

Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung Kinderchirurgie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Fuchs

**Expression und Sekretion heparinbindender
Wachstumsfaktoren bei Zelllinien solider pädiatrischer
Tumoren**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dorothee Flaadt
aus
Tübingen
2002

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Schweizer

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Bruchelt

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungen	1
1 Einleitung	3
1.1 Wachstumsfaktoren, auto- und parakrine Stimulation, Angiogenese, Neovaskularisierung	3
1.2 Der Wachstumsfaktor Pleiotrophin	6
1.3 Der Wachstumsfaktor Midkine	7
1.4 Vergleich: Pleiotrophin und Midkine	9
1.5 Der Wachstumsfaktor bFGF	10
1.6 Der Wachstumsfaktor VEGF	12
1.7 Mögliche Bedeutung proinflammatorischer Zytokine für die Regulation heparinbindender Wachstumsfaktoren	14
1.8 Das Neuroblastom	16
1.9 Der Wilms´Tumor (Nephroblastom)	19
1.10 Das Hepatoblastom	21
1.11 Fragestellung	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Geräte, Plastikwaren, Chemikalien und Zelllinien	23
2.1.1 Geräte	23
2.1.2 Kunststoffmaterialien	23
2.1.3 Chemikalien	24
2.1.4 Zelllinien	24
2.2 Zellkultur	25
2.2.1 Anzucht und Subkultur	27

2.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	28
2.2.3	Zellzahlbestimmung	28
2.3	Serumentzug und Stimulation mit Zytokinen	29
2.3.1	Vorbereitung: Zellaussaat	29
2.3.2	Stimulation mit den Zytokinen $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ und $IFN\gamma$ und Serumentzug	29
2.4	RNA-Isolierung	30
2.4.1	Prinzip	30
2.4.2	Abfolge der einzelnen Teilschritte	31
2.4.3	DNA-Verdau zur Gewinnung einer DNA- freien Probe	32
2.4.4	Aufreinigung	32
2.4.5	RNA-Konzentrationsbestimmung	32
2.4.6	Integrität der RNA	33
2.5	Reverse Transkriptase, PCR	34
2.5.1	Prinzip	34
2.5.2	Durchführung	34
2.5.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.5.4	Gel-Elektrophorese zum Nachweis des PCR-Produktes	37
2.6	ELISA zur Bestimmung des Wachstumsfaktorproteins im Zellkulturüberstand	38
2.6.1	Prinzip des PTN-ELISA	38
2.6.2	Prinzip des bFGF-ELISA	38
2.6.3	Durchführung des bFGF-ELISA	39
2.6.4	Prinzip des VEGF-ELISA	40
2.6.5	Durchführung des VEGF-ELISA	40
2.7	Statistik	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Expression der Wachstumsfaktoren PTN, MK, bFGF und	42

	VEGF in den Tumorzelllinien unter basalen Bedingungen	
3.1.1	Pleiotrophin-Expression	42
3.1.2	Midkine-Expression	44
3.1.3	bFGF-Expression	45
3.1.4	VEGF-Expression	46
3.2	Konzentration des PTN, bFGF und VEGF Proteins in den Zellkulturüberständen unter basalen Bedingungen	47
3.2.1	Pleiotrophin-Protein	47
3.2.2	bFGF-Protein	48
3.2.3	VEGF-Protein	49
3.3	Expression der Wachstumsfaktoren unter Zytokinstimulation	50
3.3.1	Zellzahländerung unter Zytokineinfluß	50
3.3.2	PTN-Expression und –Sekretion unter Zytokineinfluß	51
3.3.3	MK-Expression unter Zytokineinfluß	54
3.3.4	bFGF-Expression und –Sekretion unter Zytokineinfluß	55
3.3.5	VEGF-Expression und –Sekretion unter Zytokineinfluß	57
4	Diskussion	59
4.1	Pleiotrophin	59
4.2	Midkine	60
4.3	Vergleich: MK und PTN	62
4.4	bFGF	62
4.5	VEGF	65
4.6	Expression und Sekretion der Wachstumsfaktoren unter Zytokinstimulation	66
4.7	Perspektive	68

5	Zusammenfassung	70
6	Literaturverzeichnis	72

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bFGF	basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare
CA	Carzinom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
FCS	Fötale Kälberserum
HB	Hepatoblastom
HEPES	Hydroxy-Ethyl-Piperazin-Ethan-Sulfansäure
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
MEM	Minimal Essential Medium
MK	Midkine
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
NB	Neuroblastom
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PTN	Pleiotrophin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute Medium“
RT	Reverse Transkriptase
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wilms´Tumor
ZZ	Zellzahl

1 Einleitung

1.1 Wachstumsfaktoren, auto- und parakrine Stimulation, Angiogenese, Neovaskularisierung

Wachstumsfaktoren sind, wie der Name beinhaltet, für Zellproliferation und Zellteilung in unserem Körper zuständig. Sie sind lösliche Substanzen mit einem relativ niedrigen Molekulargewicht, von 14 kDa (für Midkine) bis 42 kDa (für die längste der 5 verschiedenen Isoformen des Vascular Endothelial Growth Factors = VEGF).

Wachstumsfaktoren sind teilweise matrixgebunden, wie z.B. basic Fibroblast Growth Factor (bFGF); andere hingegen werden von den Zellen ins Serum sezerniert (z.B. Pleiotrophin = PTN; Merenmies und Rauvala, 1990) und wirken in der Umgebung dieser Zellen auf spezifische Rezeptoren. Hierbei kann man zwischen einer autokrinen und parakrinen Signalübertragung unterscheiden: Bei der autokrinen Stimulation ist die Zelle sowohl Signaldonator als auch Signalakzeptor, d.h., der Wachstumsfaktor bindet an den Rezeptor derselben Zelle. So kommt es z.B. durch bFGF zu einer autokrinen Transformation der Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 (Yaon und Klagsbrun, 1990).

Im anderen Falle, also bei der parakrinen Übertragung, wirken die ausgeschleusten Signalmoleküle auf Zellen in der näheren Umgebung der Zelle, oder sie werden an einen weiter entfernten Wirkort transportiert. Als Beispiel ist hier VEGF zu nennen, das über Rezeptoren, die fast nur auf Endothelzellen zu finden sind, seine Wirkung ausübt (Plate und Warnke, 1997). Es sind ungefähr 50 Proteine bekannt, die als Wachstumsfaktoren arbeiten. Sie sind nur im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-11} mol/l vorhanden, was den Nachweis erschwert (Cross und Dexter, 1991).

In der Embryonalentwicklung spielen Wachstumsfaktoren für die Proliferation und Differenzierung eine wichtige Rolle. Beispielsweise findet man im Gehirn der Ratte eine verstärkte Expression des Faktors Pleiotrophin, der dort den

Auswuchs von Neuriten stimuliert (Merenmies und Rauvala, 1990).

Der Faktor VEGF gilt als stärkster Stimulus für die Induktion der Angiogenese (Neufeld et al., 1999; Kim et al., 1993); bFGF kann im Embryo als primordialer Differenzierungsfaktor die Umwandlung von Ektoderm in Mesoderm einleiten (Gospodarowicz, 1987).

Im gesunden Organismus befinden sich diese Mechanismen der Zellproliferation und Zelldifferenzierung in einem Gleichgewicht, das von den Wachstumsfaktoren einerseits, von Inhibitoren andererseits reguliert wird. Ein solcher Inhibitor ist beispielsweise Angiostatin, das die Proliferation von Endothelzellen verhindern kann (McNamara, 1998). Dahingegen kommt es bei Tumoren, die ebenfalls solche Mechanismen für ihre Proliferation verwenden, zu einem Ungleichgewicht in der Expression der Gene der Wachstumsfaktoren und der Inhibitoren, sowie der Proteinsekretion. So können die Tumorzellen ungehemmt proliferieren.

Unter dem Begriff Angiogenese versteht man die Entstehung neuer Kapillaren durch Aussprossung bereits bestehender Gefäße als Antwort auf spezifische Signale (McNamara, 1998), wie z.B. Zytokine.

Die Hauptaufgabe fällt dabei den Endothelzellen zu, die alle Blutgefäße, auch die neugebildeten, auskleiden und deren Grundbaustein darstellen (McNamara, 1998). Sie behalten während ihrer gesamten Lebenszeit die Fähigkeit zur Teilung und Fortbewegung.

Unter dem Einfluß von Hypoxie, oder durch Zytokine, die durch umliegende Zellen oder durch Tumorzellen freigesetzt werden, kommt es zur Aktivierung der Endothelzellen. Sie können durch Fibrinolyse oder Proteolyse die extrazelluläre Matrix degradieren, um sie zu durchbrechen (Mc Namara, 1998). Nun findet zum Stimulus hin die Migration und eine Strangbildung statt, woraus sich anschließend durch Zusammenschluß von Vacuolen ein Lumen bildet (McNamara, 1998). Die Endothelzellen sind fähig, die Anzahl und Anordnung der Blutgefäße den örtlichen Begebenheiten anzupassen.

Normalerweise ist beim Erwachsenen die Neubildung von Gefäßen auf wenige Situationen wie Wundheilung und Endometrium begrenzt (McNamara, 1998).

Ansonsten wird sie streng durch ein Gleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren reguliert (McNamara, 1998; Folkman, 1995). Da jedes Gewebe die Blutversorgung zum Überleben braucht, ist auch das Wachstum von soliden Tumoren durch deren Blutversorgung begrenzt. Ohne eigene Kapillaren kann ein Tumor ein Maximalvolumen von 2-3 mm³ erreichen (McNamara, 1998). Ein Tumor mit einem größeren Volumen benötigt ein Kapillarnetz, um seine Belieferung mit Nährstoffen und Sauerstoff zu ermöglichen und Stoffwechselprodukte abzutransportieren (McNamara, 1998). Welche Umstände oder Faktoren die Angiogenese auslösen können, ist bisher nicht vollständig geklärt, da der Beginn der Angiogenese unabhängig vom Tumorwachstum ist und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Neoplasie einsetzen kann (Folkman, 1990).

Es kommt dabei zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen negativen und positiven Angiogenesefaktoren, wobei sowohl die antiangiogenetischen Faktoren (z.B. Thrombospondin) abnehmen, als auch die angiogenetischen Faktoren (z.B. VEGF) zunehmen müssen (Folkman, 1995). Sie werden durch die Tumorzellen oder durch infiltrierende Zellen wie Makrophagen oder Fibroblasten freigesetzt oder durch die extrazelluläre Matrix mobilisiert (McNamara, 1998; Folkman, 1995). Nun findet die oben erläuterte Bildung von Kapillaren durch Endothelzellen statt. Die Blutperfusion und auch die parakrine Stimulation der Tumorzellen durch zahlreiche Wachstumsfaktoren aus dem Kapillarendothel verursachen eine Expansion der Tumormasse. Zusätzlich bietet die Neovaskularisation dem Tumor durch den entstandenen Zugang zum Blutkreislauf die Möglichkeit zur Metastasierung (McNamara, 1998). Er kann nun Tumorzellen aussäen, die wiederum selbst Gefäße benötigen, um sich zu solchen Tumoren entwickeln zu können (Folkman, 1995).

Zu wichtigen Vertretern der angiogenetischen Faktoren zählen : Interleukin growth factor 2 (IGF2), Epidermal growth factor (EGF), Transforming growth factor α und β (TGF α,β), acid Fibroblast growth factor (aFGF), basic Fibroblast growth factor (bFGF), Pleiotrophin (PTN), Midkine (MK) und Vascular endothelial growth factor (VEGF).

1.2 Der Wachstumsfaktor Pleiotrophin

Pleiotrophin, das auch heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) (Merenmies und Rauvala, 1990) oder heparin binding growth factor 8 (HBGF-8) (Wellstein et al., 1992) genannt wird, ist ein Mitglied der heparinbindenden Wachstumsfaktorfamilie (Raulo et al., 1991). Das 18kDa schwere Protein teilt 50% seiner Sequenz mit Midkine. Anfänglich wurde es der FGF-Gruppe zugeordnet, da es viele Eigenschaften mit bFGF teilt (Wellstein et al., 1992; Merenmies und Rauvala, 1990). Es zeigt aber keine Homologie mit den Mitgliedern der FGF- Familie (Wellstein et al., 1992; Jäger et al., 1997). Pleiotrophin ist 135 Aminosäuren lang und wird sezerniert. Sein Anteil an kationischen Aminosäuren ist hoch (24% der Reste); mit einem ebenfalls hohen Anteil von 7% ist Cystein vertreten (Raulo et al., 1991). Während der perinatalen Periode wird PTN in Gehirn, Darm, Muskeln, Haut, Lungen und Nieren exprimiert (Merenmies und Rauvala, 1990). Im Gehirn von Neugeborenen stimuliert PTN den Auswuchs und die Differenzierung von Neuraxonen. Im Erwachsenenorgansimus wurde die Expression von PTN im Gehirn, in der Zunge und im Uterus nachgewiesen (Jäger et al., 1997). Außerdem wurde eine PTN-Expression in Lungengeweben von Erwachsenen entdeckt (Garver et al., 1993).

Zu den Aufgaben von PTN gehört die Regulation von Wachstums- und Differenzierungsprozessen während der neuronalen Entwicklung. Desweiteren stimuliert es die Plasminogen- Aktivator- Produktion. Es wirkt mitogen auf Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen (Wellstein et al., 1992; Souttou et al., 1998). In vivo kann es die Angiogenese induzieren, was durch Bildung von Tubuli in vitro nachgewiesen wurde (Souttou et al., 1998). Durch diese Eigenschaften spielt es wahrscheinlich auch eine Rolle in der Tumorangio-genese.

Die Expression von PTN wurde außer in normalem Gewebe auch in verschiedenen Krebszelllinien und Krebsgeweben nachgewiesen (Wellstein et al., 1992; Garver et al., 1994).

PTN wurde z.B. in Zelllinien von Melanom und Brustkrebs, nicht aber in Melanozyten oder menschlichem Brustepithel nachgewiesen (Souttou et al., 1998; Wellstein et al., 1992). Bei Patienten mit Pankreaskarzinom und bei Patienten mit Colon-Karzinom war die Konzentration von PTN im Serum erhöht (Souttou et al., 1998). In einer weiteren Studie wurde eine Expression und Sekretion von PTN von den Zelllinien des stark metastasierenden kleinzelligen Bronchialkarzinoms entdeckt, wohingegen keine Expression im normalen Lungengewebe nachgewiesen werden konnte (Jäger et al., 1997). PTN wird von den Tumorzellen selbst sezerniert (Souttou et al., 1998) und übt parakrine Effekte auf Fibroblasten und Endothelzellen aus. PTN kann die Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 transformieren: In Nacktmäuse wurden NIH 3T3-Zellen, die PTN-Plasmid enthielten, injiziert. An den Injektionsstellen kam es zur Bildung von soliden, stark vaskularisierten Tumoren (Chauhan et al., 1992).

1.3 Der Wachstumsfaktor Midkine

Midkine ist Mitglied einer neuen Familie von heparinbindenden Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und ist 14 kDa schwer. Der Faktor ist ein Produkt des Retinolsäure-Gens (Kitamura et al., 1993). Er besteht aus zwei Domänen, d.h. gefalteten Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind (Kaname et al., 1995). Es hat eine Länge von 123 Aminosäuren, wovon 25% basisch sind. Desweiteren hat es 10 Cysteinreste (Miyashiro et al., 1997). Es wird deshalb einer neuen Familie von Wachstumsfaktoren zugeordnet, weil keine Homologie zu der Sequenz der FGF-Gruppe besteht. Damit gehört es in die gleiche Familie wie der Faktor Pleiotrophin, der in 50% seiner Sequenz mit Midkine identisch ist (Aridome et al., 1998).

Midkine spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese: Man findet es vor allem während der Midgestationsperiode in vielen Geweben des Mäuseembryos, woher es auch seinen Namen hat. Bei erwachsenen Mäusen ist es nur noch in der Niere (Kitamura et al., 1993) und im Uterus (Tsutsui et al., 1993) nachweisbar.

Eine weitere wichtige Funktion übernimmt MK in der Förderung des Auswuchses von Neuraxonen (Aridome et al., 1998).

In Endothelzellen der Aorta unterstützt MK die Aktivität des Plasminogenaktivators (Kaname et al., 1995). In einigen Zelllinien von Fibroblasten konnten mitogene Effekte von Midkine nachgewiesen werden (Miyashiro, 1997).

Midkine wird im gesunden Gewebe der menschlichen Brust (Miyashiro et al., 1997) und gastrointestinaler Organe exprimiert, wobei jedoch in der Leber kein MK zu finden ist (Aridome et al., 1998). Eine starke Expression findet man vor allem im menschlichen Dünndarm, eine schwächere in der Schilddrüse (Tsutsui et al., 1993).

In verschiedenen Tumorzelllinien wurde eine starke Expression von MK festgestellt (Kitamura et al., 1993; Kaname et al., 1995), beispielsweise in Zelllinien des Colon-CAs, Wilms´Tumor, HepG2, G401 etc. Dort, wo eine hohe MK mRNA-Expression stattfindet, wird auch MK-Protein ins Medium sezerniert (Tsutsui et al., 1993). Durch den Einsatz von Antikörpern gegen MK konnte das Wachstum von kultivierten Wilms´Tumorzellen teilweise gehemmt werden (Miyashiro et al., 1997).

Auch in operativ entferntem malignem Gewebe der Mamma (Miyashiro et al., 1997), gastrointestinaler Organe und des Wilms´Tumors (Tsutsui et al., 1993; Miyashiro et al., 1997) ist die Expression von MKmRNA nachweisbar, nicht jedoch beim Lebercarcinom (Aridome et al., 1998). Die Expression der mRNA von MK ist in malignem Gewebe stärker als im entsprechenden gesunden Gewebe (Miyashiro et al., 1997).

Neben dem Wildtyp von MK wurde eine weitere Form entdeckt, die nur 55% der Größe von MK hat. Dieser trunkierten Form fehlt Exon 3 und dadurch die N-terminale Domäne (Kitamura et al., 1993). Mit der vorhandenen C-terminalen Domäne kann jedoch auch die trunkierte Form von MK ihre Funktionen erfüllen (Miyashiro et al., 1997).

Sie unterstützt ebenfalls den Auswuchs von Neuronen und die Aktivität des Plasminogenaktivators. Durch ihre Anfälligkeit für Proteasen ist sie jedoch kurzlebiger als die Wildtypform (Kitamura et al., 1993).

Das trunkierte Midkine wurde in verschiedenen Krebszelllinien entdeckt, z.B. in Zelllinien des Pankreas-CAs, des hepatozellulären CAs, des Magenadenocarcinoms und in der Zelllinie G401, (Kaname et al., 1995; Miyashiro et al., 1997).

Überdies wird es wie die Wildtypform von MK in vielen Tumorarten exprimiert (s.o.). Allerdings entdeckte man im Magen-CA die trunkierte Form erst bei Tumoren ab Stadium 2 (TNM-Klassifikation). Außerdem wurde trunkiertes MK im Primärtumor und in Lymphknotenmetastasen gastrointestinaler Tumoren, nicht jedoch in Lebermetastasen nachgewiesen (Aridome et al., 1998).

