt reguliert Pcd4 über mannigfaltige Wege die Zellproliferation, das

Zellwachstum und wahrscheinlich auch die maligne Transformation. Die Eigenschaft, Ang2 zu kontrollieren und Migration sowie Neoangiogenese zu verhindern, belegt seine Funktion als Tumorsuppressor.

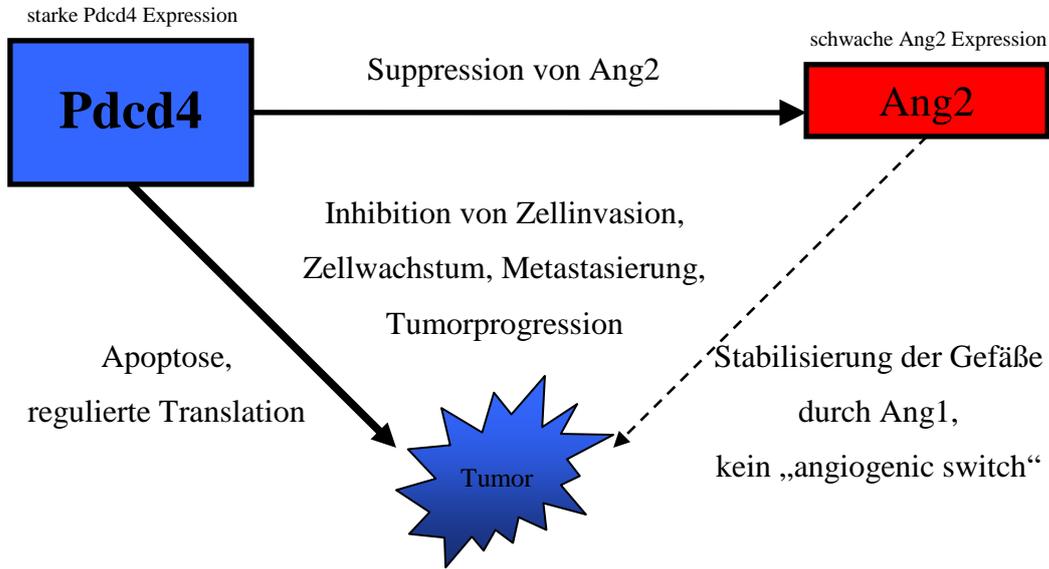


Abbildung 4.1: Zusammenspiel hoher Pdc4 Mengen und geringer Ang2 Expression.

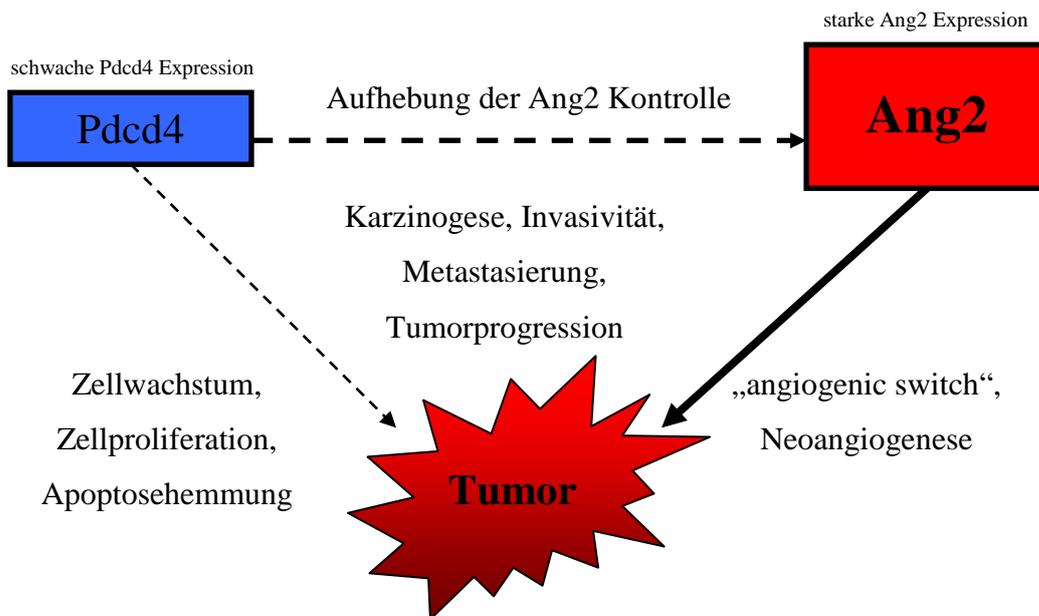


Abbildung 4.2: Zusammenspiel niedriger Pdc4 Mengen und hoher Ang2 Expression.

Literaturverzeichnis

- [1] A, Das et al. "Angiopoietin/Tek interactions regulate mmp-9 expression and retinal neovascularization." Lab Invest JT - Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 83.11 (2003 Nov): 1637-45.
- [2] AN, Santhanam, AR, Baker, G, Hegamy, DA, Kirschmann, and Colburn NH. "Pcd4 repression of lysyl oxidase inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion." Oncogene JT - Oncogene .1476-5594 (Electronic); 0950-9232 (Linking) (2010 May 24):.
- [3] A, Goke et al. "DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A." Biochem Biophys Res Commun JT - Biochemical and biophysical research communications 297.1 (2002 Sep 13): 78-82.
- [4] A, Hegen et al. "Expression of angiopoietin-2 in endothelial cells is controlled by positive and negative regulatory promoter elements." Arterioscler Thromb Vasc Biol JT - Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 24.10 (2004 Oct): 1803-9.
- [5] A, Hilliard et al. "Translational regulation of autoimmune inflammation and lymphoma genesis by programmed cell death 4." J Immunol JT Journal of immunology (Baltimore, Md.) 11 (2006):.
- [6] A, Jurisicova et al. "Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development." Mol Reprod Dev JT - Molecular reproduction and development 51.3 (1998 Nov): 243-53.
- [7] A, Palamarchuk et al. "Akt phosphorylates and regulates Pcd4 tumor suppressor protein." Cancer Res JT - Cancer research 65.24 (2005 Dec 15): 11282-6.
- [8] A, Scholz et al. "Angiopoietin-2 serum levels are elevated in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma." Am J Gastroenterol JT - The American journal of gastroenterology 102.11 (2007 Nov): 2471-81.
- [9] A, Stratmann, W, Risau, and Plate KH. "Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis." Am J Pathol JT - The American journal of pathology 153.5 (1998 Nov): 1459-66.
- [10] AP, Jansen et al. "Characterization of programmed cell death 4 in multiple human