Ganz im Gegensatz hierzu steht das gesunde Gewebe: Die trunkierte Form konnte hier bisher nicht nachgewiesen werden und scheint daher krebsspezifisch zu sein (Miyashiro et al., 1997; Aridome et al., 1998; Kaname et al., 1995).

1.4 Vergleich: Pleiotrophin und Midkine

Trotz der Homologie in 50% ihrer Sequenz und ihren ähnlichen Funktionen weisen die beiden Wachstumsfaktoren Pleiotrophin und Midkine Unterschiede in ihren Expressionsmustern auf. So wird PTN vor allem von Neuroblastomen stark exprimiert, die sich in den Stadien 1, 2 oder 4s mit späterer Remission oder Differenzierung befinden. Dahingegen ist der Spiegel von PTN bei NB der Stadien 3 / 4 und bei N-myc amplifizierten Tumoren niedrig, bzw. es wird gar kein PTN exprimiert (Nagakawara et al., 1995). Im Gegensatz dazu findet sich eine starke Expression von MKmRNA in allen Neuroblastomen. Besonders stark wird es von aggressiven Formen exprimiert.

Ähnliche Erkenntnisse gewann man durch den Vergleich der Expression der mRNA beider Faktoren im normalen Lungengewebe gegenüber der im nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom. PTN wird nur in normalem, MK fast ausschließlich in malignem Gewebe exprimiert (Garver et al., 1993).

Beim Mamma-Karzinom sieht dies anders aus: Während MK wieder fast nur im malignen Gewebe vorzufinden ist, gibt es sowohl im gesunden als auch im malignen Gewebe eine Expression von PTN (Garver et al., 1994).

1.5 Der Wachstumsfaktor bFGF

Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), der auch FGF-2 oder Heparin-Binding Growth factor 2 (HBGF-2) genannt wird, wurde 1974 zum ersten Mal isoliert (Gospodarowicz et al., 1987).

bFGF kommt in fast allen Geweben vor, die sich von Neuroektoderm oder Mesoderm ableiten (Gospodarowicz et al., 1987), und außerdem in den sich hieraus entwickelnden Tumoren, wie z.B. Melanom, Chondrosarkom und Hepatom (Wright und Huang, 1996). Er kommt in vielen Tumorzelllinien, wie z.B. in der Neuroblastomzelllinie IMR32 (Janet et al., 1995), in der Prostatazelllinie LNCaP (Zuck et al., 1995) u.v.m. vor und wird von endothelialen Zellen synthetisiert (Abraham et al., 1986). Die Endothelzellen exprimieren sowohl das Gen als auch das biologisch aktive Produkt des Faktors (Gospodarowicz et al., 1987). Viele Zellen speichern bFGF in einer biologisch inaktiven Form (Abraham et al., 1986), die im Zuge der Tumorzellvermehrung freigesetzt und aktiviert werden kann. bFGF kommt auch im Nucleolus von Zellen vor (Yaon und Klagsbrun, 1990; Wright und Huang, 1996), was auf eine Kontrolle des basalen Zellwachstums durch Regulation der Gen-Transduktion hinweisen könnte.

Der Faktor wird als 155 Aminosäuren langes Protein synthetisiert, tritt aber in sequenzierter Form ohne seine aminoternale Extension von 9 Aminosäuren auf, d.h. mit einer Länge von 146 AS (Abraham et al., 1986). Das Protein ist nicht glykolysiert, hat keine Disulfidbrücken und wird auch nicht sezerniert (Abraham et al., 1986; Yaon und Klagsbrun, 1990). Auffällig ist, daß bFGF keine Signalsequenz besitzt, mit der sich Proteine normalerweise aus der Zelle ausschleusen können (Wright und Huang, 1996). Durch Zugabe einer passenden Signalsequenz jedoch kann es zu einem transformierenden Onkogen werden: Werden NIH-Zellen mit einem Konstrukt, das cDNA von bFGF mit einer Signalsequenz enthält, transfiziert, kommt es zu einer autokrinen Transformation der Zellen durch bFGF. Sie zeigen morphologische und biochemische Veränderungen, die für stark transformierte Zellen charakteristisch sind (Yaon und Klagsbrun, 1990).

bFGF zeigt eine hohe Affinität zu Heparin und hat zwei Domänen für die Bindung an das in der extrazellulären Matrix vorkommende Glycosaminoglycan (Gospodarowicz et al., 1987). Dabei wirkt Heparin als Stabilisator für das labile bFGF- Protein. Wenn es nicht an die Matrix gebunden ist, wird es sehr schnell inaktiviert (Yaon und Klagsbrun, 1990). Darüber hinaus dient Heparin als Schutzfaktor für bFGF vor Inaktivierung durch Hitze oder proteolytischer Degradierung unter sauren Bedingungen, z.B. in Lysosomen (Yaon und Klagsbrun, 1990; Wright und Huang, 1996). Dadurch verlängert Heparin die Halbwertszeit von bFGF.

Viele Zellarten tragen auf ihrer Oberfläche spezifische hochaffine Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, die die biologische Aktivität von bFGF vermitteln (Yaon und Klagsbrun, 1990). Das an den Rezeptor gebundene Protein wird dabei langsam internalisiert und in der Zelle nicht vollständig, sondern in Fragmente degradiert (Gospodarowicz et al., 1987).

bFGF trägt während der Embryonalentwicklung zu Differenzierungs- und Wachstumsprozessen bei (Gospodarowicz et al., 1987, Wright und Huang, 1996). Es verstärkt den Auswuchs von Neuriten und schützt das neuronale Überleben im ZNS. Das Wachstum vieler Zellarten und auch Zelllinien (z.B. SW13; Zuck et al., 1992; SK-N-SH; Janet et al., 1995) wird durch bFGF stimuliert, die Differenzierung von Zellen wird entweder inhibiert oder gefördert, und die Zellalterung wird verzögert (Gospodarowicz et al., 1987).

Desweiteren ist bFGF beim Erwachsenen an der Wundheilung beteiligt. Gegenüber Endothelzellen, Fibroblasten und Astrogliazellen zeigt es chemotaktische Fähigkeiten (Yaon und Klagsbrun, 1990). Durch die unterstützende Funktion bei der Degradierung von Kapillarmembranen, bei der Migration und Proliferation von Endothelzellen und durch die Produktion von Plasminogen-Aktivator spielt es eine wichtige Rolle in der Angiogenese. Dadurch wird bFGF auch zu einem Mediator der Tumorangio-genese (Gospodarowicz et al., 1987). bFGF kann zwar weder Tumoren noch eine Metastasierung induzieren, aber bei übermäßiger Expression des Faktors kommt es zu Änderungen der Morphologie und zu einer Steigerung des Wachstums von Zellen:

So kommt es z.B. bei der Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 durch die Wirkung von bFGF zu einer autkorinen Transformation (Yaon und Klagsbrun, 1990; Wright und Huang, 1996).

1.6 Der Wachstumsfaktor VEGF

Vascular endothelial growth factor (VEGF), auch bekannt als Vascular Permeability Factor (VPF), ist ein homodimeres 34-42 kDa schweres Glykoprotein. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Frühentwicklung von Gefäßen, wo es als zentraler Stimulus für die Gefäßentwicklung gilt. VEGF wird in zeitlicher und räumlicher Korrelation mit physiologischen Ereignissen während der Angiogenese exprimiert (Kim et al., 1993; Plate und Warnke, 1997). Wenn keine Angiogenese mehr stattfindet, wird VEGF herunterreguliert, wie es im Gehirn erwachsener Mäuse gezeigt wurde (Plate und Warnke, 1997). Darüberhinaus fördert es die vaskuläre Permeabilität, indem es Blutgefäße fenestriert und Kanäle für aus dem Blut kommende Proteine bildet. Dadurch erhielt es auch seinen Namen VPF. Dieser Vorgang kann zu Ödemen führen, z.B. bei Glioblastomen (Plate und Warnke, 1997). Alle genannten Funktionen erfüllt VEGF über Bindung an spezifische Rezeptoren, die hauptsächlich auf Endothelzellen vorkommen. VEGF gilt außerdem als mitogener Faktor für Endothelzellen (Plate und Warnke, 1997). VEGF ist auch für malignes Gewebe wie z.B. für das Prostata-Karzinom ein wichtiger Angiogenesefaktor (Ferrer et al., 1998). Der Faktor wird von verschiedenen Tumorzelllinien und von fast allen soliden Tumoren exprimiert (Barleon et al., 1997). Es wurden hohe Serum-Spiegel des VEGF Proteins bei Patienten mit Neoplasien von Nieren, Dickdarm, Ovar und Gehirn gefunden und gleichzeitig eine Korrelation zwischen der Höhe des VEGF-Spiegels im peripheren Blut und dem Ausmaß der Vaskularisierung des Tumors (Ferrer et al., 1998) bestätigt. Beim Colon-Karzinom wurde beobachtet, daß sich das Ausmaß der Tumordifferenzierung umgekehrt proportional zur Höhe des VEGF-Spiegels verhält.

Im Vergleich dazu konnte man bei normalem Prostatagewebe und bei benigner Prostatahyperplasie keine Expression des Faktors (Ferrer et al., 1998), in weiteren gesunden Geweben nur eine schwache Expression feststellen (Tokunaga et al., 1998). Der Faktor wird von den Tumorzellen sowohl exprimiert als auch sezerniert (Plate und Warnke, 1997).

In einem Versuch von Kim et al. (1993) wurden in Nacktmäuse Tumorzellen injiziert, die VEGF exprimieren und sezernieren. Bei Zugabe von monoklonalen Antikörpern gegen VEGF kam es zu einer Wachstumshemmung der Tumoren, was als ein weiterer Hinweis für seine Rolle als Wachstumsfaktor gelten könnte. VEGF existiert in fünf Isoformen, die als alternative Spliceprodukte der mRNA entstanden sind. Sie unterscheiden sich in ihrer Länge und in ihrer Fähigkeit, an Heparin bzw. Heparansulfat zu binden. Die kürzeste Form mit einer Länge von 121 Aminosäuren bindet weder an Heparin noch an die extrazelluläre Matrix. VEGF121 und VEGF 165 sind lösliche Proteine, die beide ins Medium sezerniert werden. VEGF165 kann an Heparin binden. Die Isoformen VEGF 189 und 206 haben eine hohe Affinität zu Heparin und sind meist an heparinhaltige Proteoglykane der extrazellulären Matrix gebunden. Daneben kommt noch die Isoform VEGF145 vor, die eine weniger starke Affinität zu Heparin zeigt. Die meisten Zellarten produzieren alle VEGF-Varianten, wobei VEGF 121 und 165 dominieren (Neufeld et al., 1999; Tokunaga et al., 1998). Die Expression von VEGF wird durch verschiedene äußere Einflüsse stimuliert. Als Hauptstimulator gilt die Hypoxie: Je mehr sich ein Tumor vergrößert, um so mehr entfernen sich die Tumorzellen vom nächstgelegenen Blutgefäß. Sie geraten in einen hypoxischen Zustand und beginnen VEGF zu produzieren. Ein VEGF-Gradient entsteht, und es bilden sich neue Blutgefäße in Richtung des Signals (Neufeld et al., 1999).

Genauso wie der Faktor selbst, wird auch die Produktion seiner Rezeptoren vor allem durch Hypoxie stimuliert. Es gibt zwei bedeutende Rezeptoren, FLT-1 und flk-1, die hauptsächlich auf Endothelzellen gefunden werden. Sie können alle Isoformen von VEGF binden und dadurch sowohl proteolytische Prozesse als auch die Migration und die Proliferation von Endothelzellen induzieren, um so neue Blutgefäße zu bilden (Barleon et al., 1997).

Die mitogene Antwort wird durch den FLT-1- Rezeptor vermittelt, der während der Embryogenese stark produziert, im Erwachsenenengehirn dann aber herunterreguliert wird (Plate und Warnke, 1997).

Seine Produktion kann durch VEGF selbst hochreguliert werden (Barleon et al., 1997). Der zweite Rezeptor flk-1 (oder KDR) ist zusammen mit FLT-1 für die Vermittlung der Zellmigration zuständig (Neufeld et al., 1999).

In der Unterbrechung der VEGF / VEGF-Rezeptor- Signaltransduktion bietet sich möglicherweise ein Ansatz zur Therapie von Tumorerkrankungen durch Hemmung der Angiogenese (Neufeld et al., 1999).

1.7 Mögliche Bedeutung proinflammatorischer Zytokine für die Regulation heparinbindender Wachstumsfaktoren

Es gibt Hinweise darauf, daß proinflammatorische Zytokine, wie Tumor-Nekrose- Faktor- α (TNF α), Interleukin- 1 β (IL-1 β) und Interferon γ (IFN γ) an der Regulation heparinbindender Wachstumsfaktoren beteiligt sind, da in peritumoralem Gewebe die Expression dieser Zytokine nachgewiesen werden konnte.

In Proben von Gehirntumoren entdeckte Nitta et al. (1994) im peritumoralen Gewebe sowie in den Tumoren selbst, nicht aber im gesunden Gewebe, die Expression des TNF α -Gens und auch die Produktion von TNF α .

Der Tumor-Nekrose-Faktor α gehört zu den wichtigen Neuromediatoren bei neuronalen Erkrankungen. Das 17 kDa schwere, nicht glykolysierte Protein ist ein Trimer von 157 Aminosäuren Länge und wird von vielen verschiedenen Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, Tumorzellen u.a., produziert. Durch seine Rolle bei der Entstehung hämorrhagischer Nekrosen in Tumoren erhielt es seinen Namen. TNF α wirkt pleiotroph auf verschiedene Zellen: Es aktiviert Tumorzellen, regt die Mitogenese von Fibroblasten an, aktiviert die Expression von Interleukin-1, u.v.m. (Nitta et al., 1994). Bei TNF α sind einerseits antiproliferative Effekte auf verschiedene Tumorzellen bekannt, andererseits kann es das Wachstum von Tumorzellen wie z.B. Zellen des

Ovarialkarzinoms stimulieren (Wang et al., 1997). Zudem induziert es in der Prostatakarzinomzelllinie Du-145 den Wachstumsfaktor VEGF (Ferrer et al., 1998).

Wie $\text{TNF}\alpha$ wirkt auch das Zytokin Interferon γ ($\text{IFN}\gamma$) antiproliferativ auf verschiedene Zelltypen, wie z.B. auf die Hepatoblastomzelllinie HepG2, deren Zellzahl unter $\text{IFN}\gamma$ - Einfluß um 23% abfällt (Wang et al., 1997).

Das u.a. von aktivierten T-Zellen produzierte Protein ist ein Dimer von 146 Aminosäuren Länge und ist glykolysiert. $\text{IFN}\gamma$ wird von verschiedenen Astrozytomzelllinien in kleinen Mengen synthetisiert. Es stimuliert synergistisch mit Interleukin- 1β ($\text{IL-1}\beta$) die Synthese des $\text{TNF}\alpha$ -Gens in Neurogliazellen, und beide Zytokine werden für die Proteinsynthese von $\text{TNF}\alpha$ benötigt (Nitta et al., 1994).

$\text{IL-1}\beta$ ist ein Protein, das vor allem von aktivierten Makrophagen und Lymphoidzellen synthetisiert wird, 17 kDa schwer und 153 Aminosäuren lang ist (Scheil et al., 1994). Es verstärkt den inhibierenden Effekt von bFGF auf die Neuroblastomzelllinie GIMEN. $\text{IL-1}\beta$ kann von Astrozyten sezerniert werden, die mit Endotoxin stimuliert wurden. Bei Gehirnverletzungen und degenerativen Erkrankungen finden sich erhöhte $\text{IL-1}\beta$ -Spiegel (Scheil et al., 1994).

Auch $\text{IL-1}\beta$ hat wie $\text{TNF}\alpha$ stimulierende Einflüsse auf die Sekretion des Faktors VEGF in der Zelllinie Du-145 (Ferrer et al., 1998).

Yoshida et al. (1997) bezeichnet VEGF und bFGF als second messenger von $\text{TNF}\alpha$. Er behandelte Gefäßendothelzellen mit $\text{TNF}\alpha$ und wies einen zeit- und dosisabhängigen Anstieg der Expression der mRNA von VEGF und bFGF nach. Dies könnte man als parakrinen Loop für die Neovaskularisierung von Geweben sehen (Ryuto et al., 1996).

Eine mögliche Regulation heparinbindender Wachstumsfaktoren durch proinflammatorische Zytokine ist für uns insofern von besonderem Interesse, als eine intraoperative Antagonisierung der Wachstumsfaktoren durch Heparin-Analoga sinnvoll erscheint. Es konnte bereits nachgewiesen werden, daß bei großen Tumoroperationen massiv Zytokine in die Blutbahn ausgeschüttet werden (Barthlen et al., 1994).

1.8 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom (NB) ist der häufigste extrakranielle Tumor im Kindesalter und geht von den postganglionären Zellen des sympathischen Grenzstranges aus.

10% aller onkologischen Erkrankungen im Kindesalter sind Neuroblastome. Sie sind für 15% der durch Krebs verursachten Todesfälle in der pädiatrischen Altersgruppe verantwortlich. Die Prävalenz des NB beträgt 1 Fall von 10000 Lebendgeburten, was 525 Neudiagnosen pro Jahr in Deutschland entspricht. Das Durchschnittsalter der Patienten beträgt zum Diagnosezeitpunkt 22 Monate. Die Prognose für Kinder, bei denen die Diagnose während dem 1. Lebensjahr gestellt wird, ist günstiger als die für ältere Kinder (s.Tab.2).

Bei ca. 30% der NB stellt man eine Amplifikation des N-myc Gens fest. Das Genprodukt des N-myc Gens kodiert für ein nukleäres Protein, das die Transkription von Genen steuert, die die Zellproliferation beeinflussen. In NB kann das N-myc Gen bis zu 700fach amplifiziert sein. Das Auftreten des N-myc Gens ist assoziiert mit fortgeschrittenem Stadium und schlechter Prognose, unabhängig von Alter und Stadium zum Zeitpunkt der Diagnose.

In inverser Beziehung zum N-myc Gen steht der Tyrosin-Kinase-Rezeptor A (TRK –A) für den Nerve Growth Factor (NGF), der für die Differenzierung von Neuralzellen verantwortlich ist. Eine hohe Expression des TRK-A Rezeptors bedeutet für alle Stadien eine günstige Prognose.

In Neuroblastomen werden Karyotypen von sehr unterschiedlicher Chromosomenzahl gefunden. Dabei zeigen Tumoren mit diploidem Karyotyp eine schlechtere Prognose als solche mit einem hyperdiploiden.

Das Ausmaß der Gefäßversorgung der Tumoren ist mit der N-myc-Amplifikation, dem Ausmaß der Metastasierung und schlechten Überlebenschancen positiv korreliert (Brodeur et al., 1988).

Das primäre NB befindet sich bei einem Großteil der Patienten im Bauchraum, wo es als feste unverschiebliche Masse häufig als erstes Symptom tastbar ist. Weitere anfängliche Symptome können auch Gewichtsverlust, Schmerzen oder

Aufblähung des Abdomens sein. 50-60% der Kinder befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnose bereits im disseminierten Stadium.

Es gibt ein Screening-Programm u.a. in Japan, das die Bestimmung der Vanillinmandelsäure oder der Homovanillinsäure im Urin vorsieht. Diese entstehen als Abbauprodukte des Katecholaminstoffwechsels und sind beim NB oft erhöht.