- cancers reveals a novel enhancer of drug sensitivity." Mol Cancer Ther JT - Molecular cancer therapeutics 3.2 (2004 Feb): 103-10.
- [11] AP, Jansen, CE, Camalier, and Colburn NH. "Epidermal expression of the translation inhibitor programmed cell death 4 suppresses tumorigenesis." Cancer Res JT - Cancer research 65.14 (2005 Jul 15): 6034-41.
- [12] B, Hu et al. "Angiopoietin 2 induces glioma cell invasion by stimulating matrix metalloprotease 2 expression through the alphavbeta1 integrin and focal adhesion kinase signaling pathway." Cancer Res JT - Cancer research 66.2 (2006 Jan 15): 775-83.
- [13] B, Hu et al. "Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloprotease-2." Proc Natl Acad Sci U S A JT - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100.15 (2003 Jul 22): 8904-9.
- [14] BL, Falcon et al. "Contrasting actions of selective inhibitors of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 on the normalization of tumor blood vessels." Am J Pathol JT - The American journal of pathology 175.5 (2009 Nov): 2159-70.
- [15] BW, Ozanne et al. "Transcriptional regulation of cell invasion: AP-1 regulation of a multigenic invasion programme." Eur J Cancer JT - European journal of cancer (Oxford, England : 1990) 36.13 Spec No (2000 Aug): 1640-8.
- [16] Bohm M., et al. "The transformation suppressor protein Pcd4 shuttles between nucleus and cytoplasm and binds RNA." Oncogene JT - Oncogene 22.31 (2003 Jul 31): 4905-10.
- [17] Bonome T., et al. "Expression profiling of serous low malignant potential, low-grade, and high-grade tumors of the ovary." Cancer Res JT - Cancer research 65.22 (2005 Nov 15): 10602-12.
- [18] Brown J. L., et al. A human monoclonal anti-ANG2 antibody leads to broad antitumor activity in combination with VEGF inhibitors and chemotherapy agents in preclinical models. Vol. 9., 145-56.
- [19] C, Daly et al. "Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1)." Genes Dev JT - Genes ; development 18.9 (2004 May 1): 1060-71.
- [20] C, Daly et al. Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. Vol. 103., 15491-6.
- [21] C, Jang et al. "Angiopoietin-2 exocytosis is stimulated by sphingosine-1-phosphate

- in human blood and lymphatic endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol JT - Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 29.3 (2009 Mar): 401-7.
- [22] C, Lemieux et al. "Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses." Blood JT - Blood 105.4 (2005 Feb 15): 1523-30.
- [23] C, Liu et al. "MicroRNA-21 acts as an oncomir through multiple targets in human hepatocellular carcinoma." J Hepatol JT - Journal of hepatology .0168-8278 (Electronic); 0168-8278 (Linking) (2010 Apr 4):.
- [24] C, Melani et al. "Angiopoietin decoy secreted at tumor site impairs tumor growth and metastases by inducing local inflammation and altering neoangiogenesis." Cancer Immunol Immunother JT - Cancer immunology, immunotherapy : CII 53.7 (2004 Jul): 600-8.
- [25] C, Schliemann et al. "Circulating angiopoietin-2 is a strong prognostic factor in acute myeloid leukemia." Leukemia JT - Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K 21.9 (2007 Sep): 1901-6.
- [26] C, Sfiligoi et al. "Angiopoietin-2 expression in breast cancer correlates with lymph node invasion and short survival." Int J Cancer JT - International journal of cancer. Journal international du cancer 103.4 (2003 Feb 10): 466-74.
- [27] C, Suzuki et al. "PDCD4 inhibits translation initiation by binding to eIF4A using both its MA3 domains." Proc Natl Acad Sci U S A JT - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105.9 (2008 Mar 4): 3274-9.
- [28] CB, Carlson et al. "Development of LanthaScreen cellular assays for key components within the PI3K/AKT/mTOR pathway." J Biomol Screen JT - Journal of biomolecular screening : the official journal of the Society for Biomolecular Screening 14.2 (2009 Feb): 121-32.
- [29] CH, Cho et al. "COMP-Ang1: a designed angiopoietin-1 variant with nonleaky angiogenic activity." Proc Natl Acad Sci U S A JT - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101.15 (2004 Apr 13): 5547-52.
- [30] CP, Ponting. "Novel eIF4G domain homologues linking mRNA translation with nonsense-mediated mRNA decay." Trends Biochem Sci JT - Trends in

- biochemical sciences 25.9 (2000 Sep): 423-6.
- [31] CY, Chien et al. "Angiopoietin-1 and -2 expression in recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity." J Surg Oncol JT - Journal of surgical oncology 97.3 (2008 Mar 1): 273-7.
- [32] Cmarik J. L., et al. "Differentially expressed protein Pcd4 inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation." Proc Natl Acad Sci U S A JT - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96.24 (1999 Nov 23): 14037-42.
- [33] D, Frescas, and Pagano M. "Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer." Nat Rev Cancer JT - Nature reviews. Cancer 8.6 (2008 Jun): 438-49.
- [34] D, Yao et al. "High glucose increases angiopoietin-2 transcription in microvascular endothelial cells through methylglyoxal modification of mSin3A." J Biol Chem JT - The Journal of biological chemistry 282.42 (2007 Oct 19): 31038-45.
- [35] D, Zagzag et al. "In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis." Exp Neurol JT - Experimental neurology 159.2 (1999 Oct): 391-400.
- [36] DC, Gallagher et al. "Circulating angiopoietin 2 correlates with mortality in a surgical population with acute lung injury/adult respiratory distress syndrome." Shock JT - Shock (Augusta, Ga.) 29.6 (2008 Jun): 656-61.
- [37] DM, Valenzuela et al. "Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans." Proc Natl Acad Sci U S A JT - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96.5 (1999 Mar 2): 1904-9.
- [38] EL, Lund et al. "Differential regulation of VEGF, HIF1alpha and angiopoietin-1, -2 and -4 by hypoxia and ionizing radiation in human glioblastoma." Int J Cancer JT - International journal of cancer. Journal international du cancer 108.6 (2004 Mar 1): 833-8.
- [39] EW, Ades et al. "HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line." J Invest Dermatol JT - The Journal of investigative dermatology 99.6 (1992 Dec): 683-90.
- [41] EW, Ades et al. "Viral susceptibility of an immortalized human microvascular endothelial cell line." J Virol Methods JT - Journal of virological methods 39.1-2 (1992 Sep): 83-90.

- [42] EY, Shin, SY, Kim, and Kim EG. "c-Jun N-terminal kinase is involved in motility of endothelial cell." Exp Mol Med JT - Experimental ; molecular medicine 33.4 (2001 Dec 31): 276-83.
- [43] F, Bach, FJ, Uddin, and Burke D. "Angiopoietins in malignancy." Eur J Surg Oncol JT - European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology 33.1 (2007 Feb): 7-15.
- [44] F, Carinci et al. "Potential markers of tongue tumor progression selected by cDNA microarray." Int J Immunopathol Pharmacol JT - International journal of immunopathology and pharmacology 18.3 (2005 Jul-Sep): 513-24.
- [45] F, Gao et al. "Frequent loss of PDCD4 expression in human glioma: possible role in the tumorigenesis of glioma." Oncol Rep JT - Oncology reports 17.1 (2007 Jan): 123-8.
- [46] F, Gao et al. "PDCD4 gene silencing in gliomas is associated with 5'CpG island methylation and unfavorable prognosis." J Cell Mol Med JT - Journal of cellular and molecular medicine (2008 Sep 13):.
- [47] F, Roviezzo et al. "Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage." J Pharmacol Exp Ther JT - The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 314.2 (2005 Aug): 738-44.
- [48] FM, Selaru et al. "MicroRNA-21 is overexpressed in human cholangiocarcinoma and regulates programmed cell death 4 and tissue inhibitor of metalloproteinase 3." Hepatology JT - Hepatology (Baltimore, Md.) 49.5 (2009 May): 1595-601.
- [49] Fiedler U., et al. "Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 share the same binding domains in the Tie-2 receptor involving the first Ig-like loop and the epidermal growth factor-like repeats." J Biol Chem JT - The Journal of biological chemistry 278.3 (2003 Jan 17): 1721-7.
- [50] G, Krikun et al. "Expression of angiopoietin-2 by human endometrial endothelial cells: regulation by hypoxia and inflammation." Biochem Biophys Res Commun JT - Biochemical and biophysical research communications 275.1 (2000 Aug 18): 159-63.
- [51] G, Mudduluru et al. "Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent prognostic factor in resected colorectal cancer." Cancer JT - Cancer 110.8 (2007 Oct 15): 1697-707.