Nach dem abdominellen Ultraschall kommen CT und MRI zur weiteren Bestimmung des Tumorausmaßes zum Einsatz.

Bei positiver histologischer Diagnose ist dann die Zuordnung zu einem Stadium Grundlage für Therapie und Prognose. Die Einteilung erfolgt nach dem International Tumor Staging System (INSS), das weltweit anerkannt und bei allen standardisierten Therapieprotokollen für NB angewendet wird:

<u>Stadium</u>	<u>Definition</u>
1	Lokalisierter Tumor mit vollständiger grober Exzision, mit oder ohne mikroskopischen Rückständen; ipsilaterale LK mikroskopisch NB-negativ (mit dem Tumor entfernte LK können positiv sein).
2A	Lokalisierter Tumor mit unvollständiger grober Exzision; ipsilaterale, nichtadhärente LK mikroskopisch NB-negativ.
2B	Lok. Tumor mit oder ohne kompletter Exzision; ipsilaterale, nichtadhärente LK NB-positiv. Vergrößerte, kontralaterale LK müssen mikroskopisch NB-negativ sein.
3	Unresezierbarer unilateraler Tumor, der die Mittellinie überschreitet; oder lokalisierter, unilateraler Tumor mit kontralateraler, regionaler LK-Beteiligung; oder Mittellinien-Tumor mit bilateraler Extension durch Infiltration (unresezierbar) oder durch LK-Beteiligung
4	Jeder Primärtumor mit Dissemination zu entfernten LK, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/oder anderen Organen
4S	Lokalisierter Primärtumor (wie 1, 2A, 2B), mit Dissemination nur in Haut, Leber, und/oder Knochenmark; Alter des Patienten unter 1 Jahr

Tab.2: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach dem INSS

Einleitung

Für Therapie und Prognose kann man nun die Patienten anhand von biologischen und genetischen Merkmalen in Nieder-, Mittel- und Hoch-Risiko Gruppen einteilen. Folgende Einteilung stammt von der Children's Cancer Group (CCG) und der Pediatric Oncology Group (POG):

Risiko Gruppe	Faktoren	
Nieder	Stadium1	
	Stadium2	Alter < 1 Jahr > 1 Jahr, niedriges N-myc > 1 Jahr, N-myc amplifiziert; vorteilhafte Histologie
	Stadium 4S	vorteilhafte Histologie
Mittel	Stadium 3	< 1 Jahr, niedriges N-myc > 1 Jahr, vorteilhafte Biologie*
	Stadium 4	< 1 Jahr, niedriges N-myc
	Stadium 4S	niedriges N-myc
Hoch	Stadium 2	> 1 Jahr, ungünstige Biologie
	Stadium 4	< 1 Jahr, N-myc amplifiziert > 1 Jahr
	Stadium 4S	N-myc amplifiziert

[*Eine günstige Biologie liegt vor bei niedriger N-myc Amplifikation, vorteilhafter Histologie und Hyperdiploidie (Säuglinge)]

Tab.3: Risikogruppeneinteilung für Therapie und Prognose von Neuroblastomen nach der CCG und POG

Bei allen drei Risikogruppen spielt die Chirurgie die Schlüsselrolle in der Therapie des NB, da sie dazu dient, die Diagnose zu sichern und Gewebe für biologische und histologische Untersuchungen bereitzustellen. Bei lokalisierten Tumoren stellt sie die endgültige Therapie dar.

Dies trifft für Patienten der ersten Gruppe zu, die nach der vollständigen Entfernung des Tumors nur dann mit Chemotherapie behandelt werden, wenn es zu einem lokalen Wiederauftreten des Tumors kommt. Für Patienten, die sich im Stadium 4S befinden, ist eine Exzision selten nötig, da sich hier die Tumoren häufig spontan zurückbilden. Alle Patienten der ersten Gruppe haben eine hohe Überlebenschance (90 %).

Bei Patienten der mittleren Gruppe wendet man eine Kombination aus operativer Therapie und moderat aggressiver Chemotherapie an. Rezidivierende oder irresektable Tumoren werden bestrahlt. Diese Gruppe hat eine Überlebenschance von 50-70 %.

Zu einer multimodalen Therapie geht man bei Patienten der Hoch-Risiko-Gruppe über. Trotz Anwendung von Chirurgie, Chemotherapie und Radiotherapie überleben aber nur 10-20 % der Patienten. Neue Therapieverfahren sind daher dringend erforderlich (Haase et al., 1999).

1.9 Der Wilms´Tumor (Nephroblastom)

Der Wilms´Tumor (WT) ist der häufigste Tumor der Niere bei Kindern und Säuglingen. Seine Inzidenz liegt bei 8 von 100000 Kindern unter 15 Jahren oder einem Fall pro 10000 Säuglingen.

In einigen Fällen des WT tritt eine Deletion am kurzen Arm des Chromosom 11 auf, welche das mutmaßliche Wilms´Tumor Suppressor Gen (WT1) miteinschließt.

Das Proteinprodukt dieses Gens ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression anderer Gene reguliert, welche wachstumsinduzierend sind. Die Unterdrückung dieser Gene durch WT1 erklärt möglicherweise seine Rolle als Wilms´Tumor-Suppressor-Gen. Das Auftreten von „nephrogenen Resten“ wird mit dem Auftreten des WT in Verbindung gesetzt. Unter nephrogenen Resten versteht man persistierendes Nachnierengewebe über die 36. Schwangerschaftswoche hinaus. Diese Reste werden als prä-maligne angesehen. Ein Großteil von ihnen bildet sich spontan zurück, ohne einen Tumor zu produzieren. Dennoch werden sie regelmäßig in Assoziation mit Wilms´Tumoren gefunden.

Histologisch werden Wilms´Tumoren in niedrigmaligne, intermediäre und

hochmaligne Formen unterteilt. Zur letzten Gruppe gehören Kinder mit fokaler oder diffuser Anaplasie. Das erste Symptom des WT ist meist ein großer abdomineller Tumor. Schmerzen oder Hämaturie treten selten auf. Nach dem Ultraschall sichert ein CT die Diagnose. Ein Lungen-CT sucht nach möglichen pulmonalen Metastasen. Dabei ist entscheidend, ob eine Beteiligung der Vena renalis vorliegt, da es bei einer Operation zu einer Embolie des Tumors kommen kann.

Je nach Tumorstadium und Venenbeteiligung wird eine adjuvante Chemotherapie oder additive Radiotherapie angeschlossen. Präoperative Behandlung des Tumors mit Radio- oder Chemotherapie ist bei Kindern mit solitärer Niere, bilateralen Nierentumoren, Hufeisennieren und diffuser Lungenmetastasierung erforderlich.

Folgende Stadieneinteilung wird von der National Wilms`Tumor Study Group (NWTSG) verwendet:

<u>Stadium</u>	<u>Beschreibung</u>
I.	Tumor auf Niere begrenzt und vollständig entfernt ohne Ruptur oder Biopsie. Oberfläche der Nierenkapsel intakt.
II.	Tumor überschreitet die Nierenkapsel, ist aber komplett entfernt ohne mikroskopische Beteiligung der Ränder. Außerdem Fälle, bei denen vor Entfernung des Tumors eine Biopsie entnommen wurde oder bei denen es während der Resektion zu einer Ausbreitung des Tumors im Tumorbett kam.
III.	Übrigbleibender Tumor, auf das Abdomen beschränkt, ohne hämatogene Ausbreitung. In dieses Stadium werden auch eingestuft: Tumore mit abdomineller Lymphknotenbeteiligung; durch Tumorruptur verursachte diffuse peritoneale Kontaminationen, weit über das Tumorbett hinausreichend; peritoneale Implantate; und mikroskopische oder grobe positive Resektionen der Ränder.
IV.	Hämatogene Metastasen
V.	Bilaterale Nierenbeteiligung

Tab.4 : Stadieneinteilung für Wilms` Tumoren nach der NWTSG

1.10 Das Hepatoblastom

Nach dem Neuroblastom und dem Wilms´Tumor steht die Leber an dritter Stelle der Organe, die im Kindesalter am häufigsten von soliden malignen Erkrankungen befallen werden. Primäre Neoplasien der Leber sind die zehnthäufigste Ursache für pädiatrische onkologische Erkrankungen. Hierbei ist das Hepatoblastom am häufigsten vertreten. Es tritt fast nur bei Kindern unter 3 Jahren auf; Jungen erkranken 1,5 mal häufiger als Mädchen (Reynolds, M.1999).

Das Hepatoblastom ist ein embryonaler Tumor. Während der Organogenese kann es zu einer Störung kommen, die eine Verlängerung der Proliferation von Zellen zulässt. Dies führt zu einer Ansammlung von unreifem Gewebe, welches sich dann als embryonaler Tumor manifestiert. Hepatoblastome sind meist unifokale, gekapselte Tumoren. Man unterscheidet zwei histologische Typen: Neben der rein epithelialen gibt es eine gemischte Form, die zusätzlich zum epithelialen Gewebe noch mesenchymale Anteile enthält.

Es wurde eine Deletion des Chromosom 11 im Tumorgewebe gefunden. Für Mitglieder von Familien, bei denen die adenomatosis coli auftritt, besteht ein erhöhtes Risiko für ein Hepatoblastom(Reynolds, M.1999).

Der Tumor präsentiert sich schmerzlos als eine sich vergrößernde abdominelle Masse. Bei 70% der Patienten ist das Alpha-Feto-Protein im Serum als Produkt des embryonalen Endoderms erhöht (Reynolds, M.1999).

Das Hauptziel in der Therapie des HB ist die komplette Resektion des Tumors, woran sich eine Chemotherapie anschließt. Bei der Hälfte der Patienten ist eine präoperative Chemotherapie notwendig. Die Überlebensrate für Kinder, deren Primärtumor komplett entfernt werden konnte, übersteigt 75%. Allerdings können nach partieller Hepatektomie Rezidive in Leber und Lunge auftreten (Reynolds, M.1999). Bei Patienten mit multiplen Tumoren und nodalen Metastasen ist die Prognose allerdings ungünstig (Bhattacharya, S. 1998).

1.11 Fragestellung

In der Behandlung maligner, blastomatöser Tumoren im Kindesalter, besonders beim Neuroblastom, sind neue Therapieansätze notwendig, um die Prognose weiter zu verbessern. Ein neuer Ansatz könnte die Antagonisierung heparinbindender Wachstumsfaktoren sein. Darum ist die genaue Kenntnis der Expression und Regulation von Wachstumsfaktoren unerlässlich. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit folgenden Fragen nachgegangen:

- 1) Welche der Wachstumsfaktoren Pleiotrophin, Midkine, basic Fibroblast Growth Factor und Vascular Endothelial Growth Factor werden von Zelllinien von humanen Neuroblastomen, Wilms´Tumoren und Hepatoblastomen exprimiert?

- 2) Sind die proinflammatorischen Zytokine Tumor- Nekrose- Faktor α , Interleukin-1 β und Interferon γ an der Regulation der genannten Wachstumsfaktoren beteiligt?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Plastikwaren, Chemikalien und Zelllinien

2.1.1 Geräte

Folgende Geräte wurden für die Versuche verwendet:

Sterile Werkbank HLB 2472GS: Heraeus Lamin Air, Hanau

Variofuge K :Heraeus- Christ, Osterode

Tischzentrifuge Mikroliter: Hettich, Tuttlingen

Mikrowaage Analytic A 120S: Sartorius, Göttingen

Wasserbad: GfL, Burgwedel

Begasungsbrutschrank: Heraeus, Hanau

ELISA-Reader: Wallac

PCR-Cycler: Mini-Cycler von MJ Research

Elektrophoresegelelkommer: Hoefer, San Francisco

UV-Tisch: LTF-Labortechnik

Video Copy Processor(P67E): Mitsubishi

Thermal Paper (K65HM): Mitsubishi

2.1.2 Kunststoffmaterialien

Einmalpipetten: Greiner, Nürtingen

Zentrifugenröhrchen: Greiner, Nürtingen

Zellkulturflaschen (75 cm²) Costar: Tecnomara, Fernwald

Einfrierröhrchen (1,2 ml) Costar: Tecnomara Fernwald

Probengefäße (2 ml): Eppendorf, Hamburg

Probengefäße (15 ml):Greiner, Nürtingen

Makroplatte: Greiner, Nürtingen

Cell-Scraper: Falcon

2.1.3 Chemikalien

Salze, Lösungsmittel und Ethidium Bromid wurden in p.A. Qualität bei Sigma und Merck gekauft.

RPMI-1640 Medium, MEM-Earle-Medium, Mc Coy's 5A-Medium, PBS-Dulbeco, Trypsin und fötales Kälberserum stammten von der Firma Seromed, Berlin.

Hepes Puffer, Gentamycin, Agarose und Taq Polymerase wurden von der Firma Gibco, Eggenstein geliefert.

Dimethylsulfoxid (DMSO) war von Merck, Darmstadt.

Die Zytokine TNF- α , IL-1 β und IFN- γ lieferte die Firma PromoCell, Heidelberg.

DNase und dNTPs stammen von Pharmacia, Freiburg.

Der RNase Inhibitor wurde von Roche bezogen.

AMV Reverse Transkriptase war von Stratagene.

2.1.4 Zelllinien

Die Neuroblastomzelllinie IMR-32 wurde am Institut of Medical Research, Camden, New Jersey etabliert und von der American Type Culture Collection gekauft.

Die Neuroblastomzelllinie Kelly wurde an der Mount Sinai School of Medicine, New York etabliert und von der Kinderklinik Tübingen zur Verfügung gestellt.

Die NB- Zelllinie SK-N-SH, wurde am Sloan-Kettering Institut, NY, etabliert und über die American Type Culture Collection (ATCC Nr.HTB 11) bezogen.

Die Zelllinie IMR-5.75 wurde uns zusammen mit der Neuroblastomzelllinie Wac2 vom DKFZ Heidelberg durch Professor Schwab freundlich zur Verfügung gestellt.

Die Hepatoblastomzelllinie Hep G2 wurde aus dem Gewebe eines 15 jährigen Jungen gewonnen. Die zweite Hepatoblastomzelllinie C3A ist ein geklontes Derivat von Hep G2 und wurde vom Baylor College of Medicine, Houston erstellt.

Beide Zelllinien stellte ebenfalls die American Type Culture Collection bereit.

Die Wilms´Tumor Zelllinie G401 stammt von einem Tumor eines 3 monatigen Jungen. Sie wurde von P.T. Peebles, NIH, Bethesda vorgelegt und auch über die ATCC bestellt.

2.2 Zellkultur

Die gesamte Arbeit mit Zellkulturen wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Kulturmedien:

RPMI-1640-Medium wird supplementiert mit:

10% FCS
2 mM L-Glutamin
25 mM Hapes-Puffer
50 µg/ml Gentamycin

Für den Versuch „Serumenzug“ wurden die gleichen Mengen verwendet, jedoch ohne Zugabe des Fötalen Kälberserums.

Mc Coy's 5a Medium wird supplementiert mit:

10% FCS
1,5 mM L-Glutamin
50 g/ml Gentamycin

MEM mit Earle's-Salzen wird supplementiert mit:

10% FCS
2 mM L-Glutamin
1,5 g/L Natrium-Bicarbonat
0,1 mM nichtessentiellen Aminosäuren
1,0 mM Natrium-Pyruvat
50 µg/ml Gentamycin

Einfriermedium:

40% RPMI
45% FCS
15% Dimethylsulfoxid (DMSO)

Das Medium wird bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

Herstellung der Zytokin-Stammlösung:

TNF α : 10 µg TNF α werden aufgelöst in:
0,9 ml Aqua destillata
0,1 ml BSA (1mg/ml)

Dies ergibt eine Konzentration von 10000 ng/ml.

Die Lösung wird aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

IL-1 β : 10 μ g IL-1 β werden aufgelöst in:
0,9 ml Aqua destillata
0,1 ml BSA (1 mg/ml)

Auch diese Lösung hat eine Konzentration von 10000 ng/ml.
Die Aliquoute werden ebenfalls bei -20° C gelagert.

Interferon γ : 50 μ g IFN γ werden aufgelöst in:
4,5 ml Aqua destillata
0,5 ml BSA (1 mg/ml)

um so eine Konzentration von 10000 ng/ml zu erhalten.

Lagerung der Aliquoute erfolgt ebenfalls bei -20° C.

2.2.1 Anzucht und Subkultivierung der Zellen

Die Neuroblastomzelllinien IMR32, Kelly und SK-N-SH wachsen als adhärenente Zellen in RPMI- Medium in 5% CO₂ in einem mit Wasserdampf gesättigten Brutschrank bei 37° C. Die Hepatoblastomzelllinien Hep G2 und C3A sind ebenfalls adhärenente Zellen und wurden zu Anfang mit MEM-Earle- Medium, die Wilms´Tumorzelllinie G401 mit Mc Coy´s-Medium kultiviert. Nach ca. einer Woche Kultur in den genannten Medien stellten wir die Versorgung dieser Zelllinien auf RPMI-Medium um. Alle drei Zelllinien wachsen unter denselben Bedingungen wie die Neuroblastomzelllinien. Ein Mediumwechsel erfolgt an jedem 2. Tag. Wenn die Zellen die Konfluenz erreicht haben, werden sie subkultiviert. Man saugt hierfür den Überstand ab und inkubiert die Neuroblastomzelllinien mit 2 ml 1mM EDTA in PBS über 2 Minuten, die Hepatoblastomzelllinien HepG2 und C3A, sowie G401 mit 1ml Trypsin, das 10 Minuten Einwirkzeit benötigt. Die Zellen werden dann abgelöst, wobei die mit Trypsin behandelten Zellen mit dem Cell-Scraper abgeschabt werden müssen. Nachdem man die Zellen auf zwei neue Kulturflaschen verteilt hat (sog. Passagenwechsel), werden die Flaschen mit 10 ml Medium aufgefüllt.

2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die adhären wachsenden Zellen werden abgelöst, die Zellsuspension in sterilen Zentrifugenröhrchen 10 Minuten bei 400g abzentrifugiert. Nun resuspendiert man das Pellet mit 500 µl Kulturmedium und gibt 500µl Einfriermedium hinzu. Jetzt wird diese Suspension in ein Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen werden schonend verpackt und bei -70°C eingefroren. Zum Auftauen benutzt man das 37°C warme Wasserbad und gibt die Zellen in eine Kulturflasche mit 10 ml Kulturmedium. Nach einem Tag muß das Medium gewechselt werden, da DMSO eine toxische Wirkung auf die Zellen hat.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

100 µl Zellsuspension werden mit 100 µl Trypanblau (0,4%) gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Nun zählt man die Zellen im Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung. Die vitalen Zellen sind ungefärbt, die toten Zellen färben sich blau. Die Zellzahl in einem Quadranten (16 große Quadrate) mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert, ergibt die Zellzahl pro Milliliter.

2.3 Serumentzug und Stimulation mit Zytokinen

2.3.1 Vorbereitung: Zellaussaat

Aus einer dicht bewachsenen Kulturflasche werden die Zellen je nach Zelllinie entweder mit PBS oder Trypsin abgelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl wird die Menge des Suspensionsvolumens, das 2×10^6 Zellen enthält, berechnet. Diese Menge wird dann in jeweils zwei Wells einer 6-Loch-Makroplatte, deren Wells man zuvor mit je 2 ml Nährmedium gefüllt hat, gegeben.

Auf diese Weise ist es möglich, pro Platte drei Stimulationen und deren entsprechenden Serumentzug durchzuführen.

Die Platte wird dann einen Tag lang im Brutschrank inkubiert.

2.3.2 Stimulation mit den Zytokinen TNF α , IL-1 β und IFN γ und Serumentzug

Zuerst wird der Überstand aus den Wells abgezogen. Nun „wäscht“ man vorsichtig die Zellschichten, um die Reste des serumhaltigen Mediums zu entfernen. Hierzu wird 1ml calcium- und magnesiumhaltiges PBS aufpipettiert und wieder abgezogen. Für die Stimulation werden 20 μ l der gewünschten aufgetauten Zytokin-Stammlösung mit 2 ml serumfreiem Medium verdünnt, um eine Endkonzentration von 100 ng/ml zu erhalten. Diese Lösung wird dann in ein Well der Makroplatte gegeben.

Beim Serumentzug, den man parallel dazu durchführt, werden nur 2 ml serumfreies Medium ohne Zusätze verwendet.

Die Zellen werden nun für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Stimulation bzw. des Serumentzuges überführt man zunächst die Überstände in 2 ml Probenröhrchen und zentrifugiert sie 10 Minuten bei 600g. Die so erhaltenen Überstände werden dann in ein neues Röhrchen gegeben und bei -70° C eingefroren.

Zum Ablösen der Zellen aus den Wells verwendet man den Zelllinien entsprechend entweder 2 ml PBS (2 Minuten Einwirkzeit) oder 2 ml Trypsin, wobei hier wieder nach 10 Minuten Inkubationszeit mit dem Cell-Scraper nachgeholfen muß, um die Zellen abzulösen.

Dann werden die Zellen in ein 2 ml-Röhrchen gegeben, um sie bei 400g für 10 Minuten zu zentrifugieren. Dabei ist zu beachten, daß man zu den Zellen von HepG2, C3A und G401 noch jeweils 0,2 ml Nährmedium geben muß, da das Pellet sonst nicht einfrierbar ist.

Desweiteren werden vor dem Zentrifugieren 100 µl der Zellsuspensionen, die zur Bestimmung der Zellzahl notwendig sind, einbehalten.

Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand vorsichtig abgegossen, und die erhaltenen Pellets werden ebenfalls bei -70°C eingefroren.

2.4 RNA- Isolierung

Die RNA-Isolierung sowie die PCR wurden im Labor von Professor Knabbe im Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart durchgeführt.

Die gesamte RNA-Isolierung erfolgt auf Eis. Um Kontaminationen mit RNAsen zu vermeiden wird autoklaviertes Material verwendet und ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet.

Mit Hilfe des RNeasy-Minikits von Qiagen wird aus den Pellets die Gesamt-RNA isoliert.

2.4.1 Prinzip:

Dieses Verfahren kombiniert die selektive Bindungseigenschaft einer Silikon-Gel-Membran, mit der Geschwindigkeit der Microspin- Technologie. Ein spezielles Puffersystem mit hohem Salzgehalt bringt bis zu 100 µg RNA, die länger als 200 Basenpaare sein muß, zur Bindung an die Silikon-Gel-Membran. Biologische Proben werden zuvor in Gegenwart eines stark denaturierenden Guanidin-Isothiocyant-haltigen Puffers lysiert und homogenisiert. Dieser Puffer inaktiviert sofort alle RNAsen.

Hinzugefügtes Ethanol erstellt angemessene Bindungsvoraussetzungen her, und die Probe wird jetzt auf eine RNeasy-Spin Säule gegeben, wo die RNA an die Membran bindet und Verunreinigungen wirksam gewaschen werden. RNA von hoher Qualität wird dann in 30 µl Wasser eluiert.

2.4.2 Abfolge der einzelnen Teilschritte

Die Plasmamembranen der Zellen und Zellorganellen werden durch Zugabe von 350 µl RLT-Puffer und anschließendem Vortexen aufgelöst. (RLT-Puffer enthält Guanidin-Isothiocyanat.)

Homogenisierung:

350 µl Ethanol (70%) werden zum homogenisierten Lysat hinzugefügt und mit Hilfe einer Pipette vermischt. Ethanol fördert die selektive Bindung der RNA an die Membran.

Nun gibt man die Probe in die RNeasy Spin-Säule, die sich in einem 2 ml-Sammelgefäß befindet und zentrifugiert 15 Sekunden lang bei mindestens 8000g. Die Gesamt-RNA bindet dabei an die Membran.

In drei Waschschritten mit verschiedenen Puffern werden Verunreinigungen entfernt. Zuerst wird mit 700 µl RW1-Puffer, dann mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen, woran sich beides Mal eine 15 Sekunden lange Zentrifugation bei mindestens 8000g anschließt. Ein abschließender Waschvorgang mit 500 µl RPE-Puffer endet mit einer Zentrifugation von 2 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit. So werden Ethanol-Reste aus dem RPE-Puffer entfernt, die sonst die weiteren enzymatischen Reaktionen stören würden.

Elution: Man pipettiert 40 µl Rnase freies Wasser zu der Probe auf die Membran und zentrifugiert erneut, 1 Minute lang bei 8000g. Dieser Schritt wird wiederholt, um ein Eluat von 80 µl zu erhalten.

2.4.3 DNA-Verdau zur Gewinnung einer DNA-freien Probe

80 µl Eluat

10 µl DNase 10 x Reaction Buffer

1 µl DNase 1 (= 10 units)

9 µl Aqua-Spüllösung (steril, pyrogenfrei)

werden bei Raumtemperatur 15 Minuten lang inkubiert.

2.4.4 Aufreinigung

Die Aufreinigung dient zur Entfernung der DNase und erfolgt, ebenfalls mit Hilfe des RNeasy Minikits, in folgenden Teilschritten:

Zum DNA-Verdau werden 350 µl RLT-Puffer hinzugegeben und vorsichtig mit der Pipette vermischt.

Zum Lysat gibt man jetzt 250 µl Ethanol (96-100 %) und vermischt beides mit der Pipette.

Die Probe von 700 µl wird in einer RNeasy Mini-Spin-Säule bei mindestens 8000g 15 Sekunden lang zentrifugiert.

Um die Zellen zu waschen, pipettiert man 500 µl RPE-Puffer auf und zentrifugiert erneut.

Bei einer Zentrifugation von 2 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit nach Zugabe von 500 µl RPE-Puffer sollen wieder die Ethanolreste entfernt werden.

Zur Elution der RNA von der Membran gibt man 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran und zentrifugiert 1 Minute lang bei mind. 8000g.

Man erhält dabei ein Eluat von 30 µl.

2.4.5 RNA- Konzentrationsbestimmung

Die RNA- Konzentration wird photometrisch bestimmt. RNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Per Definition entspricht eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei 260 nm einer RNA- Konzentration von 40 µg/ml.

Wichtig ist die Abschätzung des Proteingehaltes der Lösung. Viele Proteine haben ein Absorptionsmaximum von ca. 280 nm. Der Quotient aus Extinktion $E_{260} : E_{280}$ ist ein Maß für die Reinheit der Präparation und liegt in der Größenordnung 1,6- 2,0. Werte über 2,0 indizieren einen hohen Anteil an RNA, während ein Quotient, der unter 1,8 liegt, auf einen hohen Proteinanteil hinweist.

2.4.6 Integrität der RNA

Die Integrität der RNA wurde in denaturierenden Agarose Gelen (1%) kontrolliert.

Folgende Ansätze werden dazu benötigt:

5x MOPS-Puffer:

0,1 M MOPS (3-[N- Morpholino]propanesulfonic acid (pH 7,0), 40 mM Natrium Acetat, 5 mM EDTA (pH 8,0)

Gel:

100 ml 1x MOPS-Puffer, 1g Agarose, 1,8 ml Formaldehyd, 4 µl Ethidium Bromid

Formamid Loading Buffer 5x:

80% Formamid, 10 mM EDTA (pH 8,0), 1 mg/ml Xylencyanol, 1 mg/ml Bromphenolblau

Zu 1 µg RNA wird im Verhältnis 4:1 Formamid Loading Buffer gegeben (0,25µg) und 5 Minuten bei 95° C aufgeköcht. Anschließend wird die Probe auf Eis gekühlt und auf das vorbereitete Gel geladen. Die Trennung erfolgt dann bei 5-7 Volt pro Minute.

28S und 18S ribosomale RNA- Banden sollten sichtbar werden.

Sind die Banden nicht scharf, sondern erscheinen verschmiert und in Richtung einer kleineren RNA-Größe verschoben, so hat während der Präparation eine Degradierung der Probe stattgefunden.

2.5 Reverse Transkriptase, PCR

2.5.1 Prinzip

Da die Polymerasekettenreaktion als Ausgangsmaterial DNA benötigt, wird zuerst eine komplementäre DNA- Kopie hergestellt. Diese cDNA fertigt man mit Hilfe der Reversen Transkriptase an.

Reverse Transkriptase ist ein Enzym, das RNA in DNA transkribieren kann und aus Retroviren isoliert wird. Das angefertigte RNA-DNA-Hybrid kann man in der PCR einsetzen, wo eine bestimmte cDNA –Sequenz aus dem Gen vermehrt (amplifiziert) wird. Bei der PCR bedient man sich der Eigenschaften der DNA Replikation. Zwei Primer, deren Sequenz komplementär zu einem Randbereich von jeweils einem der beiden Stränge der cDNA sind, fungieren dann als Startermoleküle für die DNA-Synthese durch die Taq-Polymerase.

2.5.2 Durchführung

Für die Reverse Transkription wird folgendes Pipettierschema verwendet:

RT-Mastermix:

11 µl Wasser
2 µl RT 10x Puffer
2 µl dNTPs (1,25mM)
2 µl lower Primer (10µM)

1 µl (=200 ng) RNA werden zu dem Mastermix pipettiert und mit zwei Tropfen Mineralöl überschichtet.

Die Probe wird 5 Minuten bei 65° C im Mini Cyclor inkubiert.

Die Probe kommt auf Eis und es werden 1 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) und 1 µl AMV (250 mU/µl) dazupipettiert.

Die Reverse Transkription erfolgt dann im Cycler bei 52° C, 30 Minuten lang mit einer anschließenden AMV-Inaktivierung von 1 Minute bei 99° C.

RT 10x Puffer: 100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 500 mM KCl, 30 mM MgCl₂,
0,0,1% (w/v) Gelatine

Das RT-Produkt ist Ausgangsprodukt für die PCR.

2.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR- Ansatz:

PCR-Mastermix:

65,5 µl Wasser
8 µl PCR 10x Puffer
2 µl dNTPs(1,25 mM)
2 µl lower Primer(10 µM)
2 µl upper Primer(10 µM)
0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

Den Mastermix (80 µl) pipettiert man zum RT-Ansatz (20 µl).

10x PCR-Puffer: 100 mM Tris-HCL (pH 8,8), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂,
0,01% (w/v) Gelatine.

Die cDNA wird zuerst bei 94° C für 5 Minuten denaturiert, dann setzt das PCR-Programm ein.

PCR-Programm:

1. Zuerst wird die cDNA nochmals bei 94° C für 30-60 Sekunden denaturiert.
2. Bei 55-65° C lagern sich nun die Primer an den jeweiligen DNA-Einzelstrang an. Dieser Vorgang dauert 30-60 Sekunden und wird als Annealing bezeichnet.

3. Bei 72° C und einer Dauer von 30-60 Sekunden erfolgt die Extension. In Gegenwart von Nukleotiden wird mit Hilfe der Taq-Polymerase die DNA synthetisiert.

Dieser Zyklus wird 35 Mal wiederholt.

Im Anschluß daran erfolgt die Endextension für 10 Minuten bei 72° C.

Als Endergebnis der PCR enthält das Reaktionsgemisch nach den 35 Zyklen ein theoretisches Maximum von 2^{30} doppelsträngigen DNA Molekülen, die Kopien der zwischen den Primer gelegenen DNA Sequenz darstellen.

Als Kontrolle wurde eine Transferrin Rezeptor PCR verwendet. Für den Transferrin Rezeptor waren kräftige Banden nachweisbar.

Verwendete Primer:

	5'Primer (5'→3')	3'Primer (5'→3')	Annealing
VEGF	TCT ACC TCC ACC ATG CCA AGT	CCG CAT AAT CTG CAT GGT GAT	62° C
bFGF	GGC CAC TTC AAG GAC CCC AAG	TCA GCT CTT AGC AGA CA	60° C
PTN	GGT CTC GAG TAT GTT CCA CAG GTG ACA TC	GGT AAG CTT AGA GGA CGT TTC CAA CTC AA	56° C
MK	ATG CAG CAC CGA GGC TTC CT	ATC CAG GCT TGG CGT CTA GT	58° C
Trans- ferrin- Rez.	TGA AGC TCA CTG TGA GCA ATG TG	AGA CTT TGG ATC GGT TGG TGC	60° C

2.5.4 Gelelektrophorese zum Nachweis des PCR-Produktes

Folgende Puffer werden benötigt:

TAE-Puffer:

242g Tris in 500 ml Aqua destillata, 57,1 ml Eisessig, 100 ml EDTA (0,5 M) werden mit Aqua dest. auf ein Volumen von 1 Liter aufgefüllt

Loading Buffer (10 fach):

0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylenecyanol, 25 % Ficoll (Type 400) in H₂O

Für die Elektrophorese verwendet man Agarose-Gel (2%), das mit 50 ml TAE-Puffer gemischt wird. In 50 ml Puffer wurden zuvor 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) gelöst.

Der TAE-Puffer dient außerdem auch als Laufpuffer und wird vor Beginn in die Gel-Kammer gegeben.

In die mit dem Probenkamm vorbereiteten Taschen gibt man 10 µl der Proben, die vorher mit 1 µl Farbstoff (Loading-Puffer) vermischt wurden. Desweiteren läßt man eine Negativ-Kontrolle und einen Molekulargewichtsmarker mitlaufen: 1 µl Marker (100 bp DNA, 1 µg/ µl), 1 µl Loading Buffer und 10 µl Wasser werden hierfür vermischt. Die Trennung der DNA erfolgt bei 60 Volt.

Anschließend werden die Gele mit UV-Licht bei 260 nm analysiert und mit Hilfe eines Video Copy Processors dokumentiert.

2.6 Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) zur Bestimmung des Wachstumsfaktorproteins im Zellkulturüberstand

2.6.1 Prinzip des PTN-ELISA

Eine 96 Loch-Platte wird mit einem murinen monoklonalen Antikörper gegen PTN (4B7) beschichtet. Nach mehreren Waschschrinen werden die freien Bindungsstellen in den Vertiefungen mit einer blockierenden Lösung besetzt und dann die Proben und Standards zugegeben. In weiteren Inkubations- und Waschschrinen wird als zweiter Antikörper ein biotinyliertes, affinitätsgereinigtes anithuman PTN Immunglobulin G von der Ziege hinzugefügt. Zuerst werden die Vertiefungen mit einer Streptavidin-konjugierten alkalischen Phosphatase inkubiert und nach weiterem Waschen schließlich mit dem Substrat p-Nitrophenylphosphat inkubiert. Gemessen wird bei 405nm.

2.6.2 Prinzip des bFGF-ELISA

Der Quantikine®HS-Assay (R&D Systems, Wiesbaden) basiert auf dem Prinzip des quantitativen „Sandwich“-ELISAs. Eine mit monoklonalen Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte bindet bFGF-homologe Proteine.

Unspezifische Bindungen werden ausgewaschen und mit polyklonalen bFGF-Sekundärantikörpern, an die alkalische Phosphatase gekoppelt ist, wird dann an die immunologisch fixierten Proteine gebunden. Nach weiteren Waschschrinen wird eine NADPH-Substratlösung zugegeben, die unter Abspaltung anorganischen Phosphats in Abhängigkeit der Enzymkonzentration (entspricht der Menge an gebundenen Sekundärantikörpern) zu NADH umgesetzt wird. Das NADH dient einer Verstärkerlösung als Cofaktor. Die Verstärkerlösung, bestehend aus den Enzymen Dihydrilipoamiddehydrogenase (Diaphorase, EC 1.8.1.4) und Alkoholdehydrogenase (EC 1.1.1.1), oxidiert NADH zu NAD^+ (mittels Dihydrilipoamiddehydrogenase) bzw. reduziert infolge das entstandene NAD^+ wieder zu NADH (mittels Alkoholdehydrogenase)

wodurch sich der Redoxzyklus schließt. Die Oxidation des NADH an der Diaphorase ist gleichzeitig mit der Reduktion des Tetrazoliumsalzes Iodnitrozoliumviolett (INT-Violett) zu einem violetten Formazanprodukt gekoppelt. Somit ist die gebildete Formazanqualität unmittelbar von der gebundenen bFGF-Menge abhängig.

2.6.3 Durchführung des bFGF-ELISA

Es wird mit einer 96-Well-Mikroplatte gearbeitet, die mit murinen monoklonalen Antikörpern gegen bFGF beschichtet ist.

1. In jedes Well werden 100 µl Assay Diluent HD1-3 pipettiert.
2. Dazu kommen 100 µl Standard (in aufsteigender Konzentration) oder 100 µl Probe.

Es folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für 3 h.

3. Nun wird die Platte „gewaschen“: Nach abgießen des Überstandes gibt man in jedes Well 400 µl Wasch-Puffer, der anschließend gründlich entleert wird.

Dies wird 5 mal wiederholt.

4. Es werden jetzt 200 µl bFGF Konjugat in die Wells pipettiert und bei Raumtemperatur 2 h inkubiert.

5. Anschließend wiederholt man die „Wäsche“ wie in Schritt 3.

6. 50 µl Verstärker-Lösung werden in die Wells pipettiert und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert.

7. Zuletzt werden 50 µl Stop-Lösung hinzugefügt.

8. Mit einem Mikroplatten-Leser werden bei 490 nm die optischen Dichten bestimmt und daraus die Konzentrationen für bFGF berechnet.

Verwendete Reagentien:

bFGF Konjugat:: polyklonaler Antikörper gegen bFGF, mit alkalischer Phosphatase konjugiert

bFGF-Standard: rekombiniertes humanes bFGF in gepufferter Proteinbase

Assay Diluent HD1-3: gepufferte Proteinbase

Wasch-Puffer: gepuffertes Detergens

Verstärker-Lösung: gepufferte Lösung, Ethanol- und INT-Violett-haltig, mit Stabilisatoren

Stop-Lösung: 2N Schwefelsäure

2.6.4 Prinzip des VEGF-ELISA

Dieser Assay verwendet ebenfalls die Methode des quantitativen „Sandwich“-ELISAs. Ein für VEGF spezifischer Antikörper wurde auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht. Man pipettiert Standards und Proben in die Wells und vorhandenes VEGF wird an den festen Antikörper gebunden.

Nachdem alle überschüssigen Substanzen herausgewaschen wurden, kommt ein VEGF spezifischer polyklonaler Antikörper, der an ein Enzym gebunden ist, in die Wells. Anschließend erfolgt ein Waschschrift, der ungebundene Reagentien herauswäscht. Nun wird Substratlösung in die Wells pipettiert und proportional zum gebundenen VEGF kommt es zu einer Farbentwicklung. Sie wird gestoppt und die Intensität der Farbe wird gemessen.