- [52] GJ, Caine et al. "Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in breast and prostate cancer: a comparison with VEGF and Flt-1." Eur J Clin Invest JT - European journal of clinical investigation 33.10 (2003 Oct): 883-90.
- [53] Goke R.; et al. "Programmed cell death protein 4 suppresses CDK1/cdc2 via induction of p21(Waf1/Cip1)." Am J Physiol Cell Physiol JT - American journal of physiology. Cell physiology 287.6 (2004 Dec): C1541-6.
- [54] H, Appl, and Klempnauer KH. "Targeted disruption of c-myc in the chicken pre B-cell line DT40." Oncogene JT - Oncogene 21.19 (2002 May 2): 3076-81.
- [55] H, Fan et al. "DNA methyltransferase 1 knockdown induces silenced CDH1 gene reexpression by demethylation of methylated CpG in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721." Eur J Gastroenterol Hepatol JT - European journal of gastroenterology ; hepatology 19.11 (2007 Nov): 952-61.
- [56] H, Hashizume et al. "Complementary actions of inhibitors of angiopoietin-2 and VEGF on tumor angiogenesis and growth." Cancer Res JT - Cancer research 70.6 (2010 Mar 15): 2213-23.
- [57] H, Jin et al. "Aerosol delivery of urocanic acid-modified chitosan/programmed cell death 4 complex regulated apoptosis, cell cycle, and angiogenesis in lungs of K-ras null mice." Mol Cancer Ther JT - Molecular cancer therapeutics 5.4 (2006 Apr): 1041-9.
- [58] H, Oh et al. "Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells." J Biol Chem JT - The Journal of biological chemistry 274.22 (1999 May 28): 15732-9.
- [59] H, Soejima et al. "Assignment of the programmed cell death 4 gene (PDCD4) to human chromosome band 10q24 by in situ hybridization." Cytogenet Cell Genet JT - Cytogenetics and cell genetics 87.1-2 (1999): 113-4.
- [60] H, Yoshiji et al. "Angiopoietin 2 displays a vascular endothelial growth factor dependent synergistic effect in hepatocellular carcinoma development in mice." Gut JT - Gut 54.12 (2005 Dec): 1768-75.
- [61] H, Yoshinaga et al. "Novel human PDCD4 (H731) gene expressed in proliferative cells is expressed in the small duct epithelial cells of the breast as revealed by an anti-H731 antibody." Pathol Int JT - Pathology international 49.12 (1999 Dec): 1067-77.
- [62] H, Zhang et al. "Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth

- factor-beta1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma." Oncogene JT - Oncogene 25.45 (2006 Oct 5): 6101-12.
- [63] HP, Hammes et al. "Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy." Diabetes JT - Diabetes 53.4 (2004 Apr): 1104-10.
- [64] HS, Yang et al. "A novel function of the MA-3 domains in transformation and translation suppressor Pcd4 is essential for its binding to eukaryotic translation initiation factor 4A." Mol Cell Biol JT - Molecular and cellular biology 24.9 (2004 May): 3894-906.
- [65] HS, Yang et al. "A novel transformation suppressor, Pcd4, inhibits AP-1 transactivation but not NF-kappaB or ODC transactivation." Oncogene JT - Oncogene 20.6 (2001 Feb 8): 669-76.
- [66] HS, Yang et al. "Pcd4 suppresses tumor phenotype in JB6 cells by inhibiting AP-1 transactivation." Oncogene JT - Oncogene 22.24 (2003 Jun 12): 3712-20.
- [67] HS, Yang et al. "The transformation suppressor Pcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation." Mol Cell Biol JT - Molecular and cellular biology 23.1 (2003 Jan): 26-37.
- [68] HS, Yang et al. "Tumorigenesis suppressor Pcd4 down-regulates mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 expression to suppress colon carcinoma cell invasion." Mol Cell Biol JT - Molecular and cellular biology 26.4 (2006 Feb): 1297-306.
- [69] HT, Yan et al. "Overexpression of SOX15 inhibits proliferation of NT2/D1 cells derived from a testicular embryonal cell carcinoma." Mol Cells JT - Molecules and cells 24.3 (2007 Dec 31): 323-8.
- [70] HT, Yuan et al. "Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium." Mol Cell Biol JT - Molecular and cellular biology 29.8 (2009 Apr): 2011-22.
- [71] HZ, Kim et al. "A designed angiopoietin-2 variant, pentameric COMP-Ang2, strongly activates Tie2 receptor and stimulates angiogenesis." Biochim Biophys Acta Vol. 1793., 772-80.
- [72] Hawighorst T., et al. "Activation of the tie2 receptor by angiopoietin-1 enhances tumor vessel maturation and impairs squamous cell carcinoma growth." Am J Pathol JT - The American journal of pathology 160.4 (2002 Apr): 1381-92.
- [73] I, Helfrich et al. "Angiopoietin-2 levels are associated with disease progression in

- metastatic malignant melanoma." Clin Cancer Res JT - Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 15.4 (2009 Feb 15): 1384-92.
- [74] I, Kim et al. "Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway." Oncogene JT - Oncogene 19.39 (2000 Sep 14): 4549-52.
- [75] I, Kim et al. "Characterization and expression of a novel alternatively spliced human angiopoietin-2." J Biol Chem JT - The Journal of biological chemistry 275.24 (2000 Jun 16): 18550-6.
- [76] I, Kim et al. "Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3." FEBS Lett JT - FEBS letters 443.3 (1999 Jan 29): 353-6.
- [77] I, Kim et al. "Tumor necrosis factor-alpha upregulates angiopoietin-2 in human umbilical vein endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun JT - Biochemical and biophysical research communications 269.2 (2000 Mar 16): 361-5.
- [78] I, Takanami. "Overexpression of Ang-2 mRNA in non-small cell lung cancer: association with angiogenesis and poor prognosis." Oncol Rep JT - Oncology reports 12.4 (2004 Oct): 849-53.
- [79] IA, Asangani et al. "MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer." Oncogene JT - Oncogene 27.15 (2008 Apr 3): 2128-36.
- [80] IB, Lobov, PC, Brooks, and Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. Vol. 99., 11205-10.
- [81] Imanishi Y., et al. "Angiopoietin-2 stimulates breast cancer metastasis through the alpha(5)beta(1) integrin-mediated pathway." Cancer Res JT - Cancer research 67.9 (2007 May 1): 4254-63.
- [82] J, Holash et al. "Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF." Science JT - Science (New York, N.Y.) 284.5422 (1999 Jun 18): 1994-8.
- [83] J, Holash, SJ, Wiegand, and Yancopoulos GD. "New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF." Oncogene JT - Oncogene 18.38 (1999 Sep 20):