2.6.5 Durchführung des VEGF-ELISA

Wir arbeiten mit einer Mikroplatte, die 96 Wells enthält. Die Wells sind mit murinen monoklonalen Antikörpern gegen VEGF beschichtet.

1. In jedes Well werden 50 µl Assay Diluent RD1W pipettiert.
2. Dazu werden jeweils 200 µl Standard (in aufsteigenden Konzentrationen) oder 200µl Probe pipettiert. Es folgt eine Inkubation von 3 h bei Raumtemperatur.
3. Nachdem der Überstand aus allen Wells abgegossen wurde, folgt ein Waschvorgang: In jedes Well werden 400 µl Waschpuffer gegeben und wieder gründlich entleert. Dies wird dreimal wiederholt.
4. 200 µl VEGF Konjugat werden nun in jedes Well pipettiert und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Es folgt wieder ein dreifacher Waschvorgang wie in 3.
6. In jedes Well werden anschließend 200 µl Substrat-Lösung gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

7. Nun werden 50 µl Stop-Lösung in jedes Well pipettiert.
8. Mit einem Mikroplatten-Leser wird innerhalb 30 Minuten die optische Dichte bei 450 nm bestimmt und daraus die Konzentration von VEGF berechnet.

Verwendete Reagentien:

VEGF Konjugat: Polyklonaler Antikörper gegen VEGF, an Meerrettich-Peroxidase konjugiert

VEGF-Standard: rekombiniertes humanes VEGF 165, in gepufferter Protein-Base

Assay Diluent RD1W: gepufferte Proteinbase

Wasch-Puffer: gepuffertes Detergens

Substratlösung: stabiles Hydrogen-Peroxid, stabiles Chromogen
(Teramethylbenzidine)

Stop-Lösung: 2 N Schwefelsäure

2.7 Statistik

Zur Stabilisierung der Varianz wurden die Werte logarithmisiert. Für jeden Wachstumsfaktor wurde unter Berücksichtigung von Zelllinie, Bedingungen und Wechselwirkungen der zwei-faktorielle ANOVA-Test durchgeführt.

Anschließend wurden für ausgesuchte Vergleiche T-Tests vollzogen.

Anpassungen für multiple Tests wurden gemäß Bonferroni (Miller, R.G.1981) ausgeführt.

Bei den Grafiken stellen die Werte Mittelwerte +/- SEM dar.

3 Ergebnisse

3.1 Expression der Wachstumsfaktoren PTN, MK, bFGF und VEGF in den Tumorzelllinien unter basalen Bedingungen

3.1.1 Pleiotrophin- Expression

Pleiotrophin wird von den Neuroblastomzelllinien IMR-32, IMR-5.75, Kelly, SK-N-SH und Wac2 exprimiert. Die Zelllinie Wac2 zeigt dabei die stärkste Expression. In den Hepatoblastomzelllinien HepG2 und C3A und in der Wilms´Tumor-Zelllinie G401 ist hingegen keine Expression zu finden. Die Bande von Pleiotrophin liegt bei 569 bp.

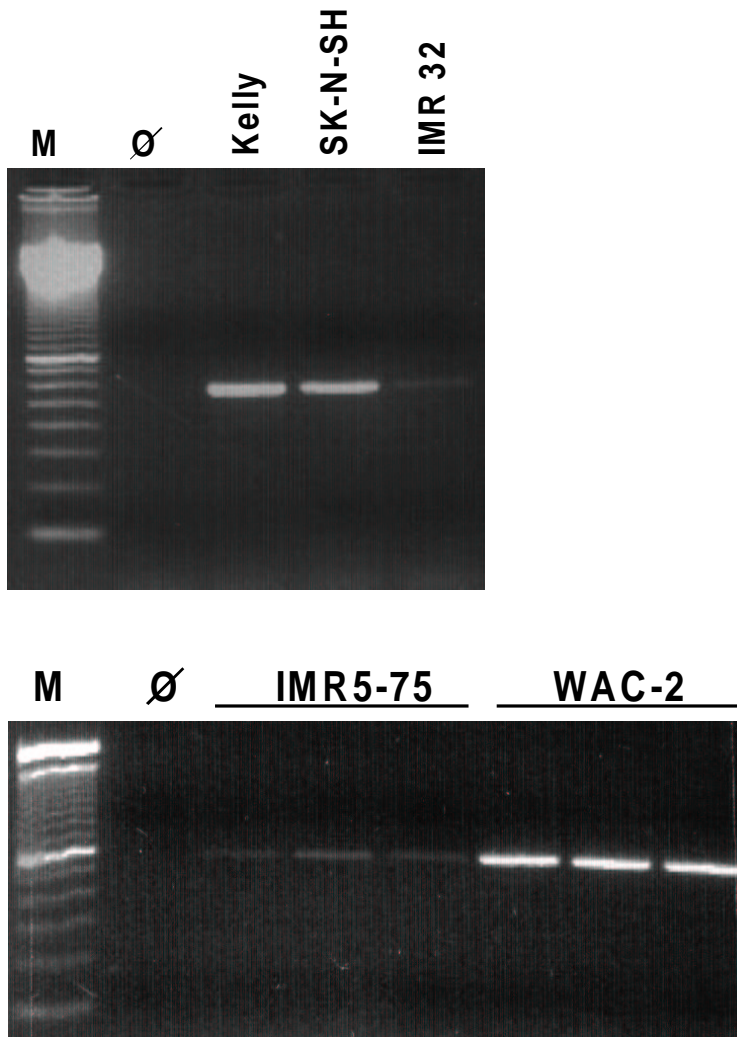


Abb.1 : Pleiotrophin-Expression (mRNA) der Zelllinien IMR-5.75, Wac2, Kelly, SK-N-SH und IMR-32 (M=Kontrolle; Ø=Leerwert); die stärkste Bande zeigt Wac2.

3.1.2 Midkine- Expression

Die trunkierte Form des Wachstumsfaktors Midkine ist in allen Tumorzelllinien nachweisbar. Wir finden eine starke Expression des 280 bp RNA-Fragmentes in allen Neuroblastom-Zelllinien und in der Wilms´Tumor-Zelllinie G401. Die beiden Hepatoblastom-Zelllinien exprimieren MK in moderatem Ausmaß. Den Wildtyp von Midkine (450 bp) können wir in keiner der Zelllinien finden.

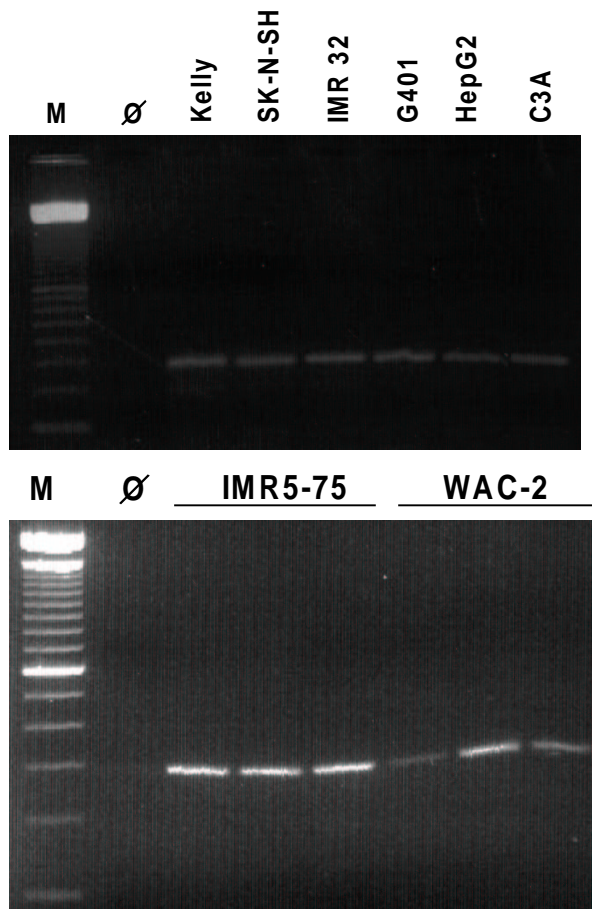


Abb.2 : mRNA- Expression von trunkiertem Midkine durch die Zelllinien IMR-5.75, Wac2, Kelly, SK-N-SH, IMR-32, G401, HepG2 und C3A (M=Kontrolle; Ø=Leerwert)

3.1.3 bFGF-Expression

Wir beobachten eine schwache Expression von bFGF bei den Zelllinien Kelly, SK-N-SH, IMR-5.75, Wac2 und G401, etwas stärker ist sie bei IMR-32. Bei den Hepatoblastomzelllinien HepG2 und C3A wird dagegen keine bFGF mRNA exprimiert. Die Bande von bFGF liegt bei 397 bp.

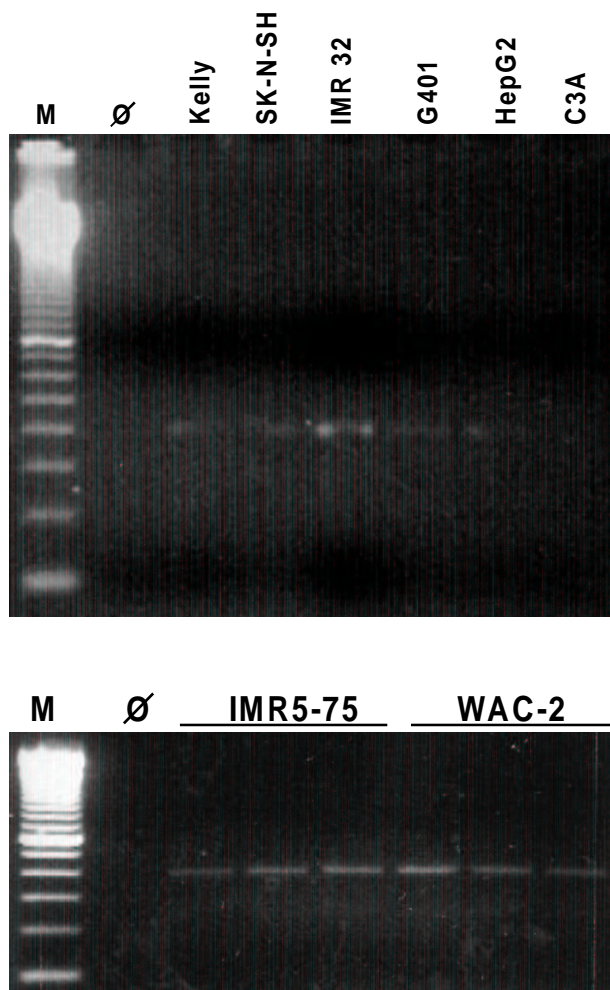


Abb.3 :Expression von bFGF(mRNA) bei den Zelllinien Kelly, SK-N-SH, IMR-32, G401, IMR-5.75 und Wac2. Bei HepG2 und C3A sind keine Banden sichtbar. (M=Kontrolle; Ø=Leerwert)

3.1.4 VEGF-Expression

Die mRNA der Isoform VEGF₁₆₅ ist in allen Zelllinien zu finden, wobei die Banden bei den Zelllinien C3A und Kelly stärker erscheinen. Die Bande für VEGF₁₆₅ liegt bei 606 bp. Die Doppelbande im oberen bp-Bereich entspricht wahrscheinlich einem alternativen Transkript.

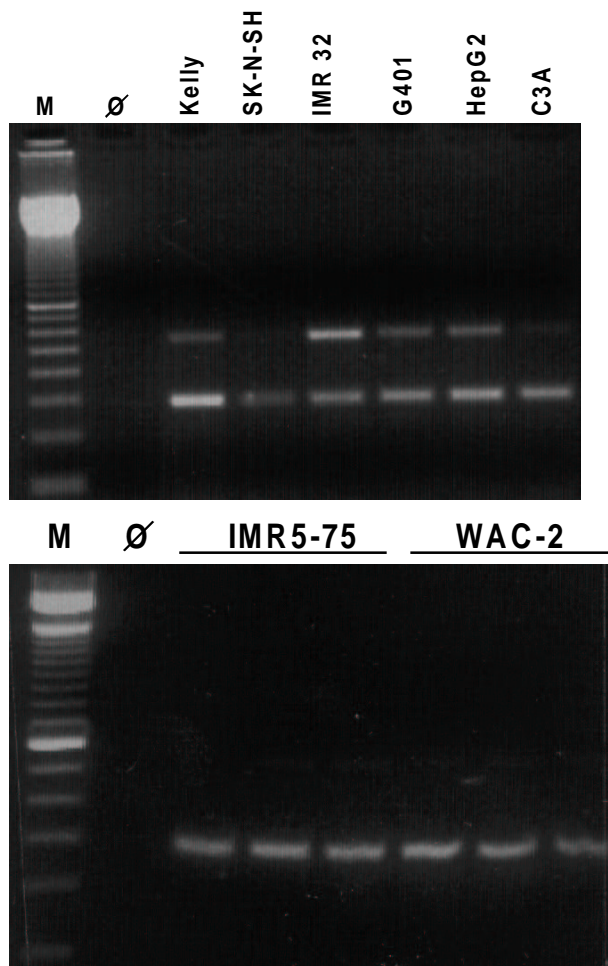


Abb.4 : Expression der Isoform VEGF₁₆₅ (mRNA) von den Zelllinien Kelly, SK-N-SH, IMR-32, G401, HepG2, C3A, IMR-5.75 und Wac2 (M=Kontrolle; Ø=Leerwert).Die Banden bei C3A und Kelly erscheinen stärker. Die zusätzliche Bande im oberen bp-Bereich stellt wahrscheinlich ein alternatives Transkript dar.

3.2 Konzentration des PTN, bFGF und VEGF Proteins in den Zellkulturüberständen unter basalen Bedingungen

3.2.1 Pleiotrophin- Protein

Das Protein wird entsprechend seiner mRNA-Expression nur von den Neuroblastomzelllinien in den Überstand sezerniert. Die beiden Zelllinien IMR-32 und IMR-5.75 überschreiten mit einer PTN-Proteinkonzentration von 19,17 ($\pm 0,8$) pg/ml bzw. 20,37 ($\pm 0,42$) pg/ml knapp die Nachweisgrenze von 10 pg/ml. Die Zelllinie Kelly unterscheidet sich hiervon signifikant mit einer Protein- Konzentration von 55,86 ($\pm 6,45$) pg/ml. Dazwischen liegt SK-N-SH mit 45,56 ($\pm 10,67$) pg/ml. Die höchste Sekretion beobachten wir bei der Neuroblastomzelllinie Wac2 mit 192,99 ($\pm 22,75$) pg/ml.

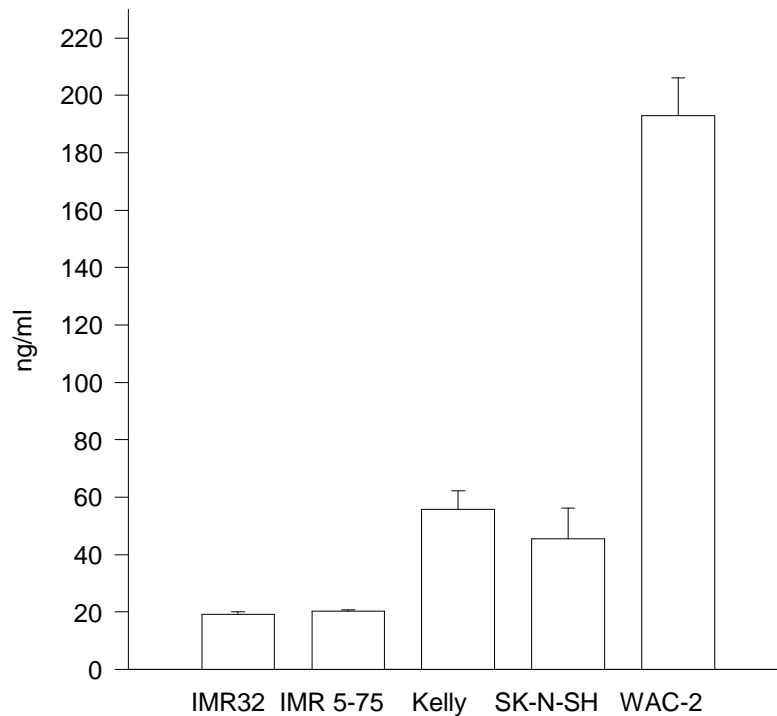


Abb.5 : Konzentrationen des PTN-Proteins im Zellkulturüberstand der Zelllinien IMR-32, IMR-5.75, Kelly, SK-N-SH und Wac2. Signifikante Unterschiede bestehen zwischen Kelly und IMR-5.75 und zwischen Wac2 und SK-N-SH. Wac2 sezerniert die höchste Menge an PTN ($192,99 \pm 22,75$ pg/ml).

3.2.2 bFGF- Protein

Für die Konzentrationen des bFGF- Proteins bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien. IMR32 hebt sich dabei mit einer Konzentration von $3,6 (\pm 0,31)$ pg/ml von den Zelllinien Kelly mit $1,56 (\pm 0,64)$ pg/ml und SK-N-SH mit $0,94 (\pm 0,09)$ pg/ml ab. Die höchste Produktion war bei der Wilms´Tumor-Zelllinie G401 mit $59 (\pm 17,97)$ pg/ml festzustellen. Übereinstimmend mit der PCR produzierten die Zelllinien HepG2 und C3A kein bFGF.

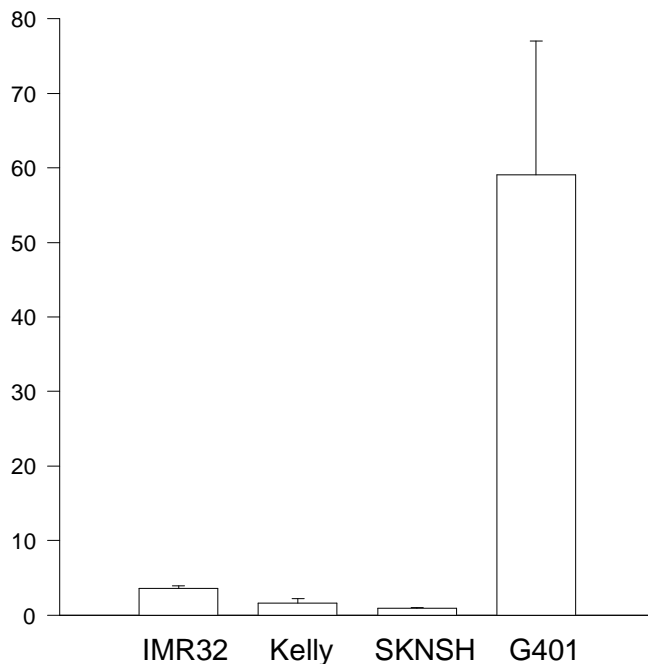


Abb.6 :Konzentrationen des bFGF-Proteins im Zellkulturüberstand der Zelllinien IMR-32, Kelly, SK-N-SH, G401, HepG2 und C3A. IMR-32 hebt sich signifikant sowohl von Kelly als auch von SK-N-SH ab. G401 produziert die größte Menge an bFGF (59 pg/ml); bei HepG2 und C3A kann bFGF nicht nachgewiesen werden.

3.2.3 VEGF-Protein

Der Faktor VEGF wird von allen Zelllinien sezerniert: Die stärkste Sekretion innerhalb der Neuroblastom-Zelllinien findet bei Kelly mit 2515 ($\pm 55,78$) pg/ml statt. Dadurch besteht ein signifikanter Unterschied zu IMR32 mit 1376 ($\pm 168,60$) pg/ml und zu SK-N-SH mit 775 ($\pm 71,07$) pg/ml. G401 liegt mit 802,5 ($\pm 117,18$) pg/ml dazwischen. Die Hepatoblastomzelllinien HepG2 und C3A sezernieren deutlich mehr VEGF- Protein: Für HepG2 stellen wir eine Konzentration von 2185,5 ($\pm 152,7$) pg/ml und für C3A die höchste Konzentration innerhalb der Zelllinien mit 2661,67 ($\pm 124,72$) pg/ml fest.

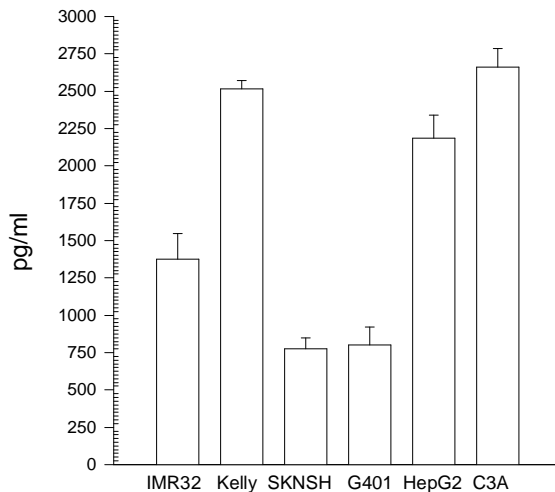


Abb.7 : Konzentrationen des VEGF- Proteins im Zellkulturüberstand der Zelllinien IMR-32, Kelly, SK-N-SH, G401, HepG2 und C3A. Kelly (2515 pg/ml), HepG2 (2185 pg/ml) und C3A (2661 pg/ml) sezernieren signifikant höhere Mengen des VEGF-Proteins als die übrigen Zelllinien.

3.3 Expression und Sekretion der Wachstumsfaktoren PTN, MK, bFGF und VEGF in den Zelllinien unter Stimulation mit den Zytokinen $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ und $IFN\gamma$

3.3.1 Zellzahländerung unter Zytokineinfluß

Die Zytokine haben keinen Einfluß auf die Zellzahl. Es kommt nur zu unregelmäßigen Schwankungen der Zellzahlen. Folgende Abbildung zeigt dies am Beispiel der Zelllinie HepG2:

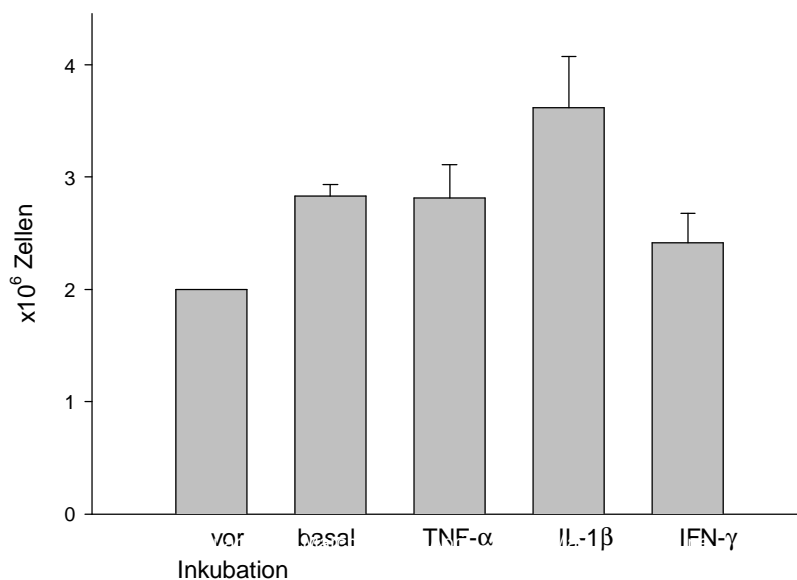


Abb.8 : Keine signifikanten Änderungen der Zellzahl von HepG2 unter der Stimulation mit den Zytokinen TNF α , IL-1 β und IFN γ gegenüber der nichtstimulierten Probe (=basal); (Zellzahl vor Inkubation: 2 Millionen).

3.3.2 Pleiotrophin- Expression und –Sekretion unter Zytokineinfluß

Die Expression der mRNA von PTN bleibt nach Stimulation mit den Zytokinen bei allen Zelllinien unverändert. PTN wird von den Hepatoblastomzelllinien HepG2 und C3A nicht exprimiert. Bei den Konzentrationen des PTN-Proteins im Zellkulturüberstand gibt es keine signifikanten Änderungen unter Zytokineinfluß.

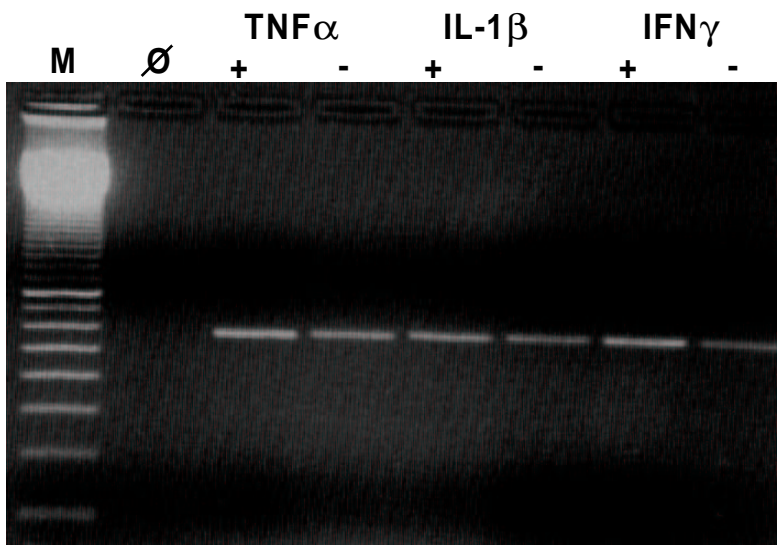


Abb.9 : PTN- Expression (mRNA) unter Zytokineinfluß am Beispiel IMR32:
Keine Unterschiede zwischen den Banden unter dem Einfluß von TNF α (+),
IL-1 β (+) und IFN γ (+) und den Banden ohne Stimulation (-);
(M=Kontrolle;Ø=Leerwert)

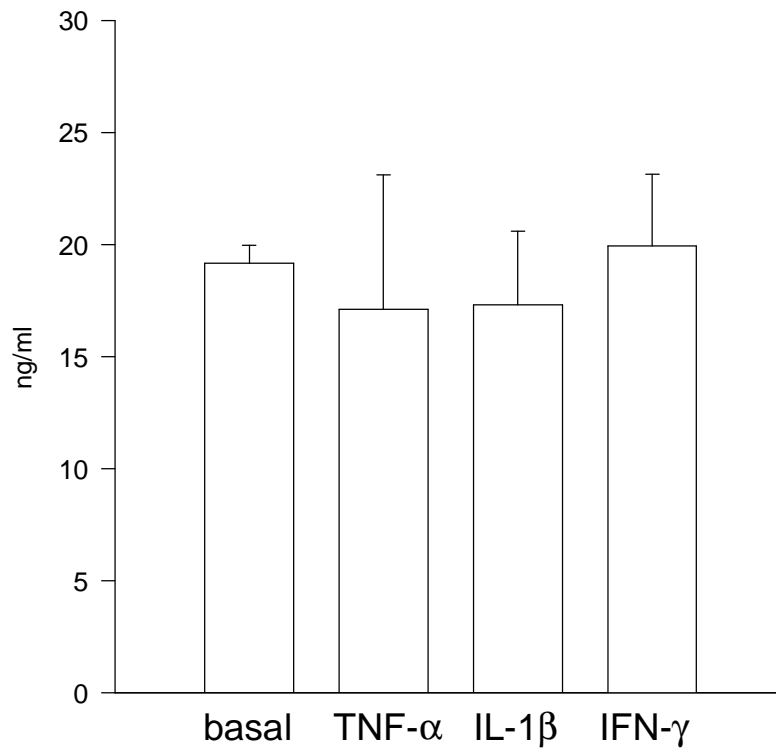


Abb.10 : Die Konzentrationen des PTN- Proteins im Zellkulturüberstand der Zelllinie IMR32 unter dem Einfluß von TNF α , IL-1 β , IFN γ zeigen keine signifikanten Änderungen gegenüber dem Basalwert.

3.3.3 Midkine- Expression unter Zytokineinfluß

Auch für Midkine ist ein unverändertes Expressionsmuster bei allen Zelllinien zu beobachten. Die trunkierte Form wird nach Zytokinstimulation von allen Zelllinien in gleicher Stärke exprimiert wie unter Basalbedingungen.

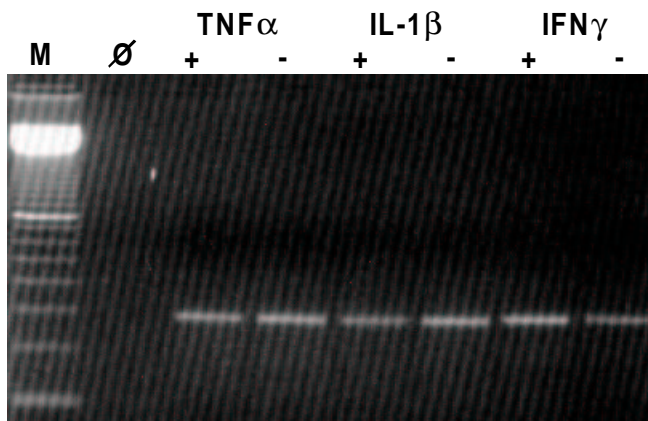


Abb.11 :Expression der mRNA von trunkiertem MK unter Einfluß von TNF α (+), IL-1 β (+) und IFN γ (+) und ohne Stimulation (-) bei der Zelllinie SK-N-SH:

Die Banden erscheinen gleichstark. (M=Kontrolle;∅=Leerwert)

3.3.4 bFGF- Expression und – Sekretion unter Zytokineinfluß

Die mRNA- Expression von bFGF erfährt bei allen Zelllinien keine Änderung unter Zytokineinwirkung. Von den Hepatoblastomzelllinien wird auch jetzt keine bFGF-mRNA exprimiert. Zudem sind keine signifikanten Veränderungen der Proteinkonzentrationen im Überstand festzustellen, nachdem mit den Zytokinen stimuliert wurde.

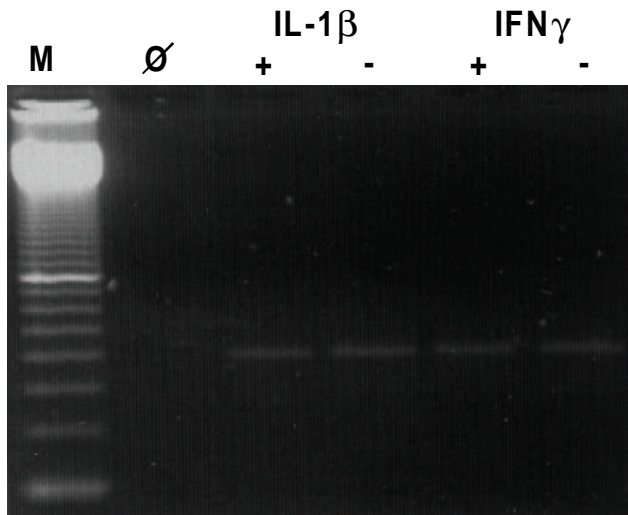


Abb.12 : bFGF- Expression unter Zytokineinfluß am Beispiel G401: Die Banden der mRNA unter Stimulation mit IL-1 β (+) und IFN γ (+) zeigen keine Unterschiede zu den Banden ohne Stimulation (-). (M=Kontrolle;∅=Leerwert) ern sich nicht signifikant gegenüber der Konzentration ohne Stimulation (basal).

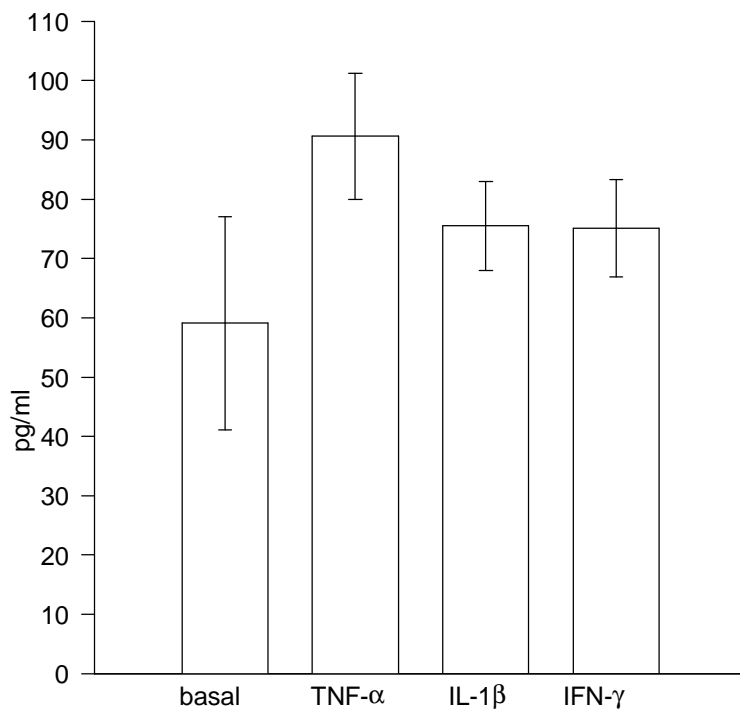


Abb.13 : Die Konzentrationen des bFGF- Proteins im Zellkulturüberstand der Zelllinie G401 nach 48h Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{IFN}\gamma$ verändern sich nicht signifikant gegenüber der Konzentration ohne Stimulation (basal).

3.3.5 VEGF- Expression unter Zytokineinfluß

Bei den Banden der mRNA von VEGF nach Einwirkung der Zytokine sind im Vergleich zu den Banden unter basalen Bedingungen keine wesentlichen Änderungen erkennbar. Ebenso gibt es keine signifikanten Veränderungen der Konzentrationen des VEGF-Proteins unter Zytokineinfluß. Abbildung 14 und 15 zeigen dies am Beispiel der Zelllinie C3A.

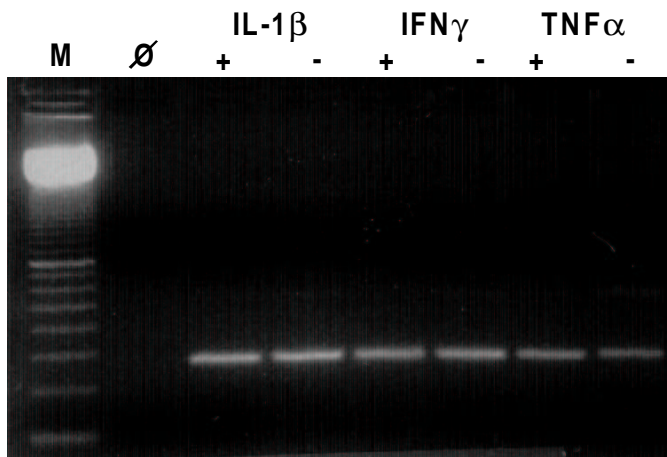


Abb.14 : VEGF- Expression (mRNA) unter Zytokineinfluß am Beispiel C3A:

Es sind keine Unterschiede zwischen den Banden unter Einfluß von TNF α (+), IL-1 β (+) und IFN γ (+) und den Banden ohne Stimulation (-) ersichtlich.

(M=Kontrolle;∅=Leerwert)

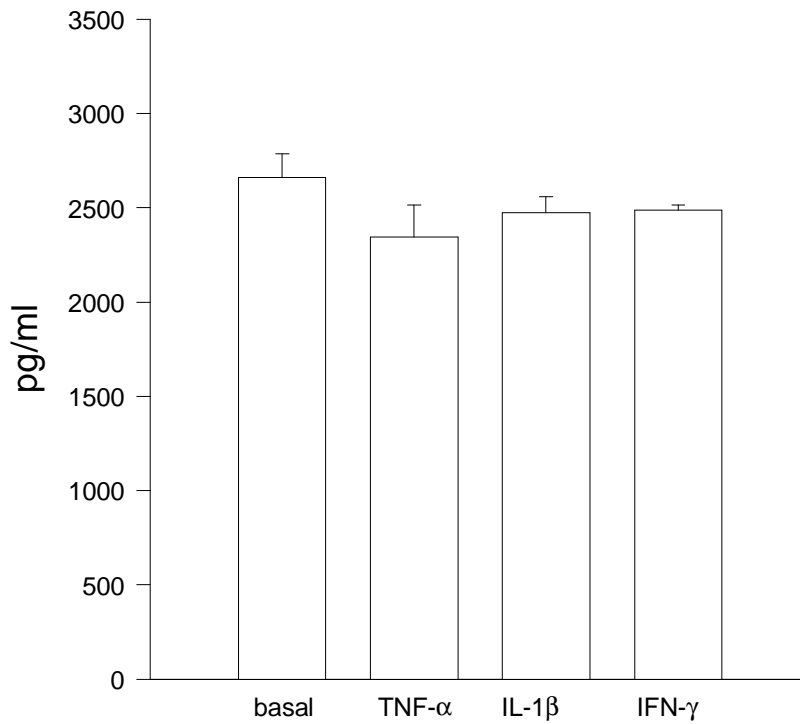


Abb.15 : Die Konzentrationen des VEGF- Proteins im Zellkulturüberstand der Zelllinie C3A nach Behandlung mit den Zytokinen TNF α , IL-1 β und IFN γ und unter basalen Bedingungen zeigen keine signifikanten Unterschiede.

4 Diskussion

4.1 Pleiotrophin

Der Vergleich der Expression von Pleiotrophin in normalem versus malignem Gewebe könnte zur Klärung der Frage beitragen, ob Pleiotrophin bei der Entstehung und beim Wachstum maligner Tumoren eine Rolle spielt. Arbeiten, denen zufolge durch Transfektion mit PTN das Wachstum von Tumoren in Nacktmäusen stimuliert werden kann, zeigen, daß PTN tumorigenes Potential besitzt. PTN transformiert NIH 3T3 Zellen (Chauhan et al., 1992) und stimuliert das Wachstum der Epithelzelllinie SW13 (Wellstein et al., 1992).