- 5356-62.
- [84] J, Oliner et al. "Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2." Cancer Cell JT - Cancer cell 6.5 (2004 Nov): 507-16.
- [85] J, Wang et al. "Expressions and clinical significances of angiopoietin-1, -2 and Tie2 in human gastric cancer." Biochem Biophys Res Commun JT - Biochemical and biophysical research communications 337.1 (2005 Nov 11): 386-93.
- [86] J, Woodard et al. "Statin-dependent suppression of the Akt/mammalian target of rapamycin signaling cascade and programmed cell death 4 up-regulation in renal cell carcinoma." Clin Cancer Res JT - Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 14.14 (2008 Jul 15): 4640-9.
- [87] JH, Chang et al. "Crystal structure of the eIF4A-PDCD4 complex." Proc Natl Acad Sci U S A JT - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106.9 (2009 Mar 3): 3148-53.
- [88] JH, Leupold et al. "Tumor suppressor Pdc4 inhibits invasion/intravasation and regulates urokinase receptor (u-PAR) gene expression via Sp-transcription factors." Oncogene JT - Oncogene 26.31 (2007 Jul 5): 4550-62.
- [89] JH, Park et al. "Serum angiopoietin-2 as a clinical marker for lung cancer." Chest JT - Chest 132.1 (2007 Jul): 200-6.
- [90] JM, Siner et al. "Elevated serum angiopoietin 2 levels are associated with increased mortality in sepsis." Shock JT - Shock (Augusta, Ga.) 31.4 (2009 Apr): 348-53.
- [91] K, Koga et al. "Expression of angiopoietin-2 in human glioma cells and its role for angiogenesis." Cancer Res JT - Cancer research 61.16 (2001 Aug 15): 6248-54.
- [92] K, Motoyama et al. "Clinicopathological and prognostic significance of PDCD4 and microRNA-21 in human gastric cancer." Int J Oncol JT - International journal of oncology 36.5 (2010 May): 1089-95.
- [93] K, Shibahara et al. "Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death." Gene JT - Gene 166.2 (1995 Dec 12): 297-301.
- [94] K, Sugimachi et al. "The mechanisms of angiogenesis in hepatocellular carcinoma: angiogenic switch during tumor progression." Surgery JT - Surgery 131.1 Suppl (2002 Jan): S135-41.

- [95] KM, Detjen et al. "Angiopoietin-2 promotes disease progression of neuroendocrine tumors." Clin Cancer Res JT - Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 16.2 (2010 Jan 15): 420-9.
- [96] KT, Kim et al. "Oligomerization and multimerization are critical for angiopoietin-1 to bind and phosphorylate Tie2." J Biol Chem JT - The Journal of biological chemistry 280.20 (2005 May 20): 20126-31.
- [97] Korff T., et al. "Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness." FASEB J JT - The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 15.2 (2001 Feb): 447-57.
- [98] Kriehuber E., et al. "Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages." J Exp Med JT - The Journal of experimental medicine 194.6 (2001 Sep 17): 797-808.
- [99] L, Azzoni et al. "Differential transcriptional regulation of CD161 and a novel gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T cells." J Immunol JT Journal of immunology (Baltimore, Md.) 7 (1998):.
- [100] L, Eklund, and Olsen BR. "Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling." Exp Cell Res JT - Experimental cell research 312.5 (2006 Mar 10): 630-41.
- [101] L, Marconcini et al. "c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A JT - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96.17 (1999 Aug 17): 9671-6.
- [102] L, Qi et al. "Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma." BMC Cancer JT - BMC cancer 9 (2009): 163.
- [103] LC, Waters et al. "Structure of the C-terminal MA-3 domain of the tumour suppressor protein Pdc4 and characterization of its interaction with eIF4A." Oncogene JT - Oncogene 26.34 (2007 Jul 26): 4941-50.
- [104] LaRonde, LeBlanc N. et al. "Structural basis for inhibition of translation by the tumor suppressor Pdc4." Mol Cell Biol JT - Molecular and cellular biology 27.1 (2007 Jan): 147-56.
- [105] Lankat, Buttgerit B. et al. "Knockdown of Pdc4 results in induction of

- proprotein convertase 1/3 and potent secretion of chromogranin A and secretogranin II in a neuroendocrine cell line." Biol Cell JT - Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization 100.12 (2008 Dec): 703-15.
- [106] Lankat, Buttgerit B. et al. "Pdcd4 inhibits growth of tumor cells by suppression of carbonic anhydrase type II." Mol Cell Endocrinol JT - Molecular and cellular endocrinology 214.1-2 (2004 Feb 12): 149-53.
- [107] Lankat, Buttgerit B. et al. "The action of Pdcd4 may be cell type specific: evidence that reduction of dUTPase levels might contribute to its tumor suppressor activity in Bon-1 cells." Apoptosis JT - Apoptosis : an international journal on programmed cell death 13.1 (2008 Jan): 157-64.
- [108] M, Bredel et al. "A network model of a cooperative genetic landscape in brain tumors." JAMA JT - JAMA : the journal of the American Medical Association 302.3 (2009 Jul 15): 261-75.
- [109] M, Folini et al. "miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer." Mol Cancer JT - Molecular cancer 9 (2010): 12.
- [110] M, Nishimura et al. "Angiopoietin-3, a novel member of the angiopoietin family." FEBS Lett JT - FEBS letters 448.2-3 (1999 Apr 9): 254-6.
- [111] M, Potente et al. "Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization." J Clin Invest JT - The Journal of clinical investigation 115.9 (2005 Sep): 2382-92.
- [112] M, Scharpfenecker et al. "The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism." J Cell Sci JT - Journal of cell science 118.Pt 4 (2005 Feb 15): 771-80.
- [113] M, Shiota et al. "Programmed cell death protein 4 down-regulates Y-box binding protein-1 expression via a direct interaction with Twist1 to suppress cancer cell growth." Cancer Res JT - Cancer research 69.7 (2009 Apr 1): 3148-56.
- [114] M, Yamakawa et al. "Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors." Circ Res JT - Circulation research 93.7 (2003 Oct 3): 664-73.
- [115] M, Yasuda et al. "Linoleic acid metabolite suppresses skin inflammation and tumor promotion in mice: possible roles of programmed cell death 4 induction." Carcinogenesis JT - Carcinogenesis 30.7 (2009 Jul): 1209-16.
- [116] MJ, Currie et al. "Expression of the angiopoietins and their receptor Tie2 in

- human renal clear cell carcinomas; regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia." J Pathol JT - The Journal of pathology 198.4 (2002 Dec): 502-10.
- [117] MJ, Kang et al. "Up-regulation of PDCD4 in senescent human diploid fibroblasts." Biochem Biophys Res Commun JT - Biochemical and biophysical research communications 293.1 (2002 Apr 26): 617-21.
- [118] MR, Machein et al. "Angiopoietin-1 promotes tumor angiogenesis in a rat glioma model." Am J Pathol JT - The American journal of pathology 165.5 (2004 Nov): 1557-70.
- [119] Matsushashi, S et al. "Isolation of a novel gene from a human cell line with Pr-28 mAb which recognizes a nuclear antigen involved in the cell cycle." Res Comm Biochem Cell Mol Biol 1 (1997): 109-120.
- [120] N, Bitomsky et al. "siRNA-mediated knockdown of Pdc4 expression causes upregulation of p21(Waf1/Cip1) expression." Oncogene JT - Oncogene 27.35 (2008 Aug 14): 4820-9.
- [121] N, Bitomsky, M, Bohm, and Klempnauer KH. "Transformation suppressor protein Pdc4 interferes with JNK-mediated phosphorylation of c-Jun and recruitment of the coactivator p300 by c-Jun." Oncogene JT - Oncogene 23.45 (2004 Sep 30): 7484-93.
- [122] N, Carayol et al. "Suppression of programmed cell death 4 (PDCD4) protein expression by BCR-ABL-regulated engagement of the mTOR/p70 S6 kinase pathway." J Biol Chem JT - The Journal of biological chemistry 283.13 (2008 Mar 28): 8601-10.
- [123] N, Mitsuhashi et al. "Angiopoietins and Tie-2 expression in angiogenesis and proliferation of human hepatocellular carcinoma." Hepatology JT - Hepatology (Baltimore, Md.) 37.5 (2003 May): 1105-13.
- [124] N, Oka et al. "Expression of angiopoietin-1 and -2, and its clinical significance in human bladder cancer." BJU Int JT - BJU international 95.4 (2005 Mar): 660-3.
- [125] N, Yamamichi et al. "Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development." Clin Cancer Res JT - Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 15.12 (2009 Jun 15): 4009-16.
- [126] NA, Wei et al. "Loss of Programmed cell death 4 (Pdc4) associates with the

- progression of ovarian cancer." Mol Cancer JT - Molecular cancer 8 (2009): 70.
- [127] NV, Dorrello et al. "S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth." Science JT - Science (New York, N.Y.) 314.5798 (2006 Oct 20): 467-71.
- [128] NW, Gale et al. "Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1." Dev Cell JT - Developmental cell 3.3 (2002 Sep): 411-23.
- [129] Nieves, Alicea R. et al. "Programmed cell death 4 inhibits breast cancer cell invasion by increasing tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression." Breast Cancer Res Treat JT - Breast cancer research and treatment 114.2 (2009 Mar): 203-9.
- [130] O, Afonja et al. "Induction of PDCD4 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/neu antagonist in breast cancer cells. Evidence for a role in apoptosis." Oncogene JT - Oncogene 23.49 (2004 Oct 21): 8135-45.
- [131] O, Stoeltzing et al. "Angiopoietin-1 inhibits tumour growth and ascites formation in a murine model of peritoneal carcinomatosis." Br J Cancer JT - British journal of cancer 87.10 (2002 Nov 4): 1182-7.
- [132] O, Stoeltzing et al. "Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors." Cancer Res JT - Cancer research 63.12 (2003 Jun 15): 3370-7.
- [133] Ozpolat B., et al. "Death-associated protein 5 (DAP5/p97/NAT1) contributes to retinoic acid-induced granulocytic differentiation and arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia." Apoptosis JT - Apoptosis : an international journal on programmed cell death 13.7 (2008 Jul): 915-28.
- [134] Ozpolat B., et al. "Programmed cell death-4 tumor suppressor protein contributes to retinoic acid-induced terminal granulocytic differentiation of human myeloid leukemia cells." Mol Cancer Res JT - Molecular cancer research : MCR 5.1 (2007 Jan): 95-108.
- [135] P, Lin et al. "Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2." Proc Natl Acad Sci U S A JT - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95.15 (1998 Jul 21): 8829-34.

- [136] P, Nasarre et al. "Host-derived angiopoietin-2 affects early stages of tumor development and vessel maturation but is dispensable for later stages of tumor growth." Cancer Res JT - Cancer research 69.4 (2009 Feb 15): 1324-33.
- [137] P, Pichiule, JC, Chavez, and LaManna JC. "Hypoxic regulation of angiopoietin-2 expression in endothelial cells." J Biol Chem JT - The Journal of biological chemistry 279.13 (2004 Mar 26): 12171-80.
- [138] P, Singh et al. "Disruption of the Pcd4 tumor suppressor gene in chicken DT40 cells reveals its role in the DNA-damage response." Oncogene JT - Oncogene 28.42 (2009 Oct 22): 3758-64.
- [139] PC, Maisonpierre et al. "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis." Science JT - Science (New York, N.Y.) 277.5322 (1997 Jul 4): 55-60.
- [140] PG, Loh et al. "Structural basis for translational inhibition by the tumour suppressor Pcd4." EMBO J JT - The EMBO journal 28.3 (2009 Feb 4): 274-85.
- [141] Q, Wang et al. "Downregulation of E-cadherin is an essential event in activating beta-catenin/Tcf-dependent transcription and expression of its target genes in Pcd4 knockdown cells." Oncogene JT - Oncogene .1476-5594 (Electronic) (2009 Sep 28):.
- [142] Q, Wang, Z, Sun, and Yang HS. "Downregulation of tumor suppressor Pcd4 promotes invasion and activates both beta-catenin/Tcf and AP-1-dependent transcription in colon carcinoma cells." Oncogene JT - Oncogene 27.11 (2008 Mar 6): 1527-35.
- [143] RR, White et al. "Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2." Proc Natl Acad Sci U S A JT - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100.9 (2003 Apr 29): 5028-33.
- [144] Ramdas L., et al. "miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue." Head Neck JT - Head ; neck 31.5 (2009 May): 642-54.
- [145] S, Davis et al. "Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering." Nat Struct Biol JT - Nature structural biology 10.1 (2003 Jan): 38-44.
- [146] S, Davis et al. "Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by

- secretion-trap expression cloning." Cell JT - Cell 87.7 (1996 Dec 27): 1161-9.
- [147] S, Kuboki et al. "Angiopoietin-2 levels in the hepatic vein as a useful predictor of tumor invasiveness and prognosis in human hepatocellular carcinoma." J Gastroenterol Hepatol JT - Journal of gastroenterology and hepatology 23.7 Pt 2 (2008 Jul): e157-64.
- [148] S, Lee et al. "Differential expression in normal-adenoma-carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon." Oncol Rep JT - Oncology reports 16.4 (2006 Oct): 747-54.
- [149] S, Matsushashi et al. "Expression patterns of programmed cell death 4 protein in normal human skin and some representative skin lesions." Exp Dermatol JT - Experimental dermatology 16.3 (2007 Mar): 179-84.
- [150] S, Matsushashi, T, Watanabe, and Hori K. An antigen expressed in proliferating cells at late G1-S phase. Vol. 170., 351-62.
- [151] S, Tanaka et al. "Angiogenic switch as a molecular target of malignant tumors." J Gastroenterol JT - Journal of gastroenterology 38 Suppl 15 (2003 Mar): 93-7.
- [152] S, Tanaka et al. "Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma." J Clin Invest JT - The Journal of clinical investigation 103.3 (1999 Feb): 341-5.
- [153] S, Zhang et al. "Programmed cell death 4 (PDCD4) suppresses metastatic potential of human hepatocellular carcinoma cells." J Exp Clin Cancer Res JT - Journal of experimental ; clinical cancer research : CR 28 (2009): 71.
- [154] SA, Ahmad et al. "Differential expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in colon carcinoma. A possible mechanism for the initiation of angiogenesis." Cancer JT - Cancer 92.5 (2001 Sep 1): 1138-43.
- [155] SA, Ahmad et al. "The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer." Cancer Res JT - Cancer research 61.4 (2001 Feb 15): 1255-9.
- [156] SE, Orfanos et al. "Angiopoietin-2 is increased in severe sepsis: correlation with inflammatory mediators." Crit Care Med JT - Critical care medicine 35.1 (2007 Jan): 199-206.
- [157] SF, Hackett et al. "Angiopoietin 2 expression in the retina: upregulation during physiologic and pathologic neovascularization." J Cell Physiol JT - Journal of cellular physiology 184.3 (2000 Sep): 275-84.
- [158] SJ, Mandriota et al. "Hypoxia-inducible angiopoietin-2 expression is mimicked by

- iodonium compounds and occurs in the rat brain and skin in response to systemic hypoxia and tissue ischemia." Am J Pathol JT - The American journal of pathology 156.6 (2000 Jun): 2077-89.
- [159] SJ, Mandriota, and Pepper MS. "Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia." Circ Res JT - Circulation research 83.8 (1998 Oct 19): 852-9.
- [160] SK, Hwang et al. "Aerosol-delivered programmed cell death 4 enhanced apoptosis, controlled cell cycle and suppressed AP-1 activity in the lungs of AP-1 luciferase reporter mice." Gene Ther JT - Gene therapy 14.18 (2007 Sep): 1353-61.
- [161] SM, Parikh et al. "Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans." PLoS Med JT - PLoS medicine 3.3 (2006 Mar): e46.
- [162] Sarraf, Yazdi S. et al. "Inhibition of in vivo tumor angiogenesis and growth via systemic delivery of an angiopoietin 2-specific RNA aptamer." J Surg Res JT - The Journal of surgical research 146.1 (2008 May 1): 16-23.
- [163] Schlichter U., et al. "Identification of the myb-inducible promoter of the chicken Pcd4 gene." Biochim Biophys Acta JT - Biochimica et biophysica acta 1520.1 (2001 Jul 30): 99-104.
- [164] Stalberg P., et al. "Differentially expressed cDNAs in PLCbeta3-induced tumor suppression in a human endocrine pancreatic tumor cell line: activation of the human mismatch repair protein 3 gene." Biochem Biophys Res Commun JT - Biochemical and biophysical research communications 281.1 (2001 Feb 16): 227-31.
- [165] T, Etoh et al. "Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases." Cancer Res JT - Cancer research 61.5 (2001 Mar 1): 2145-53.
- [166] T, Kalinski et al. "Differential expression of VEGF-A and angiopoietins in cartilage tumors and regulation by interleukin-1beta." Cancer JT - Cancer 106.9 (2006 May 1): 2028-38.
- [167] T, Morisada et al. "Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation." Blood JT - Blood 105.12 (2005 Jun 15): 4649-56.
- [168] T, Schmid et al. "Translation inhibitor Pcd4 is targeted for degradation during tumor promotion." Cancer Res JT - Cancer research 68.5 (2008 Mar 1): 1254-

60.

- [169] T, Torimura et al. "Overexpression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in hepatocellular carcinoma." J Hepatol JT - Journal of hepatology 40.5 (2004 May): 799-807.
- [170] TR, Carlson et al. "Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins." J Biol Chem JT - The Journal of biological chemistry 276.28 (2001 Jul 13): 26516-25.
- [171] Tammela T., et al. "Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia." Blood JT - Blood 105.12 (2005 Jun 15): 4642-8.
- [172] Teichert, Kuliszewska K. et al. "Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2." Cardiovasc Res JT - Cardiovascular research 49.3 (2001 Feb 16): 659-70.
- [173] U, Fiedler et al. "Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation." Nat Med JT - Nature medicine 12.2 (2006 Feb): 235-9.
- [174] U, Fiedler et al. "The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies." Blood JT - Blood 103.11 (2004 Jun 1): 4150-6.
- [175] U, Fiedler, and Augustin HG. "Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation." Trends Immunol JT - Trends in immunology 27.12 (2006 Dec): 552-8.
- [176] U, Schlichter et al. "The chicken Pcd4 gene is regulated by v-Myb." Oncogene JT - Oncogene 20.2 (2001 Jan 11): 231-9.
- [177] V, Goede et al. "Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis." Lab Invest JT - Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 78.11 (1998 Nov): 1385-94.
- [178] W, Fang et al. "Transcriptional patterns, biomarkers and pathways characterizing nasopharyngeal carcinoma of Southern China." J Transl Med JT - Journal of translational medicine 6 (2008): 32.
- [179] WN, Procopio et al. "Angiopoietin-1 and -2 coiled coil domains mediate distinct homo-oligomerization patterns, but fibrinogen-like domains mediate ligand activity." J Biol Chem JT - The Journal of biological chemistry 274.42 (1999 Oct 15): 30196-201.
- [180] WS, Shim et al. "Angiopoietin 1 promotes tumor angiogenesis and tumor vessel

- plasticity of human cervical cancer in mice." Exp Cell Res JT - Experimental cell research 279.2 (2002 Oct 1): 299-309.
- [181] WS, Shim, IA, Ho, and Wong PE. "Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis." Mol Cancer Res JT - Molecular cancer research : MCR 5.7 (2007 Jul): 655-65.
- [182] X, Wang et al. "Expression and prognostic significance of PDCD4 in human epithelial ovarian carcinoma." Anticancer Res JT - Anticancer research 28.5B (2008 Sep-Oct): 2991-6.
- [183] Y, Chen et al. "Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis." J Pathol JT - The Journal of pathology 200.5 (2003 Aug): 640-6.
- [184] Y, Hiyoshi et al. "MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res JT - Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 15.6 (2009 Mar 15): 1915-22.
- [185] Y, Jiang et al. "Association of programmed cell death factor 4 (PDCD4) with hepatocellular carcinoma and smoking in a Chinese male population." J Int Med Res JT - The Journal of international medical research 37.4 (2009 Jul-Aug): 1179-83.
- [186] Y, Jiang et al. "Interaction of Pdc4 with eIF4E inhibits the metastatic potential of hepatocellular carcinoma." Biomed Pharmacother JT - Biomedicine ; pharmacotherapy = Biomedecine ; pharmacotherapie .1950-6007 (Electronic); 0753-3322 (Linking) (2010 Feb 25):.
- [187] Y, Mochizuki et al. "Angiopoietin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn." J Cell Sci JT - Journal of cell science 115.Pt 1 (2002 Jan 1): 175-83.
- [188] Y, Onishi, S, Hashimoto, and Kizaki H. "Cloning of the TIS gene suppressed by topoisomerase inhibitors." Gene JT - Gene 215.2 (1998 Jul 30): 453-9.
- [189] Y, Onishi, and Kizaki H. "Molecular cloning of the genes suppressed in RVC lymphoma cells by topoisomerase inhibitors." Biochem Biophys Res Commun JT - Biochemical and biophysical research communications 228.1 (1996 Nov 1): 7-13.
- [190] Y, Oshima et al. "Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds: new vessels are most sensitive." FASEB J JT - The FASEB journal : official

- publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 19.8 (2005 Jun): 963-5.
- [191] Y, Wang, and Lee CG. "MicroRNA and cancer--focus on apoptosis." J Cell Mol Med JT - Journal of cellular and molecular medicine 13.1 (2009 Jan): 12-23.
- [192] Y, Xu, and Yu Q. "Angiopoietin-1, unlike angiopoietin-2, is incorporated into the extracellular matrix via its linker peptide region." J Biol Chem JT - The Journal of biological chemistry 276.37 (2001 Sep 14): 34990-8.
- [193] Y, Xue et al. "FOXC2 controls Ang-2 expression and modulates angiogenesis, vascular patterning, remodeling, and functions in adipose tissue." Proc Natl Acad Sci U S A JT - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105.29 (2008 Jul 22): 10167-72.
- [194] Y, Yamanaka et al. "Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia." Blood JT - Blood 114.15 (2009 Oct 8): 3265-75.
- [195] YH, Wen et al. "Alterations in the expression of PDCD4 in ductal carcinoma of the breast." Oncol Rep JT - Oncology reports 18.6 (2007 Dec): 1387-93.
- [196] YQ, Huang et al. "Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells." Blood JT - Blood 99.5 (2002 Mar 1): 1646-50.
- [197] YZ, Zhou et al. "Role of serum angiopoietin-2 level in screening for esophageal squamous cell cancer and its precursors." Chin Med J (Engl) JT - Chinese medical journal 120.14 (2007 Jul 20): 1216-9.
- [198] Z, Zhang, and DuBois RN. "Detection of differentially expressed genes in human colon carcinoma cells treated with a selective COX-2 inhibitor." Oncogene JT - Oncogene 20.33 (2001 Jul 27): 4450-6.
- [199] ZT, Wei et al. "PDCD4 inhibits the malignant phenotype of ovarian cancer cells." Cancer Sci JT - Cancer science 100.8 (2009 Aug): 1408-13.
- [200] Zhang L., et al. "Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer." Cancer Res JT - Cancer research 63.12 (2003 Jun 15): 3403-12.

Anhang

a. Abkürzungen

ABL	Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1
Ang2	Angiopoietin2
Akt	Proteinkinase B
AP-1	Activating Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ATRA	All-Trans-Retinoic Acid
BCR	Breakpoint Cluster Region
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
CA II	Carboanhydrase II
CgA	Chromogranin A
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
Ets-1	Protein C-ets-1
eIF4A	Eukaryoter Initiationsfaktor 4A
eIF4F	Eukaryoter Initiationsfaktor 4F
eIF4G	Eukaryoter Initiationsfaktor 4G
FAK	Focal Adhesion Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
FOXO	Forkhead Box O
GER	Deutschland

HCC	Hepatozelluläres Karzinom
Her2/neu	human epidermal growth factor receptor 2, erb-B2, c-erbB2
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HRP	Horse Radish Peroxidase
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminal Kinases
MAPK = ERK	Mitogen-activated protein kinase
MAP4K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
miR	MicroRNA
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger Ribo-Nucleic Acid
NaOH	Natrium Hydroxid
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC1	Proprotein-Konvertasen 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pcd4	Programmed cell death 4
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PMSF	Pheylmehansulfonylfluorid
RAR	Retinsäure-Rezeptor
RNA	Ribo-Nucleic Acid
RTD-PCR	Real Time Detection Polymerase Chain Reaction
RXR	retinoid X receptor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Ser	Serin
Sg II	Secretogranin II
SOX	SRY-related HMG-box
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β 1	Transforming Growth Factor- β 1

TIMP-2	<u>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2</u>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPA	12- <i>O</i> -Tetradecanoylphorbol-13-acetate
u-PAR	Urokinase Rezeptor
UTR	Untranslated Region
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
5-FU	5-Fluoruracil
13-HOA	13-Hydroxy-10-Oxo- <i>trans</i> -11-6 Octadecenoic acid

Anhang

b. Einheiten

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunden
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Mol
mA	Milliampère
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
rpm	revolutions per minute
s	Nanometer
V	Volt

Zusammenfassung

Pdcd4 (**programmed cell death 4**) ist ein neuer Tumorsuppressor. In vielen Tumoren oder während maligner Transformation ließen sich supprimierte Pdcd4 Mengen nachweisen. Hohe Pdcd4 Spiegel wiederum verhinderten eine neoplastische Umwandlung. Bislang schienen aber die Wirkungen von Pdcd4 abhängig vom Zelltyp zu sein. Ang2 (Angiopoietin2), ein Wachstumsfaktor, der an der Neubildung von Gefäßen beteiligt ist, könnte ein zelltypübergreifendes Zielgen von Pdcd4 darstellen. Eine gezielte Suppression von Pdcd4 mittels siRNA (siPdcd4) in verschiedenen Tumorzelllinien der Mamma, der Leber, des pankreatiko-gastro-intestinalen Traktes sowie in Endothelzellen bestätigte in Western Blots eine Steigerung von Ang2 Protein. Zusätzlich zeigte sich in semiquantitativen RT- und RTD-PCRs eine Regulierung auf transkriptionaler Ebene. Damit ist Ang2 tatsächlich ein in mehreren Tumorzelltypen reguliertes Zielgen von Pdcd4.

Nachdem eine erhöhte Ang2 Proteinexpression unter Pdcd4 Suppression in Western Blot Untersuchungen belegt werden konnte, ließen sich auch in Mediumüberständen von stabil (shPdcd4) oder transient (siPdcd4) transfizierten Zelllinien erhöhte Ang2 Mengen im Vergleich zur Kontrolle nachweisen. Dies sprach für eine gesteigerte Sekretion von Ang2 Protein. Die funktionelle Bedeutung der erhöhten Ang2 Spiegel wurde in Tube Formation- und Boyden Chamber Assays untersucht und dabei die immortalisierte humane mikrovaskuläre endotheliale Zelllinie HMEC-1 verwendet. Die im konditionierten Medium von stabil shPdcd4 transfizierten BON-1- und HCT116-Zellen erhöhten Ang2 Spiegel führten in Tube Formation Assays, im Vergleich zum Kontrollmedium, zu einer gesteigerten Gefäßneubildung. Anhand von Verzweigungen und Länge der Tubes erfolgte eine Software-basierte Auswertung. Bestätigt wurden diese Ergebnisse in Tube Formation Assays mit rekombinanten Ang2. Dabei ließen sich im Einklang mit der bestehenden Literatur zwei Auswirkungen nachweisen. Zum einen zeigten sich proangiogenetische Effekte von Ang2 in Verbindung mit Medium mit 10% FBS, zum anderen gefäßregressive Wirkungen von Ang2 in Medium mit 1% FBS. Vermutlich liegt das an den unterschiedlichen VEGF Konzentrationen, die mit steigendem FBS Gehalt des Mediums auch zunehmen. Zusätzlich ließ sich die Fähigkeit von Ang2, Migration von endothelialen Zellen zu fördern, in Boyden Chamber Assays nachweisen. Hierbei zeigten die gesteigerten Ang2 Konzentrationen im konditionierten

Medium der stabil transfizierten BON-1- und HCT116 Zellen mit 1% und 10% FBS promigratorische Effekte auf die HMEC-1 Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ang2 in diversen Tumorzelllinien ein Zielgen des Tumorsuppressors Pcd4 ist. Durch Verringerung von Pcd4 mittels siRNA wurde Ang2 vermehrt transkribiert, translatiert und sezerniert. Die funktionelle Bedeutung der gesteigerten Ang2 Sekretion ließ sich in Tube Formation Assays (angiogenetische Wirkung) und Boyden Chamber Assays (promigratorische Wirkung) nachweisen. Mit der Steuerung von Ang2 durch Pcd4 bindet sich der Tumorsuppressor direkt in die Neoangiogenese von Tumoren ein und unterstreicht damit seine Bedeutung in der Entwicklung maligner Neoplasien. Insgesamt gesehen ist eine Wiederherstellung der Pcd4 Expression in Tumoren und die damit verbundene Überführung in die aktive Rolle als Tumorsuppressor ein Hauptanliegen möglicher therapeutischer Ansätze.

Abstract

Pdcd4 (**programmed cell death 4**) is a new tumour suppressor. Pdcd4 levels are reduced in various tumours and during malignant transformation. Furthermore, high amounts of Pdcd4 showed the potential to repress malignant transformation. So far, the effects of Pdcd4 seemed to be cell type specific. The growth factor Ang2 (Angiopoietin2), which is involved in angiogenesis, could be a cell type independent target gene of Pdcd4. Selective down-regulation of Pdcd4 by siRNA (siPdcd4) showed enhanced Ang2 levels in Western Blots of tumour cell-lines of the mammary, liver, pancreas, gastrointestinal tract and in endothelial cells. Additionally, semiquantitative RT- and RTD-PCRs indicated a transcriptional regulation. Therefore Ang2 represents a target gene of Pdcd4 in various tumour cell-lines.

After proving the elevated Ang2 expression by Pdcd4 suppression in Western Blots, investigations of supernatants of stably (shPdcd4) and transiently (siPdcd4) transfected cell-lines revealed higher Ang2 amounts in comparison to the control, indicating an augmented secretion of Ang2 protein. Tube Formation- and Boyden Chamber Assays were done to show the relevance of high Ang2 levels. We used the immortalized microvascular endothelial cell-line HMEC-1 for these experiments. The higher Ang2 levels in the conditioned medium of stably shPdcd4 transfected BON-1- und HCT116-cells caused an increased angiogenic activity in Tube Formation Assays in comparison to the mock control. Length and junctions of the tubes were software based evaluated. Tube Formation Assays with recombinant Ang2 confirmed these results. According to the existing literature Ang2 acted in two ways. On the one hand Ang2 increased the angiogenic activity in medium with 10% FBS, on the other hand Ang2 repressed angiogenesis in medium with 1% FBS. The predictable reasons are the different VEGF amounts in Medium with 1% and 10% FBS. Next to angiogenesis Ang2 had migrational potential on HMEC-1 cells in Boyden Chamber Assays. The higher levels of Ang2 in the conditioned medium of stably shPdcd4 transfected BON-1- and HCT116 cells with 1% and 10% FBS caused an increased migration on HMEC-1 cells in comparison to the mock control.

In summary, this study shows that Ang2 is a target gene of Pdcd4 regulated in various tumour cell-lines. The suppression of Pdcd4 by siRNA led to a higher transcription, translation and secretion of Ang2. The functional importance of increased Ang2

amounts was seen in Tube Formation and Boyden Chamber Assays. Pdc4 controls angiogenesis via regulation of Ang2 and is thus involved in the development of malignant neoplasms. All in all, a putative restoring of Pdc4 in tumours and with it an active role as a tumour suppressor could be a promising therapeutic target.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren

Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Baumann, Bolm, Boudriot, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Donner-Banzhoff, Dünne, Eilers, Ellenrieder, Fendrich, Fensterer, Feuser, Figiel, Gerdes, Görg, Grau, Gress, Grimm, Grundmann, Grzeschik, Hasilik, Herrmann-Lingen, Hilt, Hoffmann, Holst, Hoyer, Jungclas, Kalder, Kann, Kill, Kim-Berger, Klenk, Klose, Koolman, Krause, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Lang, Langer, Lenz, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Olbert, Petz, Plant, Printz, Ramaswamy, Remschmidt, Renz, Richter, Röper, Rothmund, Ruchholtz, Seitz, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schofer, Schrader, Steiniger, Stiletto, Teymoortash, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Weiler, Wennemut, Werner, Westermann, Wulf, Wündisch, Zemlin, Zielke, Ziring.

Danksagung

Ich möchte mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Brigitte Lankat-Buttgereit für die Überlassung des interessanten und vielversprechenden Themas sowie die zuverlässige Zusammenarbeit und konstruktive Unterstützung herzlich bedanken. Sie hat es in bezeichnender Weise immer wieder geschafft, meine Begeisterung für meine Arbeit zu wecken und mich somit über das Ziel hinaus gebracht. Ihre Geduld, ihre Förderung und ihre grenzenlose Unterstützung waren Gründe für den Erfolg meiner Arbeit.

Mein Dank gebührt auch all denjenigen, die mich im Labor unterstützt haben. Vielen Dank an Harald Schmidt und Laborleiter PD Dr. Malte Buchholz.

Bei Prof. Dr. med. Th. M. Gress bedanke ich mich für die Möglichkeit in seinem Institut diese Arbeit anzufertigen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Kerstin und Manfred Krug, die mir dieses Studium ermöglicht haben sowie meinen Großeltern Irmgard und Georg Krug und Ilse und Paul Niebergall, die mich immer unterstützt haben.

Schließlich möchte ich mich auch bei meiner Freundin Annerose Steinmacher bedanken. Durch Ihre Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit konnte ich anfängliche Selbstzweifel überwinden. Danke dafür, dass du immer für mich da warst.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Der Einfluss von Pdc4 auf die Expression des Proteins Angiopoietin2“ im Medizinischen Zentrum für Innere Medizin unter Leitung von Prof. Dr. Gress in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Lankat-Buttgereit ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 10.10.2010