Allerdings gibt es kontroverse Meinungen über die mitogenen Fähigkeiten von PTN (Garver et al., 1993): PTN zeigt nur mitogenes Potential, wenn es aus Rindergehirn, Krebszellen und rekombinanten Expressionssystemen von Säugetieren stammt. In natürlichen Quellen oder in rekombinanten bakteriellen Expressionssystemen besitzt PTN nur schwache oder keine mitogene Aktivität (Raulo et al., 1991). Die Ergebnisse unserer Arbeit sprechen ebenfalls für die mitogenen Fähigkeiten von PTN. Die Zelllinie Wac2, die sich in der Zellkultur als besonders aggressiv und schnell wachsend erwies, produzierte auch die größte Menge PTN. Wir können die mRNA- Expression des Faktors Pleiotrophin außerdem in allen anderen untersuchten Neuroblastomzelllinien feststellen. In den Zellkulturüberständen der Neuroblastomzelllinien sind Konzentrationen des Pleiotrophin- Proteins meßbar, die mit der Expression der mRNA korrelieren, wie es die Zelllinie Wac2 zeigt. Wellstein (1992) wies nach, daß PTN in Zelllinien von Melanom und Brustkrebs exprimiert wird. Im Gegensatz dazu war in Melanozyten und in gesunden Epithelzellen der Brust keine Expression von PTN zu finden. 1994 konnten Garver und seine Arbeitsgruppe Pleiotrophin-RNA in normalem Brustgewebe nachweisen.

PTN wurde in weiteren malignen Geweben und in Tumorzelllinien entdeckt. Jäger berichtet 1997 über die Sekretion von PTN durch Tumorzellen des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms.

In normalem Lungengewebe konnte er keine Expression des Faktors finden. Nagakawara stellte 1995 eine negative Korrelation zwischen PTN-Expression und Tumor-Aggressivität fest. Er hatte 11 Neuroblastom-Zelllinien untersucht, z.B. auch SK-N-SH. In Zelllinien von aggressiven Tumoren war entweder nur eine geringe oder gar keine Expression von PTN feststellbar. Er fand mRNA von PTN nur in Neuroblastomzelllinien, die wenig aggressiv und nicht N-myc amplifiziert waren.

Dies können wir nicht bestätigen. Kelly und IMR32, die beide vielfach N-myc amplifiziert sind, zeigen eine gleich starke Expression von PTN wie die Zelllinie SK-N-SH, die nicht N-myc amplifiziert ist. Auch die starke Expression und Sekretion von PTN durch die aggressive Zelllinie Wac2, die ebenfalls N-myc amplifiziert ist, spricht gegen diese negative Korrelation.

Nagakawara konnte außerdem in der Zelllinie SK-N-SH eine nur sehr schwache Expression von PTN feststellen, während die PTN- Expression in SK-N-SH sich in unseren Ergebnissen als deutliche Bande im Gel darstellt.

Die Wilms´Tumor-Zelllinie G401 zeigt keine Expression von PTN, was einer von Ratovitski 1998 veröffentlichten Arbeit widerspricht. Er wies darin die Expression von PTN auf G401 nach. Wahrscheinlich bestehen zwischen den Zelllinien von Ratovitski und denen unserer Arbeit klonale Variationen.

Die Hepatoblastomzelllinien HepG2 und C3A wurden bisher nicht auf die Expression von PTN untersucht. Wir können bei beiden keine Expression des Faktors nachweisen.

4.2 Midkine

Die Wildtyp-Form von Midkine wurde bereits in den Zelllinien G401 und HepG2 auf mRNA-Ebene von Kitamura (1993) nachgewiesen. Tsutsui (1993) fand darüberhinaus eine Sekretion des Midkine- Proteins ins Medium. Auch in Operationspräparaten von Wilms´Tumoren und Hepatoblastomen wurde Midkine gefunden. Eine geringere Expression wurde auch in gesundem Gewebe z.B. von Magen, Oesophagus, Dickdarm (Aridome et al., 1998), nachgewiesen.

Kaname wies 1996 zusätzlich zur Expression der Wildtypform (450 bp) eine trunkierte Form von Midkine mit 280 bp auf der Zelllinie G401 nach. Er verwendete dabei einen von Tsutsui 1993 entdeckten Primer. Miyashiro wies 1997 mit diesem Primer die trunkierte Form von MK in humanem Gewebe des Mammakarzinoms nach. Desweiteren wurde trunkiertes Midkine in hepatozellulärem Karzinom, Pankreas- Karzinom (Kaname et al., 1996) und Tumoren anderer gastrointestinaler Organe (Aridome et al., 1998) gefunden. Unter Verwendung desselben Primers wie Miyashiro (1997) können wir in allen untersuchten Zelllinien die Expression der trunkierten Form von Midkine nachweisen. Eine besonders starke Expression findet in den Neuroblastomzelllinien IMR32, Kelly und SK-N-SH und in der Wilms´Tumorzelllinie G401 statt. Unser Ergebnis, bei dem wir nur die trunkierte Form von MK in der Zelllinie G401 finden, steht im Widerspruch zu Kaname (1996), der beide Formen auf der Zelllinie nachgewiesen hatte (s.o.). Desweiteren hatten auch Ratovitski (1998) und Tsutsui (1993) die Expression des Wildtyps von MK auf der Zelllinie G401 und Kitamura (1993) auf der Zelllinie HepG2 gezeigt. Wir finden hingegen nur die trunkierte Form von Midkine in den Zelllinien. Der Grund für die unterschiedliche Expression könnte in klonalen Variationen der Zelllinien G401 und HepG2 liegen. Auch die Verwendung verschiedener Primer führt möglicherweise zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die trunkierte Form ist wahrscheinlich krebsspezifisch . Dafür spricht, daß die trunkierte Form in Tumoren verschiedener humaner gastrointestinaler Organe nachweisbar war, im angrenzenden gesunden Gewebe jedoch nicht (Aridome et al., 1998).

Die trunkierte Form von Midkine besitzt keine N-terminale Domäne und wird in den Tumorzellen durch alternatives Splicing produziert, ein Vorgang der z.B. bei der Tumorgenese des Wilms´Tumors eine Rolle spielt. Dort ist die Form des WT-Supressor-Gens 1 verändert (Kaname et al., 1996; Tsutsui et al., 1993). Sollte die Expression von trunkiertem Midkine auf maligne Gewebe beschränkt sein, so könnte man MK als Tumormarker verwenden.

4.3 Vergleich: MK und PTN

Obwohl PTN in 50% seiner Sequenz mit Midkine übereinstimmt, fallen unterschiedliche Expressionsmuster der beiden Faktoren auf. Während MK in allen von uns untersuchten Zelllinien exprimiert wird, ist die Expression von PTN auf die Neuroblastomzelllinien beschränkt. Außerdem ist die Expression von PTN im Vergleich zu Midkine in den Neuroblastomzelllinien schwächer. Auch in anderen Studien wurde die Expression von PTN und MK verglichen, und es wurden sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten festgestellt. Nagakawara fand eine hohe Expression von PTN und MK im Gewebe zweier Wilms´Tumoren. In der von uns untersuchten Wilms´Tumor-Zelllinie G401 wird PTN jedoch nicht exprimiert. Allerdings kann es durch die Kultivierung von Tumorzellen und durch klonale Variationen zu Änderungen in der Expression der Wachstumsfaktoren kommen, so daß man Tumor und Tumorzelllinie nicht immer direkt vergleichen kann.

Die unterschiedlichen Expressionen sprechen für ein individuelles Expressionsmuster der Faktoren bei den einzelnen Tumoren. Trotz ihrer ähnlichen Sequenz scheinen die beiden Faktoren unterschiedliche Funktionen auszuüben. So wies Ratovitski 1998 nach, daß MK die Zellproliferation von G401 zeit- und dosisabhängig stimuliert. Es bindet dabei an einen spezifischen Zelloberflächenrezeptor von G401. Für PTN konnte dies jedoch nicht gezeigt werden.

4.4 bFGF

Der Wachstumsfaktor bFGF wird in allen 5 Neuroblastomzelllinien und außerdem in der Wilms´Tumor-Zelllinie G401 exprimiert. Dabei ist die Expression der mRNA in allen Zelllinien schwach, nur bei IMR32 ist sie stärker. Die beiden Hepatoblastomzelllinien HepG2 und C3A sind bisher noch nicht auf bFGF untersucht worden. Sie zeigen keine Expression des Faktors. Janet et al. untersuchte 1995 verschiedene Neuroblastomzelllinien (u.a. IMR32 und SK-N-SH). Dabei wies er in den Zelllinien LAN1, GIMEN und in der auch von uns untersuchten IMR32 die Expression von bFGF nach.

Die kontinuierliche Expression in den verschiedenen Neuroblastomzelllinien erklärt sich wahrscheinlich dadurch, daß zwischen Neuroblastomzellen und Neuroblasten ein enger Zusammenhang besteht. Die Proliferation und Differenzierung von Neuroblasten aus dem Sympathikusgrenzstrang zu Neuronen und adrenalen chromaffinen Zellen wird von bFGF und anderen Wachstumsfaktoren reguliert. Kommt es durch eine Regulationsstörung zu einem Mangel oder einer Überexpression bestimmter Faktoren in einem entscheidenden Entwicklungsstadium, proliferieren die Zellen weiter, ohne zu differenzieren, woraus dann ein Neuroblastom entstehen kann. Janet wies in diesem Zusammenhang außerdem nach, daß die Zelllinien IMR32 und SK-N-SH mit verstärkter Proliferation auf bFGF reagieren.

Diese Tatsachen weisen darauf hin, daß die Expression von bFGF bei den Neuroblastomzelllinien eine autokrine Wachstumsstimulation bewirkt.

Die Konzentrationen des bFGF-Proteins, das von den Neuroblastomzelllinien in den Zellkulturüberstand sezerniert wird, liegen alle unter 10 pg/ml. Der Grund für die relativ niedrige Sekretion von bFGF könnte darin liegen, daß es nur in geringen Mengen freigesetzt wird. Da es keine Signalsequenz besitzt, kann es nicht über den üblichen Sekretionsweg aus der Zelle ausgeschieden werden (Wright und Huang, 1996). Es ist zu vermuten, daß bFGF intrazellulär gespeichert und erst bei Lyse der Zelle freigesetzt wird. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Speicherung von bFGF in der extrazellulären Matrix (Gospodarowicz et al., 1987). Die Zellen in den Kulturflaschen produzieren zwar eine extrazelluläre Matrix, diese haftet aber am Boden der Kulturflasche und erscheint nicht im Zellkulturüberstand.

Desweiteren könnte bFGF die Komponenten der Mitogenese auf intrazellulärem Wege aktivieren (Wright und Huang, 1996) und muß dadurch überhaupt nicht sezerniert werden.

Neben den Neuroblastomzelllinien exprimieren aber auch andere Tumorzelllinien bFGF, wie z.B. die Prostata-Karzinomzelllinie LNCaP (Zuck et al., 1992), die Hepatomzelllinie SK-HEP-1 (Abraham et al., 1986) und die Wilms´Tumor-Zelllinie G401 (eigenes Ergebnis).

Für die Zelllinie G401 beobachten wir die signifikant höchste Konzentration des Proteins im Überstand (60 pg/ml), obwohl die Zelllinie IMR32 bFGF am stärksten exprimiert (Proteinkonzentration bei IMR32: 3,6 pg/ml).

Wie im Teil „Material und Methoden“ bereits erläutert, mußten wir die Zellen von G401 mit einem Cell-Scraper vom Boden der Kulturflasche lösen. Dabei entstehen Verletzungen in der Zellmembran. Sie wird somit durchgängig für das relativ kleine bFGF-Molekül, wie Muthukrishnan et al. es 1991 in seiner Arbeit beobachtete. Er wies für Endothelzellen nach, daß sich bFGF dort im Zytosol befindet. Durch die beim „Scraping“ entstehenden Löcher in der Membran hat es jetzt auch ohne Signalsequenz die Möglichkeit, die Zelle zu verlassen und seine wachstumsstimulierende Wirkung auszuüben. Das ist in vivo für die Wundheilung von Bedeutung, da es durch Trauma o.ä. ebenfalls zu Membranschäden kommt. Muthukrishnan zeigte außerdem, daß durch das „Scraping“ 41% der Menge freigesetzt wird, die man durch biochemische Extraktion erhält.

Da wir die Neuroblastomzellen nur durch „Herunterschlagen“ und nicht durch Scraping von der Kulturflasche lösten, wurde deren Zellmembran nicht in einem solchen Ausmaß zerstört. Das könnte die um eine Zehnerpotenz höhere Konzentration des bFGF- Proteins im Überstand von G401 erklären.

4.5 VEGF

VEGF wird von fast allen soliden Tumoren exprimiert (Barleon et al., 1997), allerdings wurden Zelllinien solider pädiatrischer Tumore bisher noch nicht auf die Expression und Sekretion dieses Faktors untersucht.

VEGF wird von allen von uns untersuchten Zelllinien exprimiert. Die Zelllinien Kelly, C3A und HepG2 zeigen dabei eine stärkere Expression als die übrigen Zelllinien.

Im gesunden Gewebe findet die Expression von VEGF vor allem während der Gehirnentwicklung und im Zusammenhang mit Ereignissen statt, die eine Angiogenese erfordern: Endometriumaufbau und Wundheilung (Kim et al., 1993). Dort, wo keine Angiogenese stattfindet, wird die Expression von VEGF herunterreguliert (Plate und Warnke, 1997).

Die Expression von VEGF in allen Zelllinien unserer Arbeit weist auf eine mögliche zentrale Rolle von VEGF als Regulator der Angiogenese hin, da die untersuchten pädiatrischen Tumoren alle sehr gut vaskularisiert sind.

Die Protein- Konzentrationen in den Zellkulturüberständen entsprechen der Stärke der mRNA- Expression. Dies zeigt, daß der Faktor sezerniert wird, wie bereits durch Plate und Warnke (1997) beschrieben.

Die Zelllinien C3A, Kelly und HepG2 unterscheiden sich mit Konzentrationen von 2661 ($\pm 124,72$) pg/ml, 2515 ($\pm 55,78$) pg/ml und 2185 ($\pm 152,7$) pg/ml signifikant von den übrigen Zelllinien. Es gibt also innerhalb von Tumorzellen der gleichen Tumorart bedeutende Unterschiede in der Expression und Sekretion dieses Faktors, was auf ein individuelles Expressionsmuster bei den einzelnen Tumoren hindeutet. Die Tatsache, daß VEGF auf den Hepatoblastomzelllinien und auf Kelly besonders hochreguliert ist, korreliert mit einer besonders ausgeprägten Vaskularisierung dieser Tumore.

In einer anderen Arbeit wurden im ELISA ähnliche Werte für eine Zelllinie des Rhabdomyosarkoms (5000 pg/ml) und von Glioblastoma multiforme (2000 pg/ml) nachgewiesen (Kim et al., 1993). Diese beiden Tumorarten gelten ebenfalls als gut vaskularisiert.

In dem von uns verwendeten ELISA wurden Antikörper gegen die Isoform von 165 Aminosäuren Länge verwendet, da diese Form am besten charakterisiert ist und am häufigsten vorkommt. Überdies ist sie heparinbindend und wird ins Medium sezerniert (Plate und Warnke, 1997). Es ist wahrscheinlich, daß die Zellen auch noch weitere Isoformen exprimieren (Neufeld et al., 1999). Bei den Doppelbanden in der PCR unserer Arbeit handelt es sich möglicherweise ebenfalls um alternative Transkripte von VEGF.

VEGF bindet an die zwei spezifischen Rezeptoren FLT-1 und flk -1, die hauptsächlich auf Endothelzellen vorkommen (Plate und Warnke, 1997). Der Faktor wirkt also parakrin und muß daher in ausreichenden Mengen sezerniert werden, um seine Zielzellen zu erreichen.

4.6 Expression und Sekretion der Wachstumsfaktoren unter Zytokinstimulation

Durch Stimulationen mit den Zytokinen $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ und $IFN\gamma$ sind in den Ergebnissen der PCR kaum Unterschiede zur mRNA-Expression unter basalen Bedingungen zu finden. Yoshida gelangte 1997 zu anderen Ergebnissen: Er behandelte Gefäßendothelzellen mit $TNF\alpha$ und wies mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR-Methode einen zeit- und dosisabhängigen Anstieg der mRNA Expression von VEGF und bFGF nach. Die von uns verwendete PCR-Methode ist nicht quantitativ, d.h., es wären nur sehr starke Unterschiede in der Expression sichtbar.

Im ELISA beobachten wir keine signifikanten Konzentrationsänderungen unter Zytokinstimulation.

Dies gilt auch für den Faktor VEGF, bei dem wir nur geringe Schwankungen unter Zytokineinfluß finden. $TNF\alpha$ scheint die Sekretion des VEGF-Proteins hochzuregulieren, die anderen Zytokine beeinflussen seine Sekretion in jeder Zelllinie unterschiedlich.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer Arbeit von Ferrer et al. (1998). Er untersuchte den Einfluß von $TNF\alpha$ und $IL-1\beta$ auf die Sekretion des Faktors VEGF in der Prostata-CA-Zelllinie Du-145.

Er wies nach, daß die VEGF-Konzentration im Zellkulturüberstand durch $\text{TNF}\alpha$ auf das 7fache und durch $\text{IL-1}\beta$ auf das Doppelte gesteigert werden konnte.

Die Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte im unterschiedlichen Versuchsablauf liegen. Während Ferrer seine Zelllinie 24 h lang mit einem serumhaltigem Medium und einer Zytokinkonzentration von 10 ng/ml behandelte, verwendeten wir eine Konzentration von 100 ng/ml, eine Stimulationszeit von 48 h und serumfreies Medium.

Yoshida et al. (1997) berichtet in seiner Studie, daß bei einer Einwirkzeit von $\text{TNF}\alpha$ von mehr als 6 Stunden alle Prozesse, die im Zusammenhang mit der Angiogenese stehen, gehemmt werden. Er behandelte die Endothelzellen in seiner Studie mit 100 U/ml $\text{TNF}\alpha$ nur 15 min lang und inkubierte die Zellen anschließend mit $\text{TNF}\alpha$ -freiem Medium über verschiedene Zeiträume.

Nach einer Zeit von 6 h kam es zu einem 8fachen Anstieg der VEGF mRNA-Expression. Ryuto et al. (1996) beobachtete bereits nach 30 min einen 3fachen Anstieg der mRNA-Expression von VEGF in der Gliomzelllinie U 521 unter einer Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$.

Es bestehen also große Unterschiede in der Zeitspanne, in der die Zellen mit Zytokinen behandelt werden, wodurch es wahrscheinlich zu den widersprüchlichen Ergebnissen kam. Außerdem untersuchten wir andere Zelllinien, die eventuell verschieden auf die Zytokine reagieren.

In einer weiteren Studie berichtet Wang et al. (1997) über antiproliferative Wirkungen der Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ auf die Zelllinie HepG2. Unter der 48-stündigen Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ (Konzentration von 50 ng/ml) oder mit $\text{IFN}\gamma$ (2000 U/ml) kommt es bei ihm zu einem Abfall der Zellzahl um 23% bzw. 24%. Auch wir fanden unter $\text{IFN}\gamma$ eine Reduktion der Zellzahl um 15%.

Jedoch fällt in unserer Studie die Zellzahl der Zelllinie HepG2 unter $\text{TNF}\alpha$ -Einfluß nicht ab. $\text{IL-1}\beta$ steigert die Zellzahl sogar um 30%. Dieser Widerspruch zu der Arbeit von Wang ist möglicherweise durch seine Verwendung von serumhaltigem Medium und durch eine andere Zytokin-Konzentration zu erklären.

4.7 Perspektive

Die soliden pädiatrischen Tumoren im fortgeschrittenen Stadium stellen ein Problem für die Therapie dar. Die konventionellen Therapien (Operation, Chemotherapie und Bestrahlung) sind ausgereizt, und es überleben von den Neuroblastom- Patienten der Hochrisikogruppe trotz multimodaler Therapie nur 10-20% (Haase et al., 1999). Ähnlich ungünstige Prognosen bestehen für die Patienten mit Hepatoblastom oder Wilms´Tumor in fortgeschrittenen Stadien. Das Ziel der bisherigen Therapieansätze war die Tumorzelle selbst. Ein neues Therapieziel rückt jetzt in das Zentrum des Interesses: die Neoangiogenese des Tumors. Die Neubildung von Gefäßen, die Voraussetzung für das Tumorwachstum ist und eine Metastasierung des Tumors begünstigt, kann möglicherweise dadurch verhindert werden, daß die Aktivität der neoangiogenetischen Wachstumsfaktoren gehemmt wird.

Beispielsweise bewirkt die Substanz Angiostatin, daß Gefäßendothelzellen nicht mehr auf angiogenetische Stimuli reagieren. In einem Versuch, in dem verschiedene Tumoren (Prostata-, Mamma-, Colon- Karzinom) in immundefiziente Mäuse subkutan implantiert wurden, kam es unter dem Einsatz von Angiostatin zu einer Wachstumshemmung der Tumoren von mindestens 95%. Angiostatin hemmte dabei reversibel die Proliferation von Endothelzellen, nicht aber von neoplastischen oder normalen Zellen. Zudem steigerte es die Apoptose der Tumorzellen um das 5-fache, da wahrscheinlich die parakrinen Stimuli aus den Endothelzellen fehlten (O´Reilly et al., 1996). Dieser Versuch zeigt die Wichtigkeit des Endothels bezüglich der Tumorkontrolle.

Ein anderer neuer Therapieansatz ist die Verabreichung polysulfatierter Zucker. Durch ihre Ähnlichkeit mit Heparin können sie den Zugang von Wachstumsfaktoren an ihre zellulären Glykosaminoglykan- Bindungsstellen verhindern, indem sie die Wachstumsfaktoren vorher an sich binden. Die Wachstumsfaktoren können nun ihre Wirkung nicht mehr ausüben. Pentosan-Polyphosphat (PPS) ist ein Beispiel für einen solches Polysaccharid.

In einer In-vitro-Studie von Zugmaier et al. (1992) blockiert PPS die parakrinen wachstumsstimulierenden Effekte von Tumorzellen (Mamma-, Prostata-, Epidermal-, Lungen – CA) auf Endothelzellen. Nach Injektion tumorigener Zelllinien in Nacktmäuse hemmt PPS außerdem zeit- und dosisabhängig die Bildung bzw. die Expansion von Tumoren (Zugmaier et al., 1992).

Möglicherweise kann durch Gabe von PPS während der intraoperativen Tumorentfernung das Angehen und Wachstum von Metastasen verhindert werden, die durch die intraoperative Tumorzellaussaat begünstigt werden. Mit den Kenntnissen über die Expression und Sekretion der verschiedenen heparinbindenden Wachstumsfaktoren durch die Zelllinien solider pädiatrischer Tumoren werden wichtige Grundlagen für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte geschaffen.

5 Zusammenfassung

Mit der Untersuchung der Expression und Sekretion von Wachstumsfaktoren in Tumorzelllinien pädiatrischer Tumoren weisen wir unterschiedliche Expressionsmuster in den Zelllinien nach.

Der Wachstumsfaktor Pleiotrophin wird nur von den Neuroblastomzelllinien exprimiert, nicht von den Zelllinien G401 (Wilms´Tumor), HepG2 und C3A (Hepatoblastome). In einer Arbeit von Ratovitski (1998) wurde PTN dagegen auf der Zelllinie HepG2 nachgewiesen.

Stärkste Expression und Sekretion von PTN zeigt die Zelllinie Wac2 mit einer Proteinkonzentration von 192,99 pg/ml im Überstand. Die Zelllinie ist durch ein extrem aggressives Wachstum charakterisiert. Einen Zusammenhang zwischen der PTN-Expression, der N-myc- Amplifikation und dem Wachstumsverhalten der Tumorzellen, wie er von Nagakawara (1995) beschrieben wurde, können wir nicht nachvollziehen.

Der Faktor Midkine zeigt trotz seiner Ähnlichkeit mit PTN ein anderes Expressionsmuster. Er ist in seiner trunkierten Form in allen untersuchten malignen Zelllinien vertreten, was die These erhärtet, daß die trunkierte Form krebsspezifisch ist. Durch Verwendung unterschiedlicher Primer und durch klonale Variationen in den Zelllinien entstanden teilweise andere Ergebnisse im Vergleich zu Studien von Ratovitski (1998), Kaname (1996), Kitamura (1996) und Tsutsui (1993), die die Wildtypform von Midkine auf G401 und HepG2 nachwiesen.

Der Faktor bFGF wird nur von den Neuroblastomzelllinien und der Wilms´Tumorzelllinie G401 exprimiert. Die beiden Hepatoblastomzelllinien HepG2 und C3A, die bisher noch nicht auf bFGF untersucht wurden, exprimieren diesen Faktor nicht. Die Neuroblastomzelllinien sezernieren bFGF nur sehr schwach (Konzentrationen von 0,94 pg/ml bis 3,6 pg/ml), was für eine intrazelluläre Speicherung oder eine Speicherung in der extrazellulären Matrix spricht. Die Zelllinie G401 sezerniert mit 59 pg/ml hingegen eine größere Menge von bFGF bei nur geringer mRNA Expression. Das bFGF- Protein wird hier vermutlich durch Schäden in der Zellmembran freigesetzt.

Die Schädigungen entstehen durch das Cell-Scraping. Diese Methode wurde angewendet, um die G401-Zellen von der Kulturflasche zu lösen.

Wir können zum ersten Mal zeigen, daß der zentrale Faktor für die Neoangiogenese VEGF, wie von fast allen soliden Tumoren des Erwachsenenalters, auch von den Zelllinien der untersuchten soliden pädiatrischen Tumoren exprimiert wird. Der Expression entsprechen die Konzentrationen im Zellkulturüberstand. Die höchsten Werte erreichen die Hepatoblastomzelllinien C3A und HepG2 (2661 pg/ml und 2185 pg/ml) und die Zelllinie Kelly (2515 pg/ml). Sie heben sich damit signifikant von den anderen Zelllinien ab.

Die Studien von Yoshida (1997), Ferrer (1998) und Ryuto (1996) weisen Einflüsse durch Zytokine auf Zellzahl, Wachstumsfaktorexpression und - Sekretion nach. In unserer Arbeit kommt es durch die Behandlung der Tumorzelllinien mit den Zytokinen $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ und $IFN\gamma$ zu keinen Veränderungen der mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren. Auch die Konzentrationen im Zellkulturüberstand ändern sich nur in geringem, nicht signifikantem Ausmaß. Bei der Zellzahl gibt es ebenfalls nur unbedeutende Schwankungen nach Zytokin- Exposition.

Mit der Kenntnis der Regulation des Wachstums und der Angiogenese von Tumoren durch die verschiedenen Wachstumsfaktoren ist es möglich, neue Therapiekonzepte zu entwickeln.

Abraham, J.A., Whang, J.L., Tumolo, A., Mergia, A., Friedman, J.,
Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C. (1986)

Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic
organization

EMBO J, 5, 2525-2528

Aridome, K., Takao, S., Kaname, T., Kadomatsu, K., Natsugoe, S., Kijima, F.,
Aikou, T., Muramatsu, T. (1998)

Truncated midkine as a marker of diagnosis and detection of nodal
metastases in gastrointestinal carcinomas

Br J Cancer, 78, 472-477

Barleon, B., Siemeister, G., Martiny-Baron, G., Weindel, K., Herzog, C.,
Marme, D. (1997)

Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor *fms*-like Tyrosine
Kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial
cells

Cancer Res, 57, 5421-5425

Barthlen, W., Stadler, J., Lehn, N.L., Miethke, T., Barthels, H., Siewert, J.R.
(1994)

Serum levels of end products of nitric oxide synthesis correlate with body
temperature in patients with postoperative abdominal sepsis

Shock, 2, 398-401

Bhattacharya, S., Lobo, F.D., Pai, P.K., Pai, G.K. (1998)

Hepatic neoplasms in childhood- a clinicopathologic study

Pediatr Surg Int, 14, 51-54

Brodeur, G.M.; Seeger, R.C.; Barrett, A.; Berthold, F.; Casleberry, R.P.;

D`Anigo, G.; Bernardi, B.; Evans, A.E.; Favrot, M.; Freemann, A.L.; Haase, G.;

Hartmann, O.; Hayer, F.A.; Helson, L.; Kemshead, J.; Lampert, F.; Ninane, J.; Ohkawa, H.; Philip, T.; Pinkerton, C.R.; Pritchard, J.; Sawada, T.; Siegel, St.; Smith, E.I.; Tsuchida, Y.; Voute, P.A. (1988)
International criteria for diagnosis, staging and response to treatment in patients with neuroblastoma
J Clin Oncol, 6, 114-122

Chauhan, A.K., Li, Y-S., Deuel, T.F. (1993)
Pleiotrophin transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice
Proc Natl Acad Sci USA, 90, 679-682

Cross, M., Dexter, T.M. (1991)
Growth factors and development, transformation and tumorigenesis
In: Alberts, B. et al.: Molekularbiologie der Zelle
3.Auflage , VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo

Ferrer, F.A., Miller, L.J., Andrawis, R.I., Kurtzman, S.H., Albertsen, P.C., Laudone, V.P., Kreutzer, D.L. (1998)
Angiogenesis and prostate cancer: In vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells
Urology, 51, 161-167

Folkman, J. (1990)
What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?
J Natl Cancer Inst, 82, 4-6

Folkman, J. (1995)
Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease
Nature medicine, 1, 27-31

Garver, R.I., Jr., Chan, C.S., Milner, P.G. (1993)
Reciprocal expression of Pleiotrophin and Midkine in normal versus malignant tumors
Am J Respir Cell Mol Biol, 9, 463-466

Garver, R.I., Jr., Radford, D.M., Donis-Kelller, H., Wick, M.R., Milner, P.G. (1994)
Midkine and Pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue
Cancer, 74, 1584-1590

Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerer, L., Neufeld, G. (1987)
Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor
Endocr Rev, 8, 95-114

Haase, G.M., Perez, C., Atkinson, J.B. (1999)
Current aspects of biology, risk assessment, and treatment of neuroblastoma
Semin Surg Oncol, 16, 91-104

Jäger, R., Noll, K., Havemann, K., Pflüger, K.-H., Knabbe, C., Rauvala, H., Zugmaier, G. (1997)
Differential expression and biological activity of the heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in lung cancer cell lines
Int J Cancer, 73, 537-543

Janet, T., Lüdecke, G., Otten, U., Unsicker, K. (1995)
Heterogeneity of human neuroblastoma cell lines in their proliferative responses to basic FGF, NGF, and EGF: Correlation with expression of growth factors and growth factor receptors
J Neurosci Res, 40, 707-715

Kaname, T., Kadomatsu, K., Aridome, K., Yamashita, S., Sakamoto, K.,
Ogawa, M., Muramatsu, T., Yamamura, K. (1996)
The expression of truncated MK in human tumors
Biochem Biophys Res Commun, 219, 256-260

Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., Ferrara, N.
(1993)
Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis
suppresses tumor growth in *vivo*
Nature, 362, 841-844

Masanori, K., Shirasawa, T., Mitarai, T., Muramatsu, T., Maruyama, M. (1993)
A retinoid responsive cytokine gene, MK, is preferentially expressed in the
proximal tubules of the kidney and human tumor cell lines
Am J Pathol, 142, 425-431

McNamara, D.A. , Harmey, J.H: , Walsh, T.N: , Redmond, H.P.:,
Bouchier-Hayes, D.J: (1998)
Significance of angiogenesis in cancer therapy
Br J Surg, 85, 1044-1055

Merenmies, J., Rauvala, H. (1990)
Molecular cloning of the 18-kDa growth associated protein of developing brain
J Biol Chem, 265, 16721-16724

Miller, R.G., Jr. (1981)
Simultaneous statistical interference. 2nd edition
Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Miyashiro, I., Kaname, T., Shin, E., Wakasugi, E., Monden, T., Takatsuka, Y., Kikkawa, N., Muramatsu, T., Monden, M., Akiyama, T. (1997)

Midkine expression in human breast cancer: Expression of truncated form
Breast Cancer Res Treat, 43, 1-6

Muthukrishnan, L., Warder, E., McNeil, P. (1991)

Basic fibroblast growth factor is efficiently released from a cytosolic storage site through plasma membrane disruptions of endothelial cells
J Cell Physiol, 148, 1-16

Nakagawara, A., Milbrandt, J., Muramatsu, T., Deuel, T.F., Zhao, H., Cnaan, A., Brodeur, G.M. (1995)

Differential expression of Pleiotrophin and Midkine in advanced neuroblastomas
Cancer Res, 55, 1792-1797

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

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors
FASEB J, 13, 9-22

Nitta, T, Ebato, M., Sato, K., Okumura, K. (1994)

Expression of tumor necrosis factor- α , - β and interferon γ genes within human neuroglial tumor cells and brain specimens
Cytokine, 6, 171-180

O'Reilly, MS., Holmgren, L., Chen, C., Folkman, J. (1996)

Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice

Nat Med, 2, 689-692

Plate, K.H., Warnke, P.C. (1997)
Vascular endothelial growth factor
J Neuro-Oncol, 35, 365-372

Ratovitski, E.A.; Kotzbauer, P.T.; Milbrandt, J.; Lowenstein, C.J.; Burrow, C.R.
(1998)
Midkine induces tumor cell proliferation and binds to a high affinity signaling
receptor associated with JAK tyrosine kinases
J Biol Chem, 273, 3654-3660

Raulo, E., Julkunen, I., Merenmies, J., Pihlaskari, R., Rauvala, H. (1992)
Secretion and biological activities of heparin-binding growth-associated
molecule
J Biol Chem, 267, 11408-11416

Reynolds, M. (1999)
Pediatric liver tumors
Semin Surg Oncol, 16, 159-172

Ryuto, M., Ono, M., Izumi, H., Yoshida, S., Weich, HA., Kohno, K., Kuwano,
M. (1996)
Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha
in human glioma cells. Possible roles of SP-1.
J Biol Chem, 271, 28220-28228

Scheil, S., Lüdecke, G., Unsicker, K. (1994)
Interleukin-1 β and Interferon γ interact with fibroblast growth factor-2 in the
control of neuroblastoma cell proliferation and differentiation
Int J Devl Neuroscience, 12, 405-410

Shamberger, R.C. (1999)

Pediatric renal tumors

Semin Surg Oncol, 16, 105-120

Souttou, B., Juhl, H., Hackenbruck, J., Rockseisen, M., Klomp, H.J., Raulais, D., Vigny, M., Wellstein, A. (1998)

Relationship between serum concentrations of the growth factor pleiotrophin and pleiotrophin-positive tumors

J Natl Cancer Inst, 90, 1468-1473

Tokunaga, T., Oshika, J., Abe, Y., Ozeki, Y., Sadahiro, S., Kijima, H.,

Tsuchida, T., Yamazaki, H., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Nakamura, M. (1998)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer

Br J Cancer, 77, 998-1002

Tsutsui, J., Kadomatsu, K., Matsubara, K., Nakagawara, A., Hamanoue, M.,

Takao, S., Shimazu, H., Ohi, Y., Muramatsu, T. (1993)

A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: Increased Midkine expression in Wilms Tumor and other human carcinomas

Cancer Res, 53, 1281-1285

Wang, D., Yang, E., Cheng, L.Y. (1997)

Effects of IFN γ , TNF α and EGF on the expression of HLA Class 1 antigen and the proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells

Anticancer Res, 17, 181-188

Wellstein, A., Fang, W., Khatri, A., Lu, Y., Swain, S.S., Dickson, R.B., Sasse, J., Riegel, A.T., Lippman, M.E. (1992)

A heparin-binding growth factor secreted from breast cancer cells homologous

to a developmentally regulated cytokine

J Biol Chem, 267, 2582-2587

Wright, J.A., Huang, A. (1996)

Growth factors in mechanisms of malignancy: roles for TGF β and FGF

Histol Histopathol, 11, 521-536

Yaon, A., Klagsbrun, M. (1990)

Autocrine regulation of cell growth and transformation by basic fibroblast growth factor

Cancer and Metastasis Rev, 9, 191-202

Yoshida, S., Ono, M., Shono, T., Izumi, H., Ishibashi, T., Suzuki, H., Kuwano, M. (1997)

Involvement of Interleukin -8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha -dependent angiogenesis

Mol Cell Biol, 17, 4015-4023

Zuck, B., Goepfert, C., Nedlin-Chittka, A., Sohrt, K., Voigt, K.-D., Knabbe, C. (1992)

Regulation of fibroblast growth factor-like protein(s) in the androgen-responsive human prostate carcinoma cell line LNCaP

J Steroid Biochem Molec Biol, 41, 659-663

Zugmaier, G., Lippman, M.E., Wellstein, A. (1992)

Inhibition by Pentosan Polysulfate (PPS) of heparin-binding growth factors released from tumor cells and blockage by PPS of tumor growth in animals

J Nat Cancer Inst, 84, 1716-1724

Lebenslauf

Name: Dorothee Flaadt
Geburtstag: 18.12.1974 in Tübingen
Wohnsitz: Lange Gasse 7
72070 Tübingen
Eltern: Hedwig und Josef Flaadt
Schwester: Christiane Flaadt
Grundschule: 1981-1985 in Sulz am Neckar
Gymnasium: 1985-1994 in Sulz
Freiwilliges Soziales Jahr: August 1994 – August 1995 im Karl-Olga-Krankenhaus in Stuttgart

Studium

Vorklinik: ab Oktober 1995 in Homburg/Saar
Auslandssemester: Oktober 1996- Mai 1997 in England
(Leicester University)
Physikum: August 1997 in Homburg
Klinischer Abschnitt: ab Oktober 1997 in Tübingen
Staatsexamen 1. Abschnitt: August 1998
Auslandsfamulaturen: August 1999 im Wexford General
Hospital (Irland); Innere Medizin
Staatsexamen 3. Abschnitt: 15.05. 2002

Tübingen, den 11.06.2002

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Schweizer für die Überlassung des Themas bedanken.

Herrn Doktor Barthlen danke ich sehr für die gute Betreuung und Organisation der Arbeit, besonders für die hilfreiche Unterstützung bei den Grafiken.

Für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit mit Zellkulturen und die freundliche und geduldige Betreuung bei der Laborarbeit gilt mein besonderer Dank Dr. Rainer Girgert und Dr. Josefa Wittrock, die beide immer ein offenes Ohr für auftretende Probleme hatten.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Professor Knabbe, Miriam Buck und Ulrike Keim vom Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart für die Unterstützung bei den PCRs und ELISAs für bFGF und VEGF; sowie bei Dr. Robert Jäger und Cand. med. Bettina List für die Hilfe beim ELISA für Pleiotrophin.

Danke auch Herrn Professor Dietz für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung.

Zuletzt gilt mein Dank allen, die mich in jeglicher Form unterstützt haben, besonders meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums.