Aus der Abteilung Anatomie und Zellbiologie

(Komm. Leiter: Prof. Dr. rer. nat. J. Wilting)

im Zentrum Anatomie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Bedeutung von Monocyte Chemotactic Protein – 1 (MCP – 1) für die Angiogenese des Glioms

Experimentelle Untersuchungen in vitro und am Vogelmodell

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg – August – Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Franziska Sattler

aus

Wernigerode

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel
I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. J. Wilting
II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Stadelmann-Nessler
III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. Crozier
Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2010

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 4

1.1 Gefäßentstehung 4

1.2 Pathologische Angiogenese 8

1.3 Gliome 9

1.4 Angiogenese bei Gliomen 10

1.5 Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) 11

1.6 Die Chorioallantoismembran (CAM) 13

1.7 Ziel der Arbeit 15

2 MATERIAL UND METHODEN 17

2.1 Geräte 17

2.2 Verbrauchsmaterialien 18

2.3 Chemikalien 19

2.4 Molekularbiologische Materialien 20

2.5 Zellkultur 20
2.5.1 Reagenzien 20
2.5.2 Zelllinien 21
2.5.3 Zellkultur von CNS-1-Zellen 21
2.5.4 Lagerung von CNS-1 und HPA-SMCs 22
2.5.5 Isolierung von „Human Umbilical Vein Endothelial Cells“ und Zellkultur 22
2.5.6 Zellkultur von “Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells” (HPA-SMCs) 23

2.6 Chorioallantoismembran-Assay 24
2.6.1 Standardlösungen 24
2.6.2 Versuchstiere 24
2.6.3 Hühnereier-CAM-Assay 24
2.6.4 Wachteleier-CAM-Assay 25
2.6.5 CAM-Assay mit rekombinantem humanen MCP-1 26
2.6.6 Fixieren der Präparate für makroskopische Untersuchungen 26
2.6.7 Bestimmung der Tumorgröße 27

2.7 Histologie 28
2.7.1 Standardlösungen für die Histologie 28
2.7.2 Herstellung von Paraffinblöcken 29
2.7.3 Herstellung von Paraffinschnitten 29
2.7.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten 29

2.7.5 Immunperoxidase-Kernechtrot-Färbung ... 30
2.7.6 Substanzen zur Fixierung und Einbettung in Epoxidharz ... 31
2.7.7 Fixierung und Einbettung in Epoxidharzblöcken ... 31
2.7.8 Herstellung von Semidünnschnitten ... 32
2.7.9 Methylenblau-Färbung ... 32

2.8 Immunfluoreszenz ... 32
2.8.1 Standardlösungen für die Immunhistologie ... 32
2.8.2 Antikörper für die Immunfluoreszenz ... 32
2.8.3 Immunfluoreszenz-Färbung ... 33
2.8.4 Anti-α-SMA-Antikörper Quantifizierung ... 34

2.9 In-vitro-Experimente ... 35
2.9.1 Reagenzien für Proliferationsassays und Kristallviolettfärbung ... 35
2.9.2 Proliferationsassay mit CNS-1-Zellen ... 35
2.9.3 Proliferationsassay mit HUVECs unter MCP-1-Stimulation ... 36
2.9.4 Proliferationsassay mit HPA-SMCs unter MCP-1-Stimulation ... 37

2.10 Nachweis von MCP-1-Rezeptoren mittels real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (real-time RT-PCR) ... 38
2.10.1 Semiquantitative real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion ... 38
2.10.2 Gewinnung der Zellproben für die real-time RT-PCR ... 40
2.10.3 Isolierung der RNA von mononukleären Zellen des Menschen ... 40
2.10.4 Isolierung der RNA von HUVECs und HPA-SMCs ... 42
2.10.5 Isolierung der RNA von HUVECs und HPA-SMCs nach MCP-1-Stimulation ... 42
2.10.6 RNA-Isolierung mit Qiagen Mini Präparations Kit ... 43
2.10.7 RNA-Gel ... 44
2.10.8 Herstellung der cDNA ... 44
2.10.9 Primerdesign ... 45
2.10.10 Oligonukleotidprimer-Verdünnungsreihe ... 46
2.10.11 Schmelzkurvenanalyse ... 46
2.10.12 Real-time RT-PCR ... 47
2.10.13 Relative Nukleotidquantifizierung mittels real-time RT-PCR ... 47

2.11 Formeln ... 48

3 ERGEBNISSE ... 49

3.1 In-vitro-Untersuchungen der CNS-1-Gliomzellen ... 49

3.2 Makroskopische Ergebnisse im CAM-Assay ... 53
3.2.1 CAM-Assay auf Gallus gallus domesticus und Coturnix coturnix japonica ... 53
3.2.2 Bestimmung des Tumorvolumens ... 55
3.2.3 CAM-Assay mit humanem MCP-1 ... 56

3.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen ... 58
3.3.1 HE-Färbung ... 58
3.3.2 Immunperoxidase-Färbung ... 61

3.4 Untersuchungen mittels Immunfluoreszenztechniken ... 63
3.4.1 Quantifizierung mit anti-α-SMA-Färbungen ... 63
3.4.2 QH1- und Anti-α-SMA-Doppelfärbung von Wachtel-Paraffinschnitten ... 64

3.4.3 GFAP-α-SMA-Färbung von Hühner-Paraffinschnitten 70

3.5 Histologische Untersuchungen der CAM nach MCP-1-Stimulation..... 71

3.6 In-vitro-Ergebnisse mit HUVECs und HPA-SMCs 72
3.6.1 Proliferationsassay mit HUVECs 72
3.6.2 Proliferationsassay mit HPA-SMCs 73

3.7 Ergebnisse der semiquantitativen real-time RT-PCR 74
3.7.1 Kontrolle der RNA-Qualität 74
3.7.2 Schmelzkurvenanalyse 75
3.7.3 Real-time RT-PCR-Untersuchung von unstimulierten HUVECs & HPA-SMCs 76
3.7.4 Real-time RT-PCR-Untersuchung von stimulierten HUVECs und HPA-SMCs. 77
3.7.5 Real-time RT-PCR-Untersuchung von CNS-1-Gliomzellen 79

3.8 MCP-1-Strukturvergleich 80

4 DISKUSSION 82

4.1 Die CAM als geeignetes Versuchsmodell? 82

4.2 MCP-1 als Selektionsvorteil 85
4.2.1 Wachstum in vitro 85
4.2.2 Wachstum in vivo 87

4.3 MCP-1 fördert die Tumorangiogenese bzw. Arteriogenese 87

4.4 Wirkungen von MCP-1: direkt oder durch Monozyten vermittelt 90

5 ZUSAMMENFASSUNG 96

6 LITERATURVERZEICHNIS 98

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 105

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 108

1 Einleitung

1.1 Gefäßentstehung

Schon in der frühen Embryonalentwicklung aller Wirbeltiere entstehen Gefäße, die die Versorgung des Körpers und seiner Organe sicher stellen. Der Gefäßbaum ist histologisch in arterielle, kapilläre und venöse Abschnitte unterteilt. Über Arterien erfolgt ein regelbarer Zustrom des Blutes in die Kapillargebiete, die mit ihren langsamen Strömungsgeschwindigkeiten Austauschprozessen dienen. Der Abfluss wird über Venen gewährleistet (Schiebler et al., 1999).

Alle Gefäße besitzen dabei einen gemeinsamen Grundbauplan, der aufgrund von Anpassungsprozessen an unterschiedliche Bedingungen modifiziert wird. Arterien und Venen bestehen aus 3 Wandschichten: Tunica interna (Intima), Tunica media (Media) und Tunica externa (Adventitia). Die Intima besteht aus einem geschlossenen einschichtigen Verband flacher Zellen, dem Endothel. Die Endothelzellen liegen der Basalmembran und dem subendothelialen Bindegewebe auf. Sie regeln Austauschprozesse, reagieren auf und bilden verschiedene Signalmoleküle. Anschließend folgt die Media mit einer ringförmigen Anordnung von glatten Muskelzellen und Bindegewebszellen. Mit erhöhter Beanspruchung durch Blutdruck und Pulswellen steigt der Anteil dieser Wandschicht im Gefäß. Durch Muskelzellkontraktion regelt sie die Gefäßweite. Die dritte Schicht, die Adventitia, besteht aus Bindegewebe mit Geflechten von Kollagenfasern und einer unterschiedlichen Menge an elastischen Netzen, sowie versorgenden Nerven und kleineren Gefäßen. Die Venen sind dabei im allgemeinen weitlumiger und dünnwandiger als die entsprechenden Arterien (Schiebler et al., 1999). Das subendotheliale Bindegewebe der Intima kann fehlen und die Muskulatur der Media ist durch kollagenes Bindegewebe aufgelockert (Hirschi und D'Amore, 1996; Schiebler et al., 1999). Kapillaren dagegen bestehen nur aus Endothel, Basalmembran und Perizyten. Sie verhalten sich daher wie „druckpassive Schläuche" (Schiebler et al., 1999).

Gefäße entstehen im Embryo zunächst durch Vaskulogenese. Hierbei kommt es zu einer De-Novo-Gefäßbildung aus Vorläuferzellen des Mesoderms. Primär regt das Entoderm durch hohe Expression von Wachstumsfaktoren wie Fibroblast Growth Factor (FGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) das Mesoderm zur Gefäßbildung an. Das Mesoderm wiederum bildet aus Vorläuferzellen sogenannte Hämangioblasten. Diese kumulieren zu

Blutinseln sowohl im Embryo als auch extraembryonal im Dottersack. Nun differenzieren sich die inneren Zellen zu Hämatoblasten, den Vorläuferzellen der Hämatopoese, während die äußeren Zellen zu Angioblasten werden. Angioblasten bilden die späteren Endothelzellen der Blutgefäße. Durch das Einwirken von Proteinen der VEGF- Familie, VEGF-Rezeptoren und dem basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) bilden sie den primären Gefäßplexus, der im Wesentlichen aus weitlumigen Kapillaren besteht (Pardanaud et al., 1989; Flamme et al., 1995, 1997; Risau und Flamme, 1995; Carmeliet, 2000).

Per definitionem ist Angiogenese die Bildung von Gefäßen aus bereits existierenden Gefäßen. Dementsprechend entwickelt sich in der embryonalen Entwicklung der primäre Kapillarplexus nun durch Angiogenese und Vaskulogenese weiter. Diese Entwicklung wird auch durch Hypoxie gesteuert. Dabei werden zwei Formen der Angiogenese unterschieden: Die Sprossung und die nicht-aussprossende Angiogenese oder Intussuszeption (Risau, 1997).

Angiogenese durch Sprossung gibt es sowohl extra- als auch intraembryonal. Sie beginnt zunächst mit der Destabilisierung der bestehenden Gefäße. Die Gefäße, getrieben durch Stickstoffmonoxid (NO) und VEGF, erweitern sich und ihre Permeabilität steigt. Nun bauen Proteasen einen Teil der extrazellulären Matrix ab, wodurch u.a. angiogene Faktoren freigesetzt werden (Risau, 1997; Carmeliet, 2000; Yancopoulos et al., 2000). Angiogene Faktoren sind z.B. VEGF, bFGF, Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), Angiopoetin-2 (Ang-2), Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und auch Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1). Durch sie stimulierte Endothelien können sich nun aus ihrem Verband lösen. Sie wandern aus den destabilisierten Gefäßen in die abgebaute extrazelluläre Matrix ein und bilden neue Endothelstränge, in denen dann Lumina entstehen (Nicosia et al., 1986; Carmeliet, 2000; Joussen et al., 2003).

Das nun entstandene Gefäßsystem entspricht sinusoidalen Kapillaren mit annähernd gleicher Größe und geflechtartiger Organisation und wird zu einem strukturierten Netz modelliert (Carmeliet, 2000). Dabei werden manche Gefäße durch verschiedene Mechanismen verstärkt, andere rückgebildet, dies wird auch „Branching and Pruning“ genannt. Im Laufe dieses Prozesses lagern sich perivaskuläre Zellen an die primitiven Gefäße und differenzieren sich zu Perizyten oder glatten Muskelzellen. Ohne diese periendothelialen Zellen und die extrazelluläre Matrix könnten die neu gebildeten Gefäße nur unter dem Einfluss angiogener Faktoren bestehen. Das zuvor stark proliferierende und migrierende Endothel wird nun

gehemmt und differenziert sich aus. Unter dem Einfluss seiner Umgebung wird es weitgehend unabhängig von angiogenen Faktoren wie VEGF. Das Endothel, die perivaskulären Zellen und die extrazelluläre Matrix beeinflussen sich durch verschiedene Faktoren gegenseitig in ihrer Ausdifferenzierung und stabilisieren das Gefäß (Carmeliet, 2000).

Nichtsprossende Angiogenese oder Intussuszeption, die das Wachstum in sich selbst bedeutet, ist eine alternative Art des Gefäßwachstums. Sie scheint ein weiterer wichtiger Mechanismus des „Branching and Pruning“ zu sein und wird sofort nach der Entstehung des primären Kapillarplexus beobachtet. Dabei kommt es zur Spaltung oder auch zur Fusion der bereits bestehenden Gefäße. Bei der Spaltung nähern sich gegenüber liegende Gefäßwände einander an, bis es zu einer Kontaktzone zwischen den Endothelzellen kommt. Die Endothelzellverbindungen werden neu organisiert und ein interstitielles Gewebekissen formiert sich an der Spaltungsstelle. Dieses wird von Perizyten und Myofibroblasten infiltriert und reift aus. Hier ist kaum endotheliale Proliferation zu beobachten, sondern es kommt vielmehr zur Modellierung bereits bestehender Gefäße. Kapillarplexus können sich auf diese Weise schnell und ökonomisch vergrößern. Insgesamt wird die Struktur des Gefäßnetzes dadurch verbessert und ausgereifter (Patan et al., 1996, 1997; Risau, 1997; Djonov et al., 2003).

Mit der entstandenen Blutzirkulation wird die weitere Reifung und Entwicklung des Gefäßsystems immer abhängiger von Kräften, die durch den Blutstrom wirken. Scherkräfte und Hyperoxie wirken sich auf das Endothel aus, das seine Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte verändert und z.B. PDGF-B sezerniert. Benachbarte perivaskuläre Zellen mit dem PDGF-Rezeptor, wie Perizyten und glatte Muskelzellen, lagern sich noch stärker an das Endothel an. PDGF-B fördert dabei die Proliferation und Differenzierung zu glatten Muskelzellen (Gerhardt und Betsholtz, 2003), sowie die Immigration von Myofibroblasten und die Produktion extrazellulärer Matrix (Wilting et al., 1992). Beobachtungen zeigen, dass für eine stabile Angiogenese die Differenzierung von Arterien und Venen unabdingbar ist. Eine wichtige Rolle spielen der nur auf dem arteriellen Endothel vorkommende Ephrin-B2-Ligand und der korrespondierende Ephrin-B4-Rezeptor (Eph-B4-Rezeptor), der nur venös exprimiert wird. Beide sind zellständig, so dass ein Zell-Zell-Kontakt zwischen arteriellem und venösem Endothel notwendig ist (Wang et al., 1998; Adams et al., 1999; Augustin und Reis, 2003). Man nimmt daher an, dass die Differenzierung in Arterien und Venen zum Teil bereits genetisch festgelegt ist. Bei Ausschaltung dieser Gene kommt es zwar zu einer

normalen Vaskulogenese, jedoch differenzierten sich keine Arterien und Venen im Sinne einer Angiogenese (Wang et al., 1998; Zhang XQ et al., 2001).

Laut Literatur existiert eine Vielzahl von Faktoren, die bei der Hämangiogenese (Blutgefäßbildung) eine Rolle spielen. Der Wichtigste und bekannteste ist VEGF-A (Oh et al., 1997; Yancopoulos et al., 2000; Wilting et al., 2003). VEGF-A ist ein Glykoprotein, das aus 2 Peptiden besteht, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Es gehört zur VEGF-Familie und ist der dominierende hämangiogene Faktor der Familie (Mentlein und Held-Feindt, 2003). Von VEGF-A existieren 6 Isoformen mit Aminosäuren-Kettenlängen von 121 bis 206, aber man nimmt an, dass VEGF-A_{165} das größte Potential besitzt (Carmeliet, 2000).

Ein weiterer angiogener Faktor ist Platelet-derived Growth Factor (PDGF). Strukturell ist PDGF ein homo- oder heterogenes Dimer mit 2 Subeinheiten, PDGF-A und PDGF-B (Williams, 1989). PDGF-BB und der passende Rezeptor konnten dabei aus Endothelzellen kleinerer Gefäße isoliert werden. Man geht von einer autokrinen Stimulation der Endothelzellen aus. Das Endothel größerer Gefäße besitzt wiederum keinen Rezeptor bei ebenfalls hoher PDGF-BB Expression. Die Rezeptoren befinden sich auf den glatten Muskelzellen der Media dieser Gefäße. Eine wichtige Funktion scheint somit deren Beeinflussung und die Differenzierung der perivaskulären Zellen zu glatten Muskelzellen zu sein (Holmgren et al., 1991).

Die Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen an bereits bestehenden arteriellen Kollateralen wird als Arteriogenese bezeichnet (Carmeliet, 2000). In der embryonalen Entwicklung kann man also die Ausreifung von größeren Gefäßen zu Arterien und ihre Ummantelung mit glatten Muskelzellen zusätzlich als Arteriogenese definieren. Im erwachsenen Individuum sind Kollateralen und kleine Arteriolen (Durchmesser 10-20µm) vorhanden, die gemäß der Definition für Arteriogenese, z.B. bei Verschluss einer größeren Arterie, ihren Durchmesser beträchtlich vergrößern können und sich zu großen Arterien differenzieren (van Royen et al., 2001; Buschmann et al., 2003). Dabei ist dieser Prozess stark an Entzündungsreaktionen gebunden und es konnte gezeigt werden, dass entzündungsgebundene Chemokine wie MCP-1 eine Steigerung dieses Prozesses bewirken (Ito et al., 1997; Hoefer et al., 2001; Schirmer et al., 2004).

1.2 Pathologische Angiogenese

Auch beim erwachsenen Individuum kommt es zur Neubildung von Gefäßen durch Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese (Carmeliet, 2000). Physiologische Angiogenese kommt u.a. beim ovariellen Zyklus oder bei der Wundheilung vor. Sie wird durch ähnliche Steuerungsmechanismen geregelt, wie die Angiogenese des Embryos. Pathologische Angiogenese stellt lediglich eine quantitativ fehlgesteuerte Gefäßbildung dar und zeichnet sich durch funktionell schlecht angepasste Gefäße aus. Im Grunde ist diese Form der Angiogenese also überschießend oder auch unzureichend (Kuwano et al., 2001; Joussen et al., 2003). Dem Prozess liegt ein Ungleichgewicht von stimulatorischen und inhibitorischen Faktoren zugrunde (Joussen et al. 2003). Bekannte Beispiele sind das Gefäßwachstum bei der rheumatoiden Arthritis, der diabetischen Retinopathie und der Tumorangiogenese (Joussen et al., 2003; Gerhardt und Betsholtz, 2003; Cohen, 2006).

Pathologische Angiogenese wird oftmals erst durch eine entzündliche Reaktion auf einen anhaltenden Reiz hin getriggert. Die angelockten weißen Blutzellen sezernieren angiogene oder arteriogene Faktoren wie: VEGF, bFGF, Transforming Growth Factor β-1 (TGFβ-1), Interleukin-8 (IL-8), PDGF, IGF-1, MCP-1, Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und Proteasen. Diese wirken wiederum chemotaktisch auf Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Leukozyten oder Thrombozyten und führen somit zur Angiogenese (Carmeliet, 2000). Durch abnormale Permeabilität bei defektem Umbau bzw. unzureichender Reifung der Gefäße kommt es zum Flüssigkeitsaustritt und folglich zum Ödem, sowie zu Hämorrhagien und einem Fortsetzen der Entzündungsreaktionen (Gerhardt und Betsholtz, 2003).

Bei der Tumorneoangiogenese wird die normalerweise stark regulierte und sich selbst limitierende Angiogenese durch die Tumorzellen gestört. Die Limitierung des Tumorwachstums wird durch einen „angiogenen Switch“ der Tumorzellen beendet (Folkman et al., 1989; Hanahan und Folkman, 1996; Siegenthaler, 2001). Zwar proliferieren Tumorzellen auch vorher sehr schnell, aber ab einer bestimmten Größe von soliden Tumoren kommt es aufgrund der mangelnden Versorgung zu Nekrosen und die Größe des Tumors bleibt konstant (Folkman, 1974; Goldbrunner et al., 1999). Ein weiteres Wachstum kann nur durch eine hinreichende Perfusion erfolgen (Folkman, 1974; Folkman, 1985). Ausgelöst durch die Hypoxie im Tumor kommt es zu einer Umstellung der Situation, dem „angiogenen Switch“ der Tumorzellen. Die Zellen beginnen nun angiogene Faktoren in großen Mengen zu

exprimieren oder regeln Inhibitoren der Angiogenese herunter. Die Balance von positiven und negativen Angiogeneseregulatoren wird empfindlich gestört (Plate et al., 1993; Hanahan und Folkman, 1996; Ribatti et al., 2006;). Der Unterschied zu anderen Formen der Angiogenese ist die fehlende Limitation. Einmal begonnen läuft diese Form der Angiogenese immer weiter (Ribatti et al., 1999). In Modellen der Tumorangiogenese wurde dabei einerseits ein Aussprossen neuer Kapillaren aus Gefäßen der Umgebung, sowie andererseits die Einwanderung von Endothelzellen in den Tumor und Gefäßneubildung beobachtet (Goldbrunner et al., 1999; Yancopoulos et al., 2000). Die beteiligten Endothelzellen produzieren ebenfalls Wachstumsfaktoren mit parakrinem Effekt auf die Tumorzellen (Ribatti et al. 2006), sowie extrazelluläre Matrix zum Wachstum der Tumorzellen (Nicosia et al. 1986). In einigen Experimenten degenerierten die Endothelzellen und wurden durch neoplastische Zellen ersetzt, so dass die neu entstandenen Gefäße teilweise durch Tumorzellen ausgekleidet waren (Nicosia et al., 1986). Durch diese tumor-getriggerte Angiogenese können sich letztendlich der Tumor vergrößern und die Zellen bei Zugang zum Gefäßsystem auch metastasieren.

1.3 Gliome

Gliome sind primäre Hirntumoren. Sie gehören zu den neuroepithelialen Tumoren, die aus den Gliomen, neuronalen Tumoren, glioneuronalen Mischtumoren, Pinealistumoren und embryonalen zentralen Nervensystem (ZNS)-Tumoren bestehen (Riede et al., 2004). Gliome sind dabei die am häufigsten vorkommenden Hirntumore des Erwachsenen. Sie besitzen ein hoch invasives Wachstum und eine ausgeprägte Tumorangiogenese, welches die chirurgische Therapie oft ineffektiv macht (Mentlein und Held-Feindt, 2003).

Gliome entstammen von neuroepithelialen Zellen, den Astrozyten und ihren Vorläufern. Die astrozytären Gliome sind die häufigsten Hirntumoren. An Markern exprimieren sie Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) und S-100-Protein. Sie wachsen entweder fokal-umschrieben (häufig im Kindesalter) oder diffus infiltrierend. Dabei wachsen sie entlang der Marklagerbahnen und verbreiten sich so in weit entfernte Hirnareale. Frontal- und Temporallappen sind die häufigsten Lokalisationen. Die Welt-Gesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) teilt sie weiterhin in WHO I-IV° ein (Berlit, 2006). Mit zunehmendem Grad, nimmt auch die Malignität und das diffuse Wachstum der Tumoren zu. Bis auf das pilozystische Astrozytom (WHO I°), das gut abgrenzbar und häufig zystisch ist,

wachsen das diffuse Astrozytom (WHO II°), das anaplastische Astrozytom (WHO III°), sowie das Glioblastom (WHO IV°) diffus infiltrierend (Berlit, 2006).

1.4 Angiogenese bei Gliomen

Mit steigender Malignität der Gliome scheinen sich verschiedene Chromosomen-Aberrationen anzuhäufen. Die Folge sind Überexpression oder Mutation von Rezeptoren und Faktoren, die den Zellzyklus regulieren. Zusammen fördern sie über autokrine oder parakrine Stimulation das Wachstum des Tumors (Sehgal, 1998). Vor allem PDGF wird in allen Astrozytomen produziert. Es entstehen regelrechte autokrine Loops (Mentlein und Held-Feindt, 2003). Wie bereits dargestellt kommt es zusammen mit diesen Wachstumsfaktoren und Chemokinen auch zur Angiogenese. Dies wird ersichtlich, da Gefäßveränderungen v.a. in den höhergradigen Gliomen charakteristisch sind. Sie stellen sich als glomerulumartige Gefäßneubildungen mit unzureichend ausgebildeter Wandstruktur v.a. der Media dar (Berlit, 2006). Mit steigender Entdifferenzierung nimmt also auch die Gefäßneubildung zu. Die Gliome zeichnen sich daher durch ein schnelles Wachstum mit vielen Gefäßen und Nekrosen in weniger durchbluteten Regionen aus. Die Blut-Hirn-Schranke geht verloren (Mentlein und Held-Feindt, 2003). Aus diesem Grunde eignen sich Tumoren dieser Klasse gut als Modell für Untersuchungen der Tumorangiogenese.

In der Literatur wurde vermehrt eine Einwanderung von Monozyten/Makrophagen bzw. Mikroglia in Tumoren (Nesbit et al., 2001; Kuroda et al., 2005), insbesondere Gliome beschrieben (Leung et al., 1997; Nishie et al., 1999; Platten et al., 2003). Monozyten oder die im Gewebe vorkommenden Makrophagen sind Teil des unspezifischen Immunsystems. Entsteht nun eine Neoplasie, reagieren Makrophagen/Monozyten des den Tumor umgebenden Gewebes zunächst im Sinne der Immunabwehr, indem sie Chemokine und andere Faktoren zur Abwehr der Tumorzellen ausschütten. Dies bewirkt u.a. die Chemotaxis weiterer mononukleärer Zellen und T-Lymphozyten (Siegenthaler, 2001). Es wird jedoch angenommen, dass auch die Gliomzellen von den ausgeschütteten Wachstumsfaktoren profitieren, während sie den zytoxischen Effekt der Makrophagen überwinden (Leung et al., 1997). Manche Autoren vermuten sogar einen proliferativen Effekt der Gliomzellen auf die Makrophagen (Badie und Schartner, 2001). Zusätzlich zu der Koinzidenz zwischen Tumorwachstum und Monozyteninfiltration wurde auch eine Beziehung zur Tumorvaskularisation gesehen. Tumoren mit erhöhtem Monozytenaufkommen besitzen

gleichzeitig eine höhere Gefäßdichte (Platten et al., 2003; Kuroda et al., 2005). Daher wird Makrophagen eine Schlüsselfunktion bei der Tumorangiogenese zugeschrieben. Dies beruht auf eben dem Repertoire von Wachstumsfaktoren, die Makrophagen/Monozyten bei Entzündungsreaktionen und als Antwort auf Tumoren freisetzen (Sunderkötter et al., 1991, 1994). Polverini und Leibovich (1984) konnten diesbezüglich die angiogene Potenz von aktivierten und Tumor-assoziierten Makrophagen und dem von ihnen konditionierten Zellkulturmedium zeigen (Polverini, 1977; Polverini und Leibovich, 1984). In Tumoren des ZNS konnte MCP-1, ein Chemokin für Monozyten, positiv korrelierend zur Anzahl der Monozyten nachgewiesen werden. Eine positive Beeinflussung der Tumorangiogenese bei Gliomen durch MCP-1 und Makrophagen/Monozyten wird daher diskutiert (Leung et al., 1997; Badie und Schartner, 2001; Platten et al., 2003).

1.5 Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1)

MCP-1 wurde erstmals vor ca. 20 Jahren isoliert. Humanes MCP-1, auch „Monocyte chemotactic and activating factor (MCAF)“ genannt, wurde erstmals 1989 aus Tumorzellen und monozytären Blutzellen isoliert (Yoshimura et al., 1989; Matsushima et al., 1989; Rollins, 1997). In späteren Experimenten wurde ein Einfluss von MCP-1 auf die Angiogenese, insbesondere das Tumorwachstum und die Tumorangiogenese beobachtet (Salcedo, 2000, Nesbit et al., 2001; Platten et al., 2003). MCP-1 gehört zu den Chemokinen. Synonyme sind Chemokin (C-C motif) Ligand 2 (CCL2), MCAF, Monocyte secretory protein JE und Small inducible cytokine A2 (SCYA2). In den 90er Jahren wurde erstmals das Interesse an Chemokinen geweckt, da man ihre große Rolle bei der Kontrolle von Leukozytenfunktionen entdeckte. Ihre hauptsächliche Funktion besteht darin, verschiedene Leukozyten zu aktivieren und anzulocken. Heutzutage wissen wir, dass auch nicht-hämatopoetische Zellen Chemokinrezeptoren exprimieren, so dass sich ihre Funktionen nicht auf Leukozyten beschränken (Rollins, 1997).

Man unterscheidet ca. 50 Chemokine. Es handelt sich um sehr kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht zwischen 8 bis 12 kD. Ihre Struktur wird durch vier stabile Cystein-Aminosäuren bestimmt. Aufgrund dieser werden die Chemokine in zwei Subfamilien unterteilt. Die Subfamilie der CXC-Chemokine zeichnet sich dadurch aus, dass zwei aminoterminale Cysteine durch eine einzelne andere Aminosäure getrennt werden, während sie bei den CC-Chemokinen zusammen liegen (Rollins, 1997; Hahn et al., 2001). Aufgrund

der sehr ähnlichen Primärstruktur der Chemokine, besitzen die Proteine auch stark konservierte Sekundär- und Tertiärstrukturen. Fast alle sind Dimere aus je einer α-Helix am Carboxylende des Proteins und mehreren β-Faltblättern, wobei sich die vier Cysteine am N-terminalen Ende befinden (Gronenborn und Clore, 1991; Zhang YJ et al., 1994; Rollins, 1997). Die Lokalisation der humanen Chemokine im Genom ist bekannt. Die Gene der CC-Chemokine liegen auf 17q11.2-12 und die CXC-Chemokingene befinden sich auf 4q13. Vermutlich entstehen viele Chemokine durch alternatives Splicing dieser Gene (Rollins, 1997). Die Funktionen der Chemokine sind noch nicht hinreichend geklärt, da *in-vitro* Ergebnisse nicht immer mit *in-vivo*-Bedingungen übereinstimmen müssen (Rollins, 1997; Safari et al., 1997). Jedoch scheinen CC-Chemokine hauptsächlich Monozyten zu stimulieren, während CXC-Chemokine stärker auf neutrophile Granulozyten wirken. RANTES (CCL5) und MCP-1 (CCL2) stellen typische Vertreter der CC-Chemokine dar. IL-8 ist ein charakteristisches CXC-Chemokin (Hahn et al., 2001).

Wie bereits erwähnt, locken CC-Chemokine vorwiegend Monozyten an. Experimente mit Knockout-Mäusen für das MCP-1-Gen zeigen, dass MCP-1 sogar essentiell für die Rekrutierung von Monozyten ist. Auch andere CC-Chemokine z.B. MCP-2, -3, -4, -5 und das Macrophage Inflammatory Protein (MIP) rekrutieren Monozyten. MCP-1 hat jedoch die höchste Affinität zu diesen Zellen (Yoshimura und Leonard, 1990; Gunn et al., 1997; Lu et al., 1998). Monozyten exprimieren mindestens drei Rezeptoren für die Bindung der CC-Chemokine: CCR1, CCR2 und CCR5. Davon bindet MCP-1 mit der höchsten Affinität an CCR2 und wirkt dadurch chemotaktisch auf Monozyten (Franci et al. 1995; Lu et al., 1998; Han et al., 2004). Alle Rezeptoren gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten 7-Transmembranrezeptoren. Durch die Bindung von Chemokinen wird in den Monozyten intrazellulär Kalzium freigesetzt und so eine Aktivierung und Chemotaxis über bestimmte Signalwege erzeugt (Safari et al., 1997). Monozyten zirkulieren normalerweise als nicht-adhärente Zellen im Blut. Wenn sie aktiviert oder angelockt werden, werden sie adhärent, migrieren in das Gewebe und phagozytieren z.B. Entzündungserreger bzw. sezernieren weitere Chemokine zur Regulierung der Entzündungsreaktion (Jiang et al., 1992). Im Rahmen seines Einflusses auf Monozyten kann MCP-1 auch eine Progression der Arteriosklerose bewirken. Hierbei schütten wahrscheinlich geschädigte Endothelzellen der Gefäßwand u.a. MCP-1 aus und der chronisch inflammatorische Prozess der Arteriosklerose wird durch weitere Monozytenrekrutierung gesteigert. Dabei lagern sich die Monozyten in die Intima der

Gefäße ein und fördern die Vergrößerung der Plaque (Ross, 1993; Boring et al., 1998; Ni et al., 2001; Namiki et al., 2002).

Weiterhin gibt es Hinweise auf ein Mitwirken von MCP-1 bei der Wundheilung und der entzündlichen Aktivierung des Gefäßendothels. Dabei wird vermutet, dass das Endothel an den Wundrändern durch MCP-1 zur Migration in das Wundgebiet und Neubildung von Gefäßen angeregt wird (Weber et al., 1999). Die angiogene Wirkung von MCP-1 ist jedoch umstritten. Bisherige Forschungen lassen den Schluss zu, dass MCP-1 die Angiogenese und sogar Arteriogenese fördert (Muhs et al., 2004; Hoefer et al., 2005). Dazu wurde an Kaninchenextremitäten nach Herstellen einer Ischämie Arteriogenese durch lokale Zufuhr von MCP-1 beobachtet (Ito et al., 1997; Hoefer et al., 2001; Schirmer et al., 2004). Die Induktion der Angiogenese durch MCP-1 wurde v.a. an Tumormodellen untersucht. Der Mechanismus ist dabei noch nicht geklärt. Einige Experimente scheinen den bekannten indirekten Mechanismus über eine Monozyten- bzw. Makrophagenrekrutierung zu belegen (Arras et al., 1998; Goede et al., 1999; Ueno et al., 2000; Kuroda et al., 2005). Andere weisen auf eine direkte Wirkung von MCP-1 auf die glatte Muskulatur oder das Endothel hin (Denger et al., 1997; Salcedo et al., 2000; Hong et al., 2005). Auffällig und allen Versuchen gemein waren die Beobachtung, dass MCP-1 das Tumorwachstum begünstigt. Dabei wurden sowohl erhöhte Monozyteninfiltrationen, als auch eine vermehrte Angiogenese beobachtet (Salcedo et al., 2000; Nesbit et al., 2001; Platten et al., 2003).

1.6 Die Chorioallantoismembran (CAM)

Der Embryo vom Huhn (*Gallus gallus domesticus*) wird aufgrund der einfachen Handhabung der Eier und der guten Beobachtungsmöglichkeit von Zellen und Geweben sehr gern als Modellsystem in der Wirbeltierembryologie genutzt. Die enge phylogenetische Verwandtschaft mit der Japanischen Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) und ihre ähnliche Embryonalentwicklung erweitert dieses Modellsystem. Durch Chimärenbildung konnten die Angiogenese und Hämatopoese untersucht werden, da sich die dunklen Nucleoli der Wachtelzellen selektiv darstellen lassen (Pardanaud et al., 1989, Caprioli et al., 1998, 2001; Pudliszewski und Pardanaud, 2005).

Die Chorioallantoismembran (CAM) als extraembryonales Organ ist dabei ein leicht zugängliches, dicht vaskularisiertes Organ im Hühnerei (Ausprunk et al., 1974; Oh et al.,

1997). Sie entsteht am 4. Entwicklungstag und stellt eine Fusion der drei Keimblätter durch Verbindung von Chorion und Allantois dar. Am 3.-4. Tag bildet sich die schlauchförmige Allantois als eine Ausstülpung des Entoderms. Sie entstammt dem embryonalen Enddarm und besitzt einen Mesodermüberzug. Die Allantois wächst als Bläschen in die Chorionhöhle ein, um schließlich am 4. bis 5. Entwicklungstag mit einem Teil des Chorions zur Chorioallantoismembran (CAM) zu verschmelzen. Das Chorion besteht aus einem mesodermalen Anteil und einem Teil des Ektoderms als drittem Keimblatt. Beide Mesodermanteile bilden zwischen Ento- und Ektoderm eine vaskularisierte bindegewebige Schicht (Leeson und Leeson, 1963; Hamilton, 1965; Caprioli et al., 1998). Das in der CAM innen liegende, in unmittelbarer Nachbarschaft zum Mesoderm gelegene Entoderm, induziert dabei wahrscheinlich die Gefäßentstehung im Mesoderm (Flamme et al., 1997; Caprioli et al., 1998, 2001). Die CAM ist dann bereits am 4. Entwicklungstag stark vaskularisiert (Ausprunk et al., 1974; Wilting et al., 1991). Sie liegt dabei direkt der Eischale an und dient mit ihrer großen Oberfläche und kleinen Gefäßen dem Embryo als respiratorisches Organ und als embryonale Harnblase (Leeson und Leeson, 1963; Hamilton, 1965). Ihr Gefäßsystem ist sehr übersichtlich. Während sich die größeren Gefäße im Mesoderm befinden, liegt das äußere Kapillarsystem sehr oberflächlich, lediglich von einer dünnen Schicht Ektoderm bedeckt (Ausprunk et al., 1974). Das äußere Kapillarsystem ist sehr dicht und ähnelt dabei bei gleicher Funktion stark dem der Lunge der Wirbeltiere. Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich die CAM sehr gut für die Applikation von Fremdkörpern oder Fremdgeweben zur Beeinflussung bzw. Induktion der Angiogenese bei gleichzeitig guter Beobachtungsmöglichkeit.

Die CAM wächst in den ersten Tagen sehr schnell und bedeckt den Embryo und den größten Teil des Dottersacks etwa ab dem 12. Entwicklungstag (Hamilton, 1965). Beobachtungen zeigen, dass die Endothelzellen bis zum 11. Tag noch nicht völlig ausgereift sind und noch stark proliferieren (Ausprunk et al., 1974). Schlussfolgernd erscheint es sinnvoll einen Fremdkörper, der an der Angiogenese teilhaben soll, vor dem 11. Tag auf die CAM zu bringen. Ab dem 12. Tag sind die Gefäße ausgereift und proliferieren kaum noch (Ausprunk et al., 1974). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die CAM erst ab Tag 13 geeignet ist, Effekte exogen applizierter Wachstumsfaktoren nachzuweisen (Wilting et al., 1991; Wilting et al., 1992).

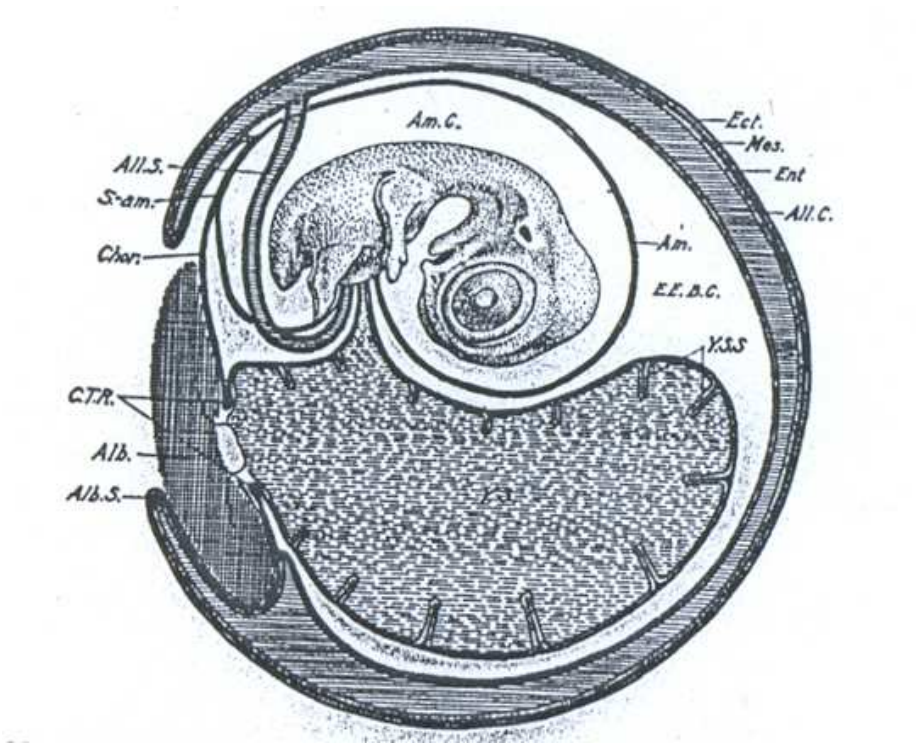


Abb. 1: Hühnerembryo am 9. Tag der Entwicklung. Die Allantois ist mit dem Chorion verschmolzen und die Chorio-Allantois-Membran hat sich bereits ausgebreitet und um den Embryo gelegt. Alb.S. = Albumen sac., All. = Allantois, All.C. = Höhle der Allantois, All. S. = Stalk of Allantois, Am. = Amnion, Am.C. = Amnionhöhle, Chor. = Chorion, Ect. = Ectoderm, Ent. = Entoderm, Mes. = Mesoderm, Y.S. = Dottersack. (aus: Hamilton, 1965, Seite 275)

1.7 Ziel der Arbeit

Kürzlich an Mäusen durchgeführte Experimente haben gezeigt, dass Gliomzellen mit vermehrter MCP-1-Produktion die Infiltration des Tumors mit Mikroglia erhöhen. Ebenfalls besteht im Vergleich mit Kontrollzellen ein stärkeres Tumorwachstum und eine verkürzte Überlebensrate der Mäuse, woraus auf eine Erhöhung der Aggressivität dieser Tumoren geschlossen werden kann. Zusätzlich zeigte sich bei diesen Tumoren eine erhöhte Dichte von Gefäßen (Platten et al., 2003). Auch dies kann bei Berücksichtigung der Tatsache, dass in höherem Grade maligne Gliome des Menschen auch meist stärker vaskularisiert sind, eine Erhöhung der Aggressivität bedeuten.

Ich stellte mir daher die Frage, ob diese Ergebnisse im Vogelmodell reproduzierbar sind und das Hühnereimodell als Alternative zum Tierversuch genutzt werden kann. Dies war zu vermuten, da es eine phylogenetische Verwandtschaft und ähnliche embryonale Entwicklung

bei den Amnionten gibt. Ob Chemokine wie MCP-1 über Speziesgrenzen hinweg wirksam sind und welche Zellen durch MCP-1 beeinflusst werden, sollte auf diese Weise untersucht werden.

In anderen Publikationen wurden Zusammenhänge zwischen dem Einwirken von MCP-1 auf Monozyten und der Angiogenese beobachtet. Bisher wird von einer chemotaktischen Wirkung des MCP-1 auf Monozyten ausgegangen, die dann eine angiogene Wirkung ausüben sollen (Arras et al., 1998; Kuroda et al., 2005). In den bisherigen Studien fiel auf, dass vermehrt Zellen mit glattem Muskelaktin im Tumor und um die dort existierenden Gefäße vorhanden sind (Wesseling et al., 1995; Platten et al., 2003). Daher habe ich die Frage untersucht, ob MCP-1 direkt auf diese Stromazellen, bei denen es sich um Myofibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen oder Monozyten handelt, oder auf Gliomzellen wirkt.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Zentrifugen:	Kühlzentrifuge, Centrifuge 5810R (Eppendorf, Amstetten, Deutschland)
	Zentrifuge 5417R (Eppendorf, Amstetten, Deutschland)
Mikroskope:	Immunfluoreszenzmikroskop (Leica DM 5000 B, Bensheim, Deutschland)
	Stereo-Fluoreszenzmikroskop (Leica MZFL III Fluo-combi, Bensheim, Deutschland)
	Stereomikroskop MZ 6 (Leica, Bensheim, Deutschland)
Schüttler:	Vibrax (Serono Diagnostics, Genève, Schweiz)
Sonstige:	Abzug (Köttermann, Uetze/ Hänigsen, Deutschland)
	Brutschrank BSS 420 (Ehret, Emmendingen, Deutschland)
	Dispensette (Brand, Wertheim, Deutschland)
	Feuchte Kammer (Uniklinikum, Göttingen, Deutschland)
	Fluoreszenzlampe (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Deutschland)
	Gefrierschrank Liebherr (Liebherr Hausgeräte, Ochsenhausen, Deutschland)
	Glasküvetten (Heinemann, Göttingen, Deutschland)
	Heater MR 3001 (Heidolph-Instruments, Schwabach, Deutschland)
	Kamera Leica DC 300 FC (Leica Microsystems DI Cambridge (B1), Großbritannien)
	Kryostat (Leica CM 30505, Bensheim, Deutschland)
	Kühlschrank Liebherr (Liebherr Hausgeräte, Ochsenhausen, Deutschland)
	Microtom (Leica RM 2165, Bensheim, Deutschland)
	Ultracut (Diatome Ltd., Biel/Bienne, Schweiz)
	Multipipette (Eppendorf, Amstetten Deutschland)
	Pipettus (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland)
	Physio Care Pipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
	Präparationsbesteck (Aesculap, Tuttlingen, Göttingen)

Sequence Detection System 7500HT (Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland)
Sterilbank (SterilGard III Advance°, The Baker Company, Sanford, USA)
Thermomax Microplate Reader (MWG-Biotech, Milton Keynes, UK)
T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland)
Waage excellence (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Wärmeschrank Memmert (Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland)
Wärmeplatte HI 1220 (Leica, Bensheim, Deutschland)
Z1 Coulter Particle Counter (Beckman Coulter TM, Krefeld, Deutschland)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Cryo Tube	(Nunc, Roskilde, Denmark)
Deckgläser 24x48mm	(Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)
Einmalhandschuhe	(Hartmann, Heidenheim, Deuschland)
Leukosilk	
Kabelbinder	(Legrand, Frankreich)
Mediumkulturflaschen 75cm²	(Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)
Mediumkulturflaschen 175cm²	(Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)
Mikrotiterplatte	
Nunc Thermanox Scheiben	(Nunc, Rochester, NY, USA)
Superfrost-Objektträger	(Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)
Rollrandgläschen	(Schütt, Göttingen, Deutschland)
Zellkulturschalen	(Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
Pasteurpipetten	(Brand, Wertheim, Deutschland)
Plastik-Einbettformen	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Serologische Pipetten 5/10 ml	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Spritzen, 20 ml	
Sterile Kompressen	(Besel, Barsbüttel, Deutschland)
Wegehähne	(Discofix - Braun, Melsung, Deutschland)

96er Well Platten	(Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	(Cellstar, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	(Cellstar, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)

2.3 Chemikalien

Accelerator 1,8% DMP-30	(Serva, Heidelberg, Deutschland)
Albumin bovine Fraction V	(Serva, Heidelberg, Deutschland, Art. Nr. 11926)
Aluminiumsulfat	(Fluca, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Aqua ad iniectabila 10ml	(Braun, Melsungen, Deutschland)
Azur	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Borax (Natriumtetraborat)	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Calciumchlorid-Dihydrid	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Cacodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat	(Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 5169.2)
DAB (Diaminobenzidin)	(Dako Cytomation Gmbh, Glostrup, Dänemark)
DDSA (Dodecenyl Succinic Anhydride)	(Serva, Heidelberg, Deutschland)
Eisessig	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Eosin (C.I. 45380)	(Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 7089.1)
Ethanol 99% (vergällt MEK 1 %)	(GeReS GmbH, Einbeck, Deutschland)
Epon (Glycidether)	(Serva, Heidelberg, Deutschland)
Formaldehyd 37%	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Formaldehydlösung 37%	(Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland)
Glutaraldehyd 25%	(Serva, Heidelberg, Deutschland)
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	(Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. T865.1)
Isopropanol	(Zentralapotheke Uniklinikum Göttingen)
Kaliumchlorid	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Kernechtrot (C.I. 60760)	(Division Chroma, Waldeck GmbH & Co, Münster, Deutschland)
Kristallviolett (C.I. 42555 Indikator)	(Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. T123.1)
Methanol 99%	(Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 4627.2)
Methylenblau	(Merck, Darmstadt, Deutschland)

MNA (Methyl Nadic Anhydride)	(Serva, Heidleberg, Deutschland)
Natriumchlorid	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Paraformaldehyd	(Fluka, Buchs, Deutschland)
Phosphatpuffer	
Propylenoxid	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
OsO_4 (Osmiumtetraoxid)	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Rotihistol	(Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 6640.1)
Salzsäure (HCl) 32%	(Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. P074,3)
Saccharose	(BRL, Gaithersburg, England)
Trichloressigsäure	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Tissue Tek	Einbettmedium für Gefrierschnitte (Sakura Finetek Europe B.V., Niederlande)
Tween 20	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Tris X (Trishydroxymethyl) – aminomethan	(Gerbu, Gaiberg, Deutschland, Art. Nr. 1018)
Wasserstoffperoxid	(Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 80702)

2.4 Molekularbiologische Materialien

Qiagen Omniscript	(Qiagen, Hilden, Deutschland, Art. Nr.205113)
RNeasy Mini Kit (250)	(Qiagen, Hilden, Deutschland, Art. Nr. 74106)
SYBR Green Jump Start™	(Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland, Art. Nr. Y8337)
Taq Ready Mix™ for Quantitative PCR	(Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland, Art. Nr. Y8337)
MCAF (Recombinant human MCP-1)	(Reliatech GmbH Braunschweig, Deutschland)

2.5 Zellkultur

2.5.1 Reagenzien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 (DMEM)	(Cambrex Bio Science Verviers, Belgien)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	(Cambrex Bio Science Verviers,

-0,0095 M(PO^4) (DPBS)	Belgien)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma, St. Louis, Missouri, USA)
Endothelial Cell Basal Medium-2 (EBM-2)	(Cambrex Bio Science Walkersville, MD, USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	(Biochrome AG, Berlin, Deutschland)
G 418 (50mg/ml)	(PAA, Pasching, Österreich)
Pen-Strep (5000U/ml/5000µg/ml)	(Cambrex Bio Science Verviers, Belgien)
RPMI 1640 mit L-Glutamine (entwickelt im Rosswell Park Memorial Institut)	(Cambrex Bio Science Verviers, Belgien)
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 (SMC – 2)	(Promo Cell, Heidelberg, Deutschland, Kat. Nr. C-22062)
Trypsin	(Cambrex Bio Science Verviers, Belgien)

2.5.2 Zelllinien

CNS-1-rMCP-1-Zellen	(Gliom Zelllinie überlassen von M. Platten vom Labor für
CNS-1-pcDNA-Zellen	Molekulare Neuroonkologie und Neuroregeneration, Abteilung Neurologie der Universität Tübingen, Deutschland)
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Isolation aus Nabelschnüren)
HPA-SMC	Humane pulmonale arterielle glatte Muskelzellen (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland)

2.5.3 Zellkultur von CNS-1-Zellen

Bei CNS-1-Zellen handelt es sich um eine Gliomzelllinie, die im ZNS von Ratten durch N-nitroso-methylurea induziert wurden. Sie wachsen ähnlich wie humane Gliome stark invasiv, reagieren mit GFAP, S100-Protein und produzieren u.a. MCP-1 (COPE, 2009a). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% Kohlendioxid (CO_2) in Mediumkulturflaschen mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) in DMEM kultiviert. FCS enthält verschiedene

Proteine und Wachstumsfaktoren und dient zur Ernährung der Zellen in Kultur. DMEM stellt ein herkömmliches Zellkulturmedium mit bestimmten Wachstumsfaktoren dar. Pen/Strep sind zwei gängige Antibiotika, die einer Verunreinigung des Mediums mit Bakterien vorbeugen sollen. Ich habe die Zellen bis zu einer Dichte von 80-90% wachsen lassen und sie dann 1:3 bzw. 1:5 gesplittet. Dabei wurde das Medium abgesaugt und dann 2mal mit DPBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1-2ml Trypsinlösung in ca. 2min gelöst. Die Reaktion wurde mit der doppelten Menge Medium abgestoppt und die Zellen in 15ml Falkons bei Raumtemperatur 5min mit ca. 1000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in Medium gelöst, dem Splittungsverhältnis entsprechend geteilt und auf neue Mediumkulturflaschen mit ca. 10ml Medium ausplattiert.

2.5.4 Lagerung von CNS-1 und HPA-SMCs

Die Zellen wurden bei längerer Lagerung zwischen den Experimenten in Kryoröhrchen eingefroren aufbewahrt. Dazu wurden die Zellen nach bekanntem Prozedere abtrypsiniert und das Pellet dann in 45% FCS, 45% DMEM bzw. SMC-Medium und 10% DMSO gelöst und sofort in einer Einfrierbox mit Isopropanol bei -80°C eingefroren. DMSO ist ein dipolares Lösungsmittel, das bei der Kryokonservierung als Gefrierschutzmittel wirkt. Am Tag danach wurden die Zellen z.T. in einen Stickstofftank transferiert.

2.5.5 Isolierung von „Human Umbilical Vein Endothelial Cells“ und Zellkultur

Dispase II	Roche, Basel, Schweiz (Art. Nr. 10165 859 001)
	5g in 1,6l Bidest Wasser
Hanks BSS 1x	PAA, Pasching, Deutschland (Art. Nr. H15009)

Die Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) wurden frisch aus Nabelschnüren von Kindern, die im Uniklinikum Göttingen geboren wurden, gewonnen. Zuerst wurde vorsichtig das Blut entfernt, dann in die Vene der Nabelschnur eine Kanüle eingeführt und mit Kabelbinder fixiert. An der Kanüle wurde ein Dreiwegehahn befestigt und die Nabelschnur mit 10-15ml Hanks gespült. Das Vorgehen wurde am anderen Ende wiederholt. Die Nabelschnurvene wurde nun mit Dispase, einem Enzym zur Lösung der Endothelzellen von der Matrix, befüllt und bei 37°C für 30min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Nabelschnur noch einmal mit Dispase gespült und wieder mit Hanks befüllt. Durch vorsichtige Massage der Nabelschnur lösten sich die Endothelzellen, die dann mit der Flüssigkeit in ein Zentrifugenröhrchen gespült wurden. Zum Abschluss wurde mit 1000rpm

für 5min bei RT zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in Kulturmedium für Endothelzellen (EBM-2) resuspendiert und auf mit 0,5% Gelatine beschichteten Platten ausplattiert. Dabei wurden die HUVECs in den Kulturschalen mit 7-9ml Medium bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert, bis sie subkonfluent waren (Abb.2).

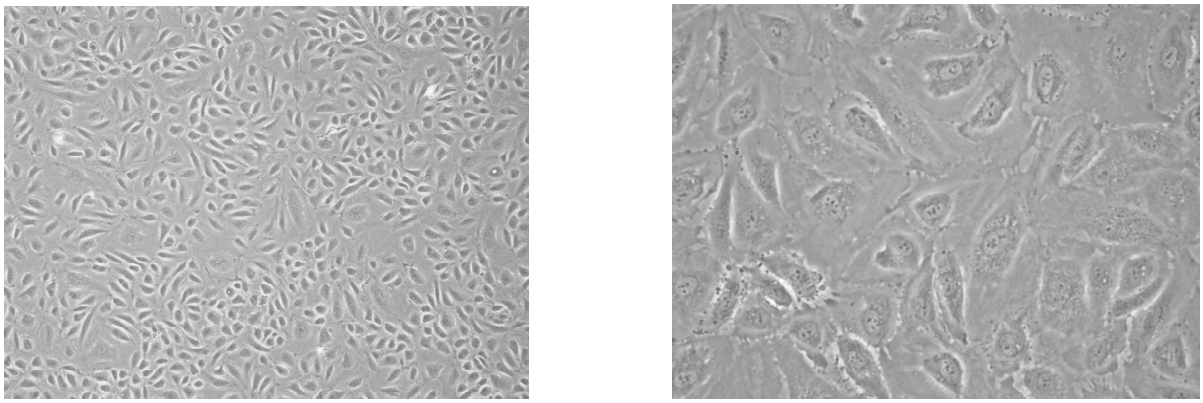


Abb. 2: HUVECs in Zellkultur (10-fache Objektivvergrößerung links, 40-fache Objektivvergrößerung rechts).

2.5.6 Zellkultur von "Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells" (HPA-SMCs)

Die glatten Muskelzellen wurden, wie bereits beschrieben, in Stickstoff eingefroren gelagert und so geliefert. Ich habe sie aufgetaut, in 1-2ml SMC-Medium gegeben und bei 1000rpm für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde in Medium gelöst und dann in eine kleine Kulturflasche mit 7-9ml Medium gegeben. Dort sind sie bei 37°C und 5% CO_2 bis zu einer Dichte von ca. 90% gewachsen. Sie wurden dann nach der von den anderen Zelllinien bekannten Prozedur abtrypsiniert und auf eine mittlere Kulturschale gegeben. Auch hier wuchsen sie mit 8-10ml Medium bis zu einer Dichte von 80-90% heran und wurden dann für die Versuche verwendet (Abb. 3).

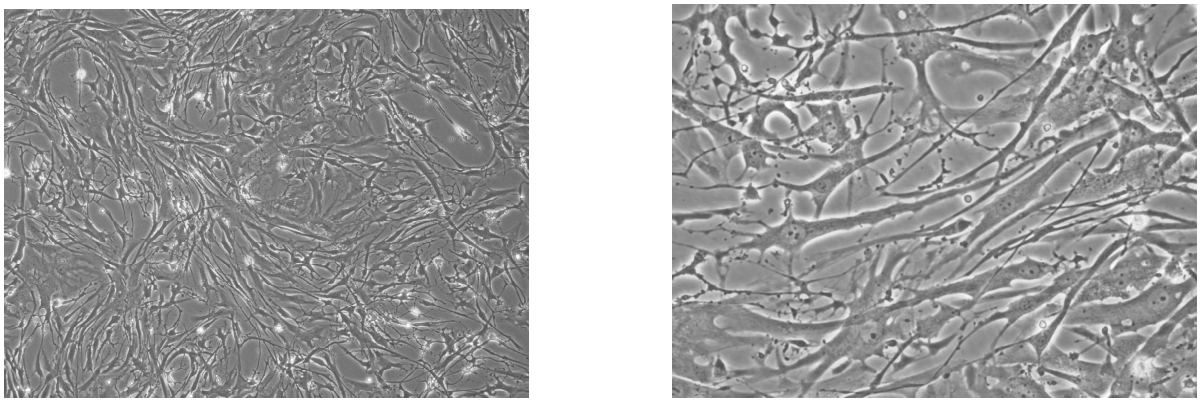


Abb. 3: HPA SMCs in Zellkultur (10-fache Objektivvergrößerung links, 40-fache Objektivvergrößerung rechts).

2.6 Chorioallantoismembran-Assay

2.6.1 Standardlösungen

Lockelösung:	94,27g NaCl in 1000ml H_2O
	12,0255g KCl in 1000ml H_2O
	15,8092g $CaCl_2$ in 1000ml H_2O
	100ml NaCl-Lös., 37ml KCl, 21ml $CaCl_2$ in 1000ml Aqua dest.
	10% NaCl, 3,7% KCl, 2,1% $CaCl_2$, 1% Pen/Strep
Ethanol 70%	30% Aqua dest., 70% von Ethanol 99%
Serra	2/3 Ethanol 99%, 1/3 Formalin 37%
Ethanol/Eisessig	97% vom 99% Ethanol, 3% Eisessig
Glutaraldehyd/Formaldehyd	3% von 25% Glutaraldehyd, 2% Formaldehyd, 0,12M Na-Cacodylat, pH 7,2
PFA 4%	

2.6.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden frisch gelegte Hühner- und Wachteleier von örtlichen Züchtern verwendet. Die Hühner (*Gallus gallus domesticus*) gehörten zu der Rasse ‚Weißes Leghorn'. Die Japanische Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) besitzt eine sehr enge phylogenetische Verwandtschaft zum Huhn und damit eine sehr ähnliche Embryonalentwicklung. Dies erlaubte es mir diese Spezies auch für meine Versuche zu verwenden und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Dabei wurden die beiden Spezies in einem Stadium der Ausbildung der Chorioallantoismembran bis maximal Tag 17 (Huhn) bzw. 14 (Wachtel) der Embryonalentwicklung verwendet.

2.6.3 Hühnereier-CAM-Assay

Die Hühnereier wurden bei 70-90% Luftfeuchtigkeit und 37°C im Brutschrank bis Tag drei inkubiert. Dann wurden die Eier mit 70% Ethanol desinfiziert und vorsichtig gefenstert. Dabei wurde zuerst die Luftkammer eröffnet und dann die Eischale über dem Embryo durch Sägen eines Fensters entfernt. Mit ein paar Tropfen Lockelösung wurde dabei das Ei vor Austrocknung bewahrt. Nun habe ich stumpf die Eihaut eröffnet, damit sich der Embryo weiter absenkt und sie dann entfernt. Die Öffnung wurde wieder mit Leukosilk abgedichtet und die Eier weiter im Brutschrank bei 37% und 80-90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. An Tag

10 wurden die CNS-1 Zellen abtrypsiniert, abzentrifugiert und das Pellet in DMEM mit 10% FCS und 1% Pen/Strep gelöst. Die Zellmenge wurde im Cell Counter ermittelt, entsprechend in Medium gelöst und anschließend wurden $3x10^6$ Zellen in 30µl Medium in jedem Ei auf die CAM aufgetragen. Dazu wurde das Leukosilk vom Fenster entfernt und eine mit einem Loch versehene, verkleinerte Thermanox Scheibe auf die CAM aufgebracht. Die CAM wird an dieser Stelle leicht angeraut, um kleine Blutgefäße zu verletzen, damit ein Anwachsen der Tumorzellen gewährleistet war. Die Tumorzellen wurden dann dort auf die CAM aufgebracht, das Fenster wiederum mit Leukosilk verschlossen und weiter im Brutschrank inkubiert. An Tag 17 wurden dann die Tumoren in verschiedenen Lösungen fixiert und aus der CAM herauspräpariert. Dafür wurden die Fixanzien für einige Minuten auf das lebende Präparat gegeben und dann vorsichtig mit großem Sicherheitsabstand heraus geschnitten. Einige der Tumoren wurden für Makrofotos in Glutaraldehyd/Formaldehyd fixiert (siehe Abschnitt 2.6.6). Die anderen habe ich in Serra oder in Ethanol/Eisessig über Nacht fixiert und dann in Paraffin (Abschnitt 2.7.2) oder Epoxidharz (Abschnitt 2.7.7) eingebettet. Insgesamt wurden 64 Hühnereier verwendet. Davon starben 4 der Hühnerembryos vor dem Beimpfen mit den Gliomzellen ab. Für die Kontrollzellen wurden 29 Hühnereier und für die rMCP-1 transfizierten Gliomzellen ebenfalls 29 verwendet. Davon zeigte sich bei zwei der Eier mit den Kontrollzellen kein Tumorwachstum.

2.6.4 Wachteleier-CAM-Assay

Die Wachteleier wurden bei 70-90% Luftfeuchtigkeit und 37°C im Brutschrank bis Tag drei inkubiert, dann mit 70% Alkohol desinfiziert und gefenstert. Dabei wurde zuerst die Luftkammer vorsichtig eröffnet, die Eischale über dem Embryo durch leichtes Klopfen angebrochen und dann mit Pinzetten vorsichtig entfernt. Mit ein paar Tropfen Lockelösung wurde dabei das Ei vor Austrocknung bewahrt. Dann wurde stumpf die Eihaut eröffnet, damit sich der Embryo weiter absenkt, und dann entfernt. Die Öffnung wurde wieder mit Leukosilk abgedichtet und die Eier weiter im Brutschrank inkubiert. An Tag 8 erfolgte wie für die Hühnereier (Abschnitt 2.6.3) beschrieben die Beimpfung mit den Tumorzellen. An Tag 14 wurden dann die Tumoren aus der CAM herauspräpariert und über Nacht in Serra oder Ethanol/Eisessig fixiert und in Paraffin eingebettet (Abschnitt 2.7.2). Von den überlebenden Wachtelembryonen wurden je 4 mit den Kontrollzellen und rMCP-1-transfizierten Gliomzellen erfolgreich beimpft und es kam zum Tumorwachstum.

2.6.5 CAM-Assay mit rekombinantem humanen MCP-1

Die Hühnereier und Wachteleier wurden bei 70-90% Luftfeuchtigkeit und 37°C im Brutschrank bis Tag drei inkubiert. Dann erfolgte die Fensterung der Eier wie bereits in Abschnitten 2.6.3 und 2.6.4 beschrieben. Die Öffnung wurde wieder mit Leukosilk abgedichtet und die Eier weiter im Brutschrank inkubiert. Dann wurden 5 x 5µl Aqua dest., 5 x 2µg humanes MCP-1 und 3 x 3µg VEGF-A (als Positivkontrolle) in je 5µl Aqua dest. gelöst und auf ein Stück Thermanox Scheibe für eine Stunde bei Raumtemperatur zum Eintrocknen gegeben. Danach wurden die Scheiben direkt auf die CAM aufgebracht. In 3 Hühnereiern wurden sowohl MCP-1 als auch VEGF-A beschichtete Scheiben auf der CAM platziert. In 2 Wachteleiern wurden nur MCP-1 beschichtete Scheiben aufgebracht. Als Negativkontrollen wurden auf 5 Hühnereier Träger mit Aqua dest. gegeben. Um Trägereffekte auszuschließen erfolgte das Aufbringen bei den Wachteleiern an Tag 11 und bei den Hühnereiern an Tag 13. Dazu wurde das Leukosilk vom Fenster entfernt und die verkleinerte Thermanox Scheibe auf die CAM aufgebracht. Die Eier wurden wieder verschlossen und weiter im Brutschrank inkubiert. An Tag 14 (Wachtel) und Tag 16 (Huhn) wurden die Präparate für einige Minuten *in vivo* mit verschiedenen Lösungen fixiert und dann die Scheiben und die darunter liegende CAM herauspräpariert. Dann wurden die Präparate von der Thermanoxscheibe befreit, gespült und in Fixans gegeben. Die Hühnereier wurden für Makrofotos und Semidünnschnitte zunächst in Glutaraldehyd/Formaldehyd fixiert und später in Epoxidharz eingebettet. Die Wachteleier habe ich über Nacht in Ethanol/Eisessig fixiert und in Paraffin eingebettet.

2.6.6 Fixieren der Präparate für makroskopische Untersuchungen

Glutaraldehyd/ Formaldehyd (GAFA):

3% Glutaraldehyd (25%)

2% Formaldehyd

0,12M Na-Cacodylat (Cacodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat) (x 3 H_2O MW 214,03 – 12,84 g auf 500 ml Bidest.)

pH 7,2

Vor der Dissektion des Tumors wurde GAFA in die Luftkammer und auf den Tumor pipettiert, so dass alle Gewebe bedeckt waren und dann 15min inkubiert. Danach wird mit der Iridektomieschere großzügig um den Tumorbereich die Chorioallantoismembran mit Tumor herausgetrennt. Dabei sollte der Abstand relativ groß bemessen sein, damit das Blut im Tumorbereich erhalten bleibt. Der Tumor wurde in Na-Cacodylat-Puffer gegeben und unter

dem Stereomikroskop MZ 6 die Thermanox Scheibe entfernt. Das Präparat wurde noch einmal in Lockelösung gespült und dann in Na-Cacodylat-Puffer und Glutaraldehyd bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Es wurden Makrofotos mit Hilfe eines Stereo-Fluorenszenzmikroskops (Leica MZFL III Fluo-combi) und Kamera (Leica DC 300 FC) aufgenommen.

2.6.7 Bestimmung der Tumorgröße

Die Größe der CNS-1-pcDNA- und rMCP-1- (Ratten-MCP-1) Tumoren wurde durch die Verdrängung von Flüssigkeit bestimmt. Das dabei verdrängte Volumen wurde mittels sehr fein skalierten Einmalspritzen ermittelt und verglichen. Zunächst wurde das arithmetische Mittel für beide Tumorarten gebildet. Es errechnet sich als Summe über die Anzahl (n) der Beobachtungen geteilt durch n. Zusätzlich wurde die Standardabweichung der Messwerte ermittelt. Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Werte einer Zufallsvariablen X um ihren Mittelwert. Man bildet sie durch die positive Quadratwurzel aus der Varianz der Zufallsvariablen X. Die Varianz ist ebenfalls ein Streuungsmaß für die Abweichung einer Zufallsvariablen X von ihrem Erwartungswert E(X) (Wikipedia, 2009c). Hieraus wurde der Standardfehler des Mittelwertes (STE/SEM) errechnet. SME entspricht dabei der Standardabweichung dividiert durch die Wurzel aus der Anzahl n der Messwerte.

Um eine Signifikanz des Wachstumsunterschiedes zwischen CNS-1-pcDNA-Zellen und CNS-1-rMCP-1-Zellen festzustellen, wurden die Messwerte mit dem Programm Statistica der medizinischen Statistik als 2-faktorielle Anova analysiert. Hiermit konnte der p-Wert errechnet werden. Der p-Wert ist das Resultat eines statistischen Signifikanztests. Mit Hilfe eines Signifikanztestes können zuvor erhobene Hypothesen (Nullhypothese und Alternativhypothese) überprüft werden (Lange und Bender, 2001a). Ein häufig verwendeter Test der Signifikanz ist der Student-t-Test. Der t-Test bildet die Differenz zweier Stichprobenmittelwerte dividiert durch den Standardfehler dieser Differenz. Damit wird die gebildete Prüfgröße T normiert und anhand ihrer Wahrscheinlichkeitsverteilung charakterisiert. Das Ergebnis wird als p-Wert angegeben (Lange und Bender, 2001b). Der p-Wert ist nun die Wahrscheinlichkeit, dass bei Annahme einer wahren Nullhypothese, die Teststatistik den beobachteten Wert bzw. extremeren Wert annimmt. Das bedeutet, dass anhand des p-Wertes entschieden wird, ob beobachtete Unterschiede statistisch signifikant sind. Vorher wird noch eine maximale Irrtumswahrscheinlichkeit festgelegt (Signifikanzniveau). Diese soll den Fehler, die Nullhypothese abzulehnen, obwohl sie richtig

ist, begrenzen. Liegt der p-Wert nun unter dem festgelegten Signifikanzniveau α, so liegt eine statistische Signifikanz zum Niveau α vor und spricht gegen die Nullhypothese (Lange und Bender, 2001a). Als Nullhypothese habe ich eine Gleichheit im Wachstum der Tumoren (kein Effekt) gewählt, während als Alternativhypothese der Unterschied im Wachstum (Effekt) in Frage kam. Wir formulierten weiterhin eine zweiseitige Hypothese, indem wir einen positiven Effekt annahmen. Als Effektmaß wurden die gemessenen Tumorvolumina und deren Mittelwert ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0{,}05$ festgelegt. Somit ist ein Effekt, also Unterschied im Wachstum, bei einem p-Wert kleiner als 0,05 anzunehmen.

2.7 Histologie

2.7.1 Standardlösungen für die Histologie

4% PFA	
0,1M KPP:	0,2M Kalium-Phosphatpuffer: 1,088g KH_2PO_4 13,92g K_2HPO_4 ad 440ml Aqua bidest, pH 7,4-7,8
5%, 15% Saccharoselösung	
Lockelösung	siehe Abschnitt 2.6.3
Ethanol (97%)/ Eisessig (3%)	97% von 99% Ethanol, 3% von Eisessig
70%, 80%, 90%, 95% Ethanol	
Methanol/H_2O_2	200ml Methanol, 600µl H_2O_2
0,1M PBS pH 7,2:	Na_2HPO_4 14,8% KH_2PO_4 4,3% NaCl 72%
PBS/Tween 0,05%	
1% BSA	1% Bovines Serum in PBS gelöst
TrisHCl-Puffer/ Ammoniumsulfat/ H_2O_2/DAB:	TrisHCl-Puffer: 6,1g Tris (Trishydroxymethylaminomethan) in 50ml Aqua dest., 37ml einer 1N Salzsäure hinzufügen, mit Aqua dest. auf 1l auffüllen, pH 7,6 Ammoniumsulfat; H_2O_2 DAB: 3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid

Kernechtrot	0,1% Kernechtrot in Aluminiumsulfat 5%
Eosin	5g Eosin in 500ml Aqua dest., 5 Trpf. Eisessig
Antikörper:	anti-α-SMA–Antikörper
	Peroxidasekonjugierte Antikörper
Eindeckmedium:	DePex mounting medium (BDH, England)

2.7.2 Herstellung von Paraffinblöcken

Bei den präparierten Tumoren oder den behandelten Teilen der CAM wurde die Trägerscheibe und das überstehende Restgewebe entfernt. Dann wurden die Präparate sofort zur Fixierung in absolutem Ethanol (97%) und Eisessig (3%) oder in Serralösung über Nacht inkubiert. Anschließend wurden sie 1 x 30min und 1 x 20min in 99% Ethanol entwässert. Die Präparate kamen dann für 1 x 20min und 1 x 45min in Rotihistol. Danach wurden die Tumoren oder CAM-Stücke für 2-6h in Paraffin im Wärmeschrank bei 58°C gelagert. Abschließend wurden sie bei Raumtemperatur in Paraffin eingebettet und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.7.3 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur in das Mikrotom eingespannt und 8µm dicke Paraffinschnitte erstellt. Auf die bereits beschichteten Objektträger wurde Wasser gegeben, die Paraffinschnitte auf die Objektträger transferiert und auf der Wärmeplatte bei 41°C getrocknet. Dadurch konnte eine optimale Streckung und Ausrichtung der Schnitte erreicht werden. Nach dem Trocknen wurden sie im Wärmeschrank bei 37°C über Nacht belassen und anschließend in Objektträgerboxen im Kühlschrank bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.7.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten

Die HE (Hämatoxylin-Eosin)-Färbung basiert auf Oxidationen von Hämatoxylin zu dem blauen Farbstoff Hämatein, der mit Aluminiumionen positiv geladene Kernkomplexe bildet. Diese interagieren mit basophilen Strukturen, wie den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA im Zellkern, und färben diese blau. Im Gegensatz dazu werden azidophile Zell- und Gewebestrukturen wie das Zytoplasma und die Interzellularsubstanz rot angefärbt.

Die Objektträger wurden zur Entparaffinierung in einer Glasküvette je 4 x 3 min in Rotihistol getaucht, in einer absteigenden Ethanol-Reihe (100%; 100%; 96%; 70%; 50%; 30%) jeweils 2 min gespült und 3min in Aqua dest. überführt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte für 5min mit Hämalaun. Hinterher wurde unter fließendem Leitungswasser gespült, dann das Zytoplasma für 3min mit Eosin angefärbt und danach wieder mit fließendem Leitungswasser gespült. Die Präparatentwässerung wurde durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe (70%; 80%; 90%; 95%; 100%; 100%) erreicht. Zum Abschluss wurden die Schnitte wiederum 4 x 2min in Rotihistol inkubiert, die Objektträger mit DePex eingedeckelt und über Nacht unter dem Abzug getrocknet. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei Raumtemperatur.

2.7.5 Immunperoxidase-Kernechtrot-Färbung

Die Immunperoxidase-Färbung erfolgt durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Neben Antikörpern wird das Enzym Peroxidase verwendet. Mit der Peroxidase wird ein Präzipitat in Form eines Färbemoleküls produziert und markiert so die Stelle des Antigens, an den der Antikörper gebunden hat. Es gibt verschiedene Peroxidase-Färbemethoden. Ich habe die indirekte Methode mit einem Peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper Anti-Glatt-Muskel-α-Aktin (α-SMA) verwendet.

Zunächst wurden die Präparate 4 x 3min in Rotihistol entparaffiniert und dann 2 x 3min in 100% Ethanol gespült. Danach wurden die Objektträger 30min in Methanol/H_2O_2 inkubiert, um endogen produzierte Peroxidase zu neutralisieren. Die Präparate wurden kurz in Aqua dest. gespült. Danach wurden sie 5min in PBS/Tween 0,05% schüttelnd inkubiert und 2 x 3min in PBS gespült. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an Kollagene und andere Proteine zu verhindern wurden die Gewebeschnitte 20min mit 200µl 1% BSA pro Objektträger behandelt. Damit wurden Hintergrundfärbungen vermieden. Danach wurden 100µl vom Primärantikörper α-SMA pro Objektträger aufgetragen und 1h inkubiert. Die Schnitte wurden wieder 2 x 3min in PBS gewaschen. Der Peroxidasekonjugierte-Sekundärantikörper wurde auf die Objektträger für 1h gegeben und dann zur Entfernung von Überständen wieder 2 x 3min mit PBS gespült. Die Präparate wurden nun mit TrisHCl-Puffer/Ammoniumsulfat/H_2O_2/DAB für 10min behandelt. Dabei bildet das Enzym Meerrettichperoxidase einen Komplex mit dem Substrat DAB und reagiert mit einem Elektronendonor, um als Endprodukte ein Farbmolekül und Wasser zu produzieren. Das Farbmolekül muss bei dieser Methode an der Produktionsstelle präzipitieren und darf nicht löslich sein. Daher wurde Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) verwendet. Es ruft eine

braune Färbung im markierten Gewebe hervor, die unlöslich in Alkohol ist. Nach diesem Schritt wurde das Präparat 5min und noch einmal 3min mit Aqua dest. gespült. Für die Färbung mit Kernechtrot wurden die Präparate 20sec in Kernechtrot getaucht und dann in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70%; 80%; 90%; 95%) entwässert und noch 2 x 3min mit 100% Ethanol und 3 x 3min mit Rotihistol behandelt. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit DePex eingedeckelt.

2.7.6 Substanzen zur Fixierung und Einbettung in Epoxidharz

Karnowsky-Lösung:	12% von 25%igem Glutaraldehyd + 58% von 0,3M Sörensen-Puffer + 30% von 10%igem Paraformaldehyd zusammen erhitzen und mit 1M NaOH titrieren, bis die Lösung klar ist. pH 7,4
0,15M, 0,3M Phosphatpuffer	
2%iges OsO_4	
Ethanol	
Propylenoxid	
Epon (Glycid-Ether):	Epon mit DDSA und MNA mischen + Accelerator 1,8% DMP-30 und 24h bei 60°C polymerisieren lassen

2.7.7 Fixierung und Einbettung in Epoxidharzblöcken

Das Gewebe wurde über Nacht in Karnowsky-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten in 0,15M Phosphatpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Osmierung in 1%iger OsO_4-Lösung (Lösungsmittel: 0,15M Phosphatpuffer) bei 4°C über 90 Minuten. Nach einem weiteren Waschvorgang in 0,15M Phosphatpuffer folgte die Entwässerung der osmierten Präparate in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 100%) bei 4°C für jeweils 10 Minuten. Nun erfolgte eine Lagerung für zweimal 15 Minuten in Propylenoxid und danach in einem Gemisch aus Epon und Propylenoxid (1:1) für eine Stunde bei 4°C. Es folgte eine Infiltration in einem Epon-Propylenoxid-Gemisch (3:1) für 16 Stunden bei 4°C. Im letztem Schritt wurden die Proben in Plastik-Einbettformen gebracht und mit Epon bedeckt. Die anschließende Polymerisation im Wärmeschrank erfolgte bei 60°C für 24 Stunden.

2.7.8 Herstellung von Semidünnschnitten

Die Kunststoffblöcke wurden zunächst von ihrer Kapsel befreit. Der Kunstharzstift in Form einer Pyramide mit quadratischer Grundfläche wurde mit einem Präparatehalter in ein Autocut Mikrotom (Ultracut) eingespannt, so dass das Präparat die Halterung überragte. Mit Hilfe einer Stereolupe und einer scharfen Rasierklinge wurde die Oberfläche auf eine schneidbare Größe verkleinert. Mit einem selbst hergestellten frisch gebrochenen Glasmesser entstanden 1µm dicke Schnitte mit einer Oberfläche von circa 1x1 Millimeter. Eine mit Klebeband geformte Tasche an der Rückseite der Schneidefläche wurde zum Auffangen der Schnitte mit Aqua dest. gefüllt. Die auf der Wasseroberfläche schwimmenden Semidünnschnitte konnten mit einem Glasstäbchen aufgenommen und auf einen Aqua dest. beschichteten Glasobjektträger transferiert werden. Auf einer Wärmeplatte wurden die Schnitte durch das Verdunsten des Wassers gestreckt.

2.7.9 Methylenblau-Färbung

Richardson-Lösung: 50% von 1%igem Azur + 25% von 2%igem Methylenblau + 25% von 2%igem Borax

Im Anschluss wurden die Schnitte mit Richardson-Lösung angefärbt und auf einer Wärmeplatte circa 1 Minute inkubiert. Danach wurde ein letztes Mal mit Aqua dest. gespült.

2.8 Immunfluoreszenz

2.8.1 Standardlösungen für die Immunhistologie

BSA: 1% Rinderserumalbumin

KPP: 0,2M Kalium-Phosphatpuffer:
1,088g KH_2PO_4
13,92g K_2HPO_4
ad 440ml Aqua bidest, pH 7,4-7,8

Eindeckmedium: Fluoromount G (Southern Biotech, USA, Kat. Nr. 0100-01)

2.8.2 Antikörper für die Immunfluoreszenz

Primärantikörper:

α-SMA-m Mouse monoclonal Anti-α Smooth Muscle Actin (1:2000, Sigma, St. Louis, Missouri, USA)

α-SMA-rb	Rabbit polyclonal to Alpha Smooth Muscle Actin (1:2000, ab 5694, Abcam, Cambridge, UK)
DAPI	4' ,6'-Diamino-2-phenylindole, dilactate (1:20.000 Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, D9564)
QH1	Endothelial Cell Surface (Quail), gewonnen als Zellüberstand von Hybridomzellen (DSHB, Universität von Iowa, USA)
GFAP	Mouse Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein, Monoclonal Antibody (Chemicon International,Temecula, CA)
Sekundärantikörper:	
Alexa Fluor 488	Donkey anti-rabbit IgG 2mg/ml (H+L) (1:200, Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
Alexa Fluor 488	Goat anti-mouse IgG 2mg/ml (H+L) (1:200, Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
Alexa Fluor 594	Goat anti-mouse IgG 2mg/ml (H+L) (1:200,Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

2.8.3 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Paraffinschnitte wurden zum Entparaffinieren in einer Glasküvette 4 x 3min in Rotihistol getaucht, dann in einer absteigenden Ethanol-Reihe (100%, 100%, 96%, 70%, 50%, 30%) jeweils 2min gespült und anschließend für 3min in Aqua dest. überführt. Unspezifische Bindungen wurden mit je 300-600µl 1%igem BSA (bovine serum albumin) bei Raumtemperatur für 1h in einer Feuchtkammer geblockt. Dann wurden die Primärantikörper aufgetragen und das Präparat bei Raumtemperatur für eine Stunde in der Feuchtkammer inkubiert. Dabei wurden bei Einfach-Färbungen nur ein Primärantikörper, bei Doppel-Färbungen gleichzeitig beide Primärantikörper aufgetragen. Nach einem Waschschritt mit 2 x 1000µl 0,1M KPP folgte die Inkubation der Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für 1h in der Feuchtkammer. Auch hier wurden bei Doppel-Färbungen gleichzeitig beide Sekundärantikörper verwendet. Nun wurde der Waschschritt wiederholt und das Präparat mit Fluoromount G eingedeckelt. Die Präparate wurden dann bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Die Analyse erfolgte mikroskopisch (Leica DM 5000 B, Deutschland) durch Messen der Emission der Farbstoffe bei 488nm und 594nm Wellenlängen.

Für die zusätzliche Anfärbung von Zellkernen mit DAPI wurden 100µl einer verdünnten DAPI-Lösung nach dem letzten Waschschritt aufgetragen und nach 5min Einwirkzeit mit

KPP entfernt. Hierbei wurde das Präparat wieder 2x gewaschen und danach wie bereits beschrieben eingedeckelt.

2.8.4 Anti-α-SMA-Antikörper Quantifizierung

Bei einer Auswahl mit anti-α-SMA-m-Antikörpern gefärbter Paraffinschnitte von CNS-1-pcDNA-Tumoren und CNS-1-rMCP-1-Tumoren von Hühner- und Wachteleiern wurde die Emission bei 488nm Wellenlänge mit dem Mikroskop (Leica DM 5000 B, Deutschland) und Kamera (Leica DC 300 FC) aufgenommen und gemessen. Ich habe dabei die Gewebeschnitte von je 4 Hühnereiern und je 2 Wachteleiern der Kontrollgliome (CNS-1-pcDNA) und der transfizierten Gliome (CNS-1-rMCP-1) verwendet. Somit wurden 6 CNS-1-rMCP-1-Gliome mit 6 Kontrollgliomen verglichen. Von jedem Tumor habe ich insgesamt 12 Aufnahmen angefertigt. Dabei wurden aus mehreren Schnitten sich nicht überschneidende Ausschnitte bei 20-facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Durch den Größenunterschied der Tumoren, musste ich eine unterschiedliche Anzahl von Tumorschnitten verwenden. So konnte ich in einzelnen Tumorschnitten je nach Größe mindestens 2-8 verschiedene Aufnahmen machen. Die Fluoreszenzstärken der Aufnahmen wurden angeglichen, indem immer gleiche Aufnahmebedingungen bei der Messung mit Leica FW4000 vorgegeben wurden. Pro Aufnahme wurden mehrere Fluoreszenzflächen ermittelt und durch das Programm Leica FW4000 wurde dann für jede Aufnahme die Gesamtfläche der gemessenen Fluoreszenzflächen berechnet. Von jedem Tumor wurden somit 12 Aufnahmen angefertigt und deren 12 Gesamtfluoreszenzflächen berechnet. Um einen Vergleich der Tumoren durchzuführen, wurde die gesamte Fläche einer Aufnahme mit 20-facher Objektivvergrößerung bestimmt (Gesamtfläche) und dann der Anteil der Fluoreszenz von dieser gesamten Fläche berechnet.

Da die Tumoren unterschiedliche Größen besaßen, musste ich unterschiedlich viele Schnitte benutzen, um von jedem Tumor 12 Fluoreszenzflächen zu erhalten. Daher errechnete ich das Gesamtfluoreszenzvolumen aller 12 Messwerte pro Tumor, indem ich das Produkt aus der Summe der untersuchten Gesamtfluoreszenzflächen, der Anzahl der Schnittebenen und der Schnittdicke von 8µm gebildet habe. Diese wurde dann zum untersuchten Gesamtvolumen in Beziehung gesetzt. Das Gesamtvolumen bildet sich aus dem Produkt der Summe der gemessenen Gesamtflächen, der Anzahl der Schnittebenen und der Schnittdicke von 8µm. Schließlich berechnete ich den prozentualen Anteil des Fluoreszenzvolumens vom

Gesamtvolumen jedes Tumors. Zur statistischen Signifikanzbestimmung wurde der Student-t-Test mit dem Programm Statistica durchgeführt.

2.9 In-vitro-Experimente

2.9.1 Reagenzien für Proliferationsassays und Kristallviolettfärbung

Aqua ad iniectabila (steril filtriert)	(Braun, Melsungen, Deutschland)
DPBS	(Cambrex, Verviers, Belgien)
EBM-2	(Cambrex, Walkersville, MD, USA)
FCS	(Biochrome AG, Berlin, Deutschland)
RPMI 1640 mit L-Glutamine	(Cambrex, Verviers, Belgien)
Trypsin	(Cambrex, Verviers, Belgien)
Recombinant Human MCP-1 (MCAF)	(Reliatech GmbH, Braunschweig, Deutschland)
0,5% Gelatine	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
5% Glutaraldehyd	
0,1% Kristallviolett	0,05g Kristallviolett in 50ml Aqua dest.
10% Essigsäure	

2.9.2 Proliferationsassay mit CNS-1-Zellen

Die CNS-1 Zellen habe ich in Zellkultur mehrere Passagen in DMEM mit 10% FCS, 1% Pen/Strep und 250ng/ml G 418 wachsen lassen. Für den Proliferationsassay wurden die Zellen abtrypsiniert, abzentrifugiert und das Pellet in Medium gelöst. Dann wurde die Zellzahl im Cell Counter bestimmt und pro Reihe verschiedene Konzentrationen in 100µl Zellsuspension pro Well aufgetragen. In Reihe 1 wurden $1x10^3$ Zellen/Well, in Reihe 2 $2,5x10^3$ Zellen/Well, in Reihe 3 $5x10^3$ Zellen/Well und in Reihe 4 $1x10^4$ Zellen/Well aufgetragen. Die vier 96er-Well Platten wurden dann im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Alle 24 Stunden wurde eine der Platten mit 5% Glutaraldehyd fixiert, in Aqua dest. gewaschen, abgetropft und mindestens 1h luftgetrocknet. Alle Platten wurden am 4. Tag mit 100µl 0,1% Kristallviolett pro Well gefärbt. Dazu wurden sie 20min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Durch dreimaliges Waschen in Aqua dest. und Abtropfen wurden die Farbüberstände entfernt und dann alle 3 Platten mindestens 1h unter dem Abzug luftgetrocknet. Nun habe ich pro Well 100µl 10%ige Essigsäure dazu gegeben und den Extinktionskoeffizienten mit dem Thermomax Microplate Reader bei 570nm bestimmt. Für

jede untersuchte Zellausgangskonzentration ergaben sich so 8 Messwerte (n=8) für die Messzeitpunkte 24h, 48h, 72h und 96h. Zunächst wurde, wie in Abschnitt 2.6.7. beschrieben, mit Excel pro Zellausgangskonzentration der Mittelwert der Extinktionskoeffizienten gebildet. Danach wurde der Anstieg der Mittelwerte der beiden Zelllinien über die Proliferationszeit verglichen. Anschließend wurden die einzelnen Zellausgangskonzentrationen graphisch dargestellt und verglichen. Weiterhin wurden die einzelnen Proliferationszeiten in Beziehung zum ersten tatsächlichen Messwert bei 24 Stunden gesetzt, um so den Steigerungsfaktor der Proliferation zu berechnen. Nun wurde wieder das arithmetische Mittel der einzelnen Werte gebildet, so dass für jede Zelllinie und Zellausgangskonzentration zu jedem weiteren Messzeitpunkt nach 24 Stunden ein mittlerer Steigerungsfaktor errechnet werden konnte. Auch dieser wurde graphisch mit Excel dargestellt.

Um eine Signifikanz des Proliferationsunterschiedes zwischen CNS-1-pcDNA-Zellen und CNS-1-MCP-1-Zellen festzustellen, wurden die Messwerte mit dem Programm Statistica der Abteilung Medizinischen Statistik als 2-faktorielle Anova über die Zeit analysiert. Es handelt sich daher um verbundene Messungen oder „Repeated Measures“. Hier wurde als Nullhypothese eine Gleichheit im Wachstum der Zelllinien (kein Effekt) gewählt, während als Alternativhypothese der Unterschied im Wachstum (Effekt) in Frage kommt. Wir formulierten weiterhin eine zweiseitige Hypothese, indem wir einen positiven Effekt annahmen. Als Effektmaß wurden die Mittelwerte der gemessenen Extinktionskoeffizienten ermittelt. Das Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}05$ wurde festgelegt. Somit ist ein Effekt, also Unterschied im Wachstum, bei einem p-Wert kleiner als 0,05 anzunehmen.

2.9.3 Proliferationsassay mit HUVECs unter MCP-1-Stimulation

Bei einem ersten Proliferationsversuch mit HUVECs habe ich die Zellen mit 50ng/ml MCP-1 für 72h stimuliert. Dabei wurden Messwerte (n=8) für die stimulierten HUVECs und die Kontrollen zu den jeweiligen Messzeitpunkten (24h, 48h, 72h) ermittelt. Zunächst wurden die 96er-Well Platten mit 0,5% Gelatine beschichtet und für 1h bei Raumtemperatur unter der Sterilbank inkubiert. Nach Absaugen der Gelatine wurden die Wells 2mal mit PBS gewaschen. Nun wurden die zuvor in Kultur 1 bis 2 Passagen gewachsenen HUVECs abtrypsiniert, zentrifugiert und in 1ml RPMI gelöst. Die Zellzahl wurde mittels Cell Counter bestimmt. Die Zellen wurden in 10% FCS RPMI angesetzt. Ich habe RPMI als Medium aufgrund seiner geringen Zusätze an Wachstumsfaktoren gewählt, so dass ein möglichst

unverfälschtes Ergebnis bzgl. der MCP-1 Applikation vorrausgesetzt werden konnte. Jedes Well erhielt die gleiche Konzentration von $1x10^4$ Zellen in 100µl Medium. Zunächst wurden die Zellen entsprechend verdünnt, so dass sie mit der Hälfte des Mediums, wie im Vorversuch bereits beschrieben, ausplattiert wurden. Die restliche Menge des Mediums wurde mit MCP-1 angereichert und dazu pipettiert, so dass eine Endkonzentration von 50ng/ml bzw. 5ng/100µl (pro Well) gegeben war. Nun wurden die 96er-Well Platten bei 5% CO_2 und 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden wurde eine der drei Platten durch Zugabe von 5,0% Glutaraldehyd wie vorbeschrieben fixiert. Zu den restlichen 2 Platten habe ich an Tag 1 erneut MCP-1 dazugegeben, da ich von einer geringen Beständigkeit des MCP-1 Proteins in wässriger Lösung ausging. Von der Stocklösung habe ich je 1µl zu dem bereits vorhandenen Medium gegeben. Die Kontrollen haben 1µl Aqua dest. erhalten. An Tag 2 wurde wiederum eine Platte wie zuvor fixiert und die dritte Platte erneut mit MCP-1 behandelt. Schließlich wurde an Tag 3 die letzte Platte nach bereits erwähnter Prozedur fixiert und über Nacht getrocknet. Alle Platten wurden mit Kristallviolett (Abschnitt 2.9.2) gefärbt. Nach Zugabe von 100µl 10%iger Essigsäure habe ich dann den Extinktionskoeffizienten im Thermomax Microplate Reader bei 570nm gemessen. Das Experiment wurde in 10% FCS RPMI mit verschiedenen MCP-1-Konzentrationen (1ng/ml, 10ng/ml, 30ng/ml) nach gleichem Prozedere wiederholt. Die Auswertung erfolgte nach dem gleichen Prozedere wie bereits in den Abschnitten 2.6.7 und 2.9.2 beschrieben. Der p-Wert wurde aufgrund mehrerer Vergleichsproben mit einer mehrfaktoriellen Anova mit Statistica ermittelt.

2.9.4 Proliferationsassay mit HPA-SMCs unter MCP-1-Stimulation

Bei einem ersten Proliferationsversuch mit HPA-SMCs wurden die HPA-SMCs mit 0ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 30ng/ml und 50ng/ml humanen MCP-1 für 96h stimuliert. Dabei wurden Messwerte (n=8) für die jeweilige Konzentration und den Messzeitpunkt (24h, 48h, 72h, 96h) ermittelt. Glatte Muskelzellen wurden bis zur Passage 6 in Zellkulturschalen in SMC-2-Medium kultiviert. Dann wurden sie abtrypsiniert, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1ml Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit dem Cell Counter bestimmt. Die Zellen wurden dann mit der Zielkonzentration von $2x10^4$ Zellen/Well (100µl) auf 96er-Well Platten gegeben. Es wurde die Hälfte des pro Well angegebenen Mediums benutzt. Die Zellen wurden nun mit unterschiedlichen Konzentrationen von MCP-1 behandelt. Dazu wurden immer 8 Wells mit der gleichen Konzentration behandelt. Eine Reihe wurde als Negativkontrolle nur mit Medium ausplattiert. Zu den restlichen Zellen wurden jeweils 50µl

Medium mit MCP-1 Konzentrationen von 1ng/ml, 10ng/ml, 30ng/ml und 50ng/ml gegeben. Nun wurden die Platten bei 5% CO_2 und 37°C im Brutschrank inkubiert. Alle 24h wurde eine Platte mit 30µl 5,0% Glutaraldehyd fixiert, vorsichtig mit Aqua dest. gewaschen, abgetropft und über Nacht getrocknet. Die restlichen Platten wurden erneut mit den angegebenen MCP-1 Konzentrationen behandelt, wobei jeweils 1µl MCP-1 Lösung (mit entsprechender Konzentration) und zur Negativkontrolle 1µl Aqua dest. in ein Well gegeben wurde. Alle Platten wurden mit Kristallviolett (Abschnitt 2.9.2) gefärbt. Nach Zugabe von 100µl 10%iger Essigsäure habe ich dann den Extinktionskoeffizienten im Thermomax Microplate Reader bei 570nm gemessen. Die Auswertung erfolgte nach dem gleichen Prozedere wie bereits in den Abschnitten 2.6.7. und 2.9.2 beschrieben. Der p-Wert wurde aufgrund mehrerer Vergleichsproben mit einer mehrfaktoriellen Anova mit Statistica ermittelt.

2.10 Nachweis von MCP-1-Rezeptoren mittels real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (real-time RT-PCR)

In diesem Experiment sollte die Genexpression der Rezeptoren für MCP-1 in verschiedenen Zellen, die eine Rolle in der Angiogenese spielen, nachgewiesen werden. Hierfür wurde die mRNA der Zellen isoliert und die Genexpression mittels real-time RT-PCR vergleichend analysiert.

2.10.1 Semiquantitative real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Die real-time RT-PCR ist eine Weiterentwicklung der RT-PCR. Bei dieser wird aus RNA cDNA hergestellt und diese anschließend als Template für die PCR zur Vervielfältigung verwendet. Bei der quantitativen real-time RT-PCR wird durch Messung der Fluoreszenzveränderung die relative Anzahl an Nukleotidmatritzen in wässriger Lösung bestimmt. So kann die transkriptionelle Aktivität eines bestimmten Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessen werden. Dabei wird die Genexpression immer mit einem sogenannten ‚housekeeping Gen' verglichen, meistens β-Aktin. Man geht bei diesem Gen von einer nahezu konstanten Transkription und Expression aus. Daher stellt die Methode eine Möglichkeit zur vergleichenden semiquantitativen Messung der Gentranskription dar (Mülhardt, 2003). Wie bei der herkömmlichen PCR wird die Nukleotidmatritze über eine enzymkatalysierte Reaktion in mehreren sich wiederholenden Temperaturschritten exponentiell vervielfältigt. Die DNA-Stränge werden dabei mehreren Erhitzungs- und

Abkühlungsprozessen unterzogen. Diese führen jeweils zur Strangtrennung bei 94°C und zur sequenzspezifischen Oligonukleotidanlagerung, also der Hybridisierung der Primer mit der passenden einsträngigen Template-DNA bei 55°C. Bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, kommt es zur enzymabhängigen Oligonukleotidverlängerung. Dabei dienen beide Einzelstränge als Matrize für die Synthese eines Komplementärstranges und es kommt mit jedem Temperaturzyklus zur Verdopplung der bereits existierenden DNA. Bei der real-time RT-PCR wird nun näherungsweise die Menge der gebildeten DNA mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes bestimmt, der sich in doppelsträngige DNA einbaut. Über eine Kamera wird der Fluoreszenzanstieg kontinuierlich gemessen. Wie bei der herkömmlichen PCR findet nach einer Anlaufphase eine exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt. Akkumulieren die Produkte, verlangsamt sich die Reaktion zu einem linearen Anstieg und kommt schließlich ganz zum Stillstand (Mühlhardt, 2003). Dabei wird ein sogenannter Schwellenwert (Cycle Threshold, CT-Wert) gemessen (Abb. 4). Er entspricht dem Zeitpunkt oder der Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt und die cDNA beginnt, sich exponentiell zu vervielfältigen. Dieser Zeitpunkt wird je eher erreicht, um so größer die Ausgangskonzentration der DNA im anfänglichen Reaktionsansatz war. Bei großen Konzentrationen wird der CT - Wert also bei einer niedrigeren Zykluszahl erreicht, als bei kleinen. Da diese Messungen zeitgleich mit der Amplifikationsreaktion stattfinden, also in Echtzeit, wurde diese Methode ‚real-time PCR' genannt (Mühlhardt, 2003; Wikipedia, 2009b).

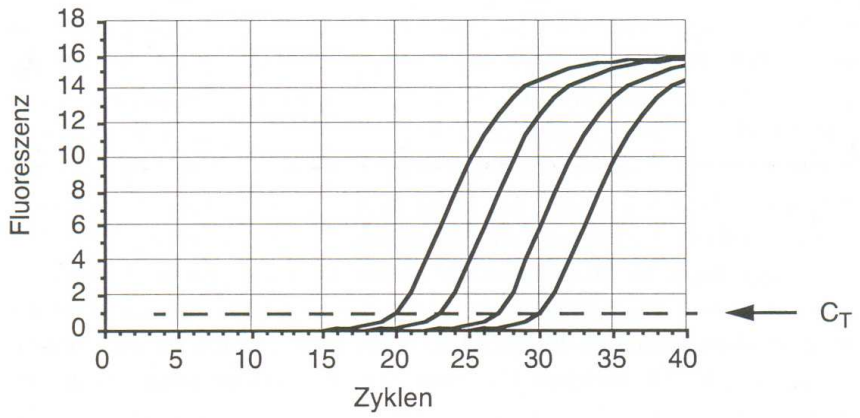


Abb. 4: Schmelzkurven/Fluoreszenzkurven für 4 Amplifikationen mit unterschiedlichen DNA-Mengen mit Anzeige des CT-Werts (aus: Mühlhardt, 2003, Seite 99).

Bei der Detektion wurden Doppelstrang(ds)-DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Ich habe den asymmetrischen Cyanfarbstoff SYBR Green I ^{R} benutzt, der erst nach Bindung

an dsDNA stark fluoresziert. Dabei bindet SYBR Green I in der kleinen Furche der dsDNA und steigert seine Fluoreszenz um das 100-fache. Die Fluoreszenz steigt demnach proportional zur DNA-Menge. Da sich der Farbstoff unspezifisch an der DNA anlagert, wird die Spezifität lediglich durch die verwendeten Oligonukleotidprimer bestimmt. Eine Überprüfung der Methode kann aber über die sogenannte Schmelzpunktbestimmung bzw. Schmelzkurvenanalyse erfolgen. Diese zeigt die charakteristische Schmelztemperatur für das Amplicon und damit können unspezifische Nebenprodukte der PCR vom spezifischen Reaktionsprodukt unterschieden werden. Nebenprodukte sind z.B. Primerdimere, die als Oligonukleotidsequenzen auch Farbstoffe anlagern und ein Signal erzeugen. Damit erübrigt sich auch eine Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung der Produkte und Überprüfung der Spezifität (Mühlhardt, 2003).

2.10.2 Gewinnung der Zellproben für die real-time RT-PCR

Zunächst habe ich mononukleäre Zellen (Monozyten) aus menschlichem Blut gewonnen. In der Literatur wurde eine Expression der MCP-1 Rezeptoren auf Monozyten mehrfach beschrieben (Yoshimura und Leonard, 1990; Gunn et al., 1997; Boring et al., 1998; Ni et al., 2001), daher dienten sie als Positivkontrolle in den real-time RT-PCR Versuchen mit humanem Zellmaterial. Dieses Zellmaterial waren die aus Nabelschnüren extrahierten HUVECs und die aus der Lungenarterie stammenden glatten Muskelzellen (HPA-SMCs) als Beispiel für Endothelzellen und glatte Muskelzellen bei der Angiogenese. Zusätzlich habe ich die Rezeptoren für MCP-1 auf den von der Ratte stammenden Gliomzellen mit der gleichen Technik untersucht. Als Positivkontrolle dienten isolierte Monozyten der Ratte, die von Herrn Prof. Dr. Ramadori der Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt wurden.

2.10.3 Isolierung der RNA von mononukleären Zellen des Menschen

DPBS/ 2mM EDTA	500ml DPBS + 100ml EDTA (2mM)
Ficoll-Paque	Für Lymphozyten-Isolation (Pharmacia Biotech, Schweden, Lot.Nr. 245956)

Ich habe Buffy-Coats eines Blutspenders aus der Blutbank der Universitätsmedizin Göttingen erhalten. Buffy-Coats sind aus Vollblutspenden isolierte Leukozyten- und Thrombozytenkonzentrate. Dabei sind die Erythrozyten zum größten Teil entfernt. Thrombozyten, Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten sind noch Bestandteil dieser

Konzentrate. Sie wurden unter der Sterilbank in 2 x 50ml Falconröhrchen aufgeteilt. Bei RT und 2200rpm wurden die Falcons vorsichtig für 25min zentrifugiert, ohne am Ende abzubremsen. Es bildeten sich drei Phasen. Die oberste Schicht enthält zum größten Teil Lipide und Serum und wird großzügig abgesaugt. In der mittleren Schicht befinden sich die Leukozyten, so dass diese vorsichtig abgesaugt und in DPBS mit 2mM EDTA gegeben werden konnten. Insgesamt sollte ein Volumen von 140ml vorliegen. Die unterste Schicht stellt v.a. die restlichen Erythrozyten dar und kann verworfen werden. Nun wurden die 140 ml Leukozyten-Lösung auf 4 x 50ml Falcons mit 15ml Ficoll-Paque aufgeteilt. Ficoll ist ein wasserlösliches, synthetisch hergestelltes Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin. Es dient bei der Dichtezentrifugation zur Isolierung von mononukleären Zellen (Wikipedia, 2009a). Das Ficoll trägt hierbei zur Eliminierung der Granulozyten bei, indem die Blut/DPBS-Mischung über das Ficoll geschichtet wird und mittels Dichtegradientenzentrifugation die genannten Bestandteile entfernt wurden. Der Falcon musste also schräg gehalten werden und die Leukozyten-Lösung wurde ganz vorsichtig hinein pipettiert, um eine Schichtung zu erhalten. Durch eine weitere Zentrifugation bei RT, 2200rpm und ohne Abbremsen der Zentrifuge entstanden erneut 3 oder auch 4 Phasen. Die unterste Phase besteht aus Granulozyten und nicht bereits entfernten Thrombozyten. Dann folgt eine Schicht Ficoll. Darüber liegen die restlichen Leukozyten in einer schmalen weißlichen Interphase und ganz zu oberst ist eine Schicht mit Plasma. Das Plasma wird vorsichtig abgesaugt und verworfen. Die Leukozytenschicht wurde wieder vorsichtig mit einer kleinlumigen Pipette abgesaugt und gesammelt. Dann wurde sie 2x mit 50ml DPBS/ 2mM EDTA gewaschen. Dazu wurden die Zellen in neue Falcons gegeben und mit DPBS/EDTA auf 50ml aufgefüllt, um dann bei 4°C und 900rpm (9,6 x g) für 10min zentrifugiert zu werden. Der Überstand mit Thrombozyten wurde entfernt und der Schritt wiederholt (Ficoll-Paque® Handbuch 71-7167-00 Pharmacia Biotech). Das Pelett wurde in 10% FCS RPMI resuspendiert und dann über Nacht in einer mittleren Kulturflasche mit 40ml Medium bei 4°C aufbewahrt. Ein Teil der Zellen setzte sich über Nacht auf dem Boden der Kulturflasche ab. Da Monozyten adhärent wachsen (Matsushima et al., 1989), konnte davon ausgegangen werden, dass es sich größtenteils um diese Zellen handelt. Die restliche Zellsuspension wurde abgenommen und aufbewahrt. Die hier enthaltenen Zellen sind größtenteils Lymphozyten. Da jedoch nicht von einer 100% Adhärenz der Monozyten ausgegangen werden konnte, handelte es sich hier um ein Gemisch aus Lymphozyten und einigen Monozyten.

Auf die Monozyten wurden 10ml DPBS gegeben und die Zellen wurden durch leichtes Klopfen wieder resuspendiert. In 15ml Falcons wurden die Zellen bei RT, 900rpm für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pelett in 1ml DPBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Cell Counter auf $6{,}2x10^6$ Zellen/ml bestimmt. Erneut wurde die Zellsuspension bei RT, 1000rpm für 8min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Nach einem weiteren Waschschritt mit DPBS und Abzentrifugation, erfolgte die RNA-Extraktion mit dem Qiagen Mini Präparations Kit (siehe Abschnitt 2.10.6). Der zuvor aufbewahrte Überstand wurde abzentrifugiert, um das Medium zu entfernen. Das Pelett wurde in DPBS gelöst. Mit dem Cell Counter wurde die Gesamtzellzahl ermittelt und dann eine Menge mit ca. $1x10^7$ Zellen entnommen. Diese wurde ebenfalls bei RT, 1000rpm für 8min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und ein letztes Mal mit DPBS gewaschen. Die RNA wurde mittels dem Qiagen Mini Präparations Kit extrahiert (siehe Abschnitt 2.10.6).

2.10.4 Isolierung der RNA von HUVECs und HPA-SMCs

Zum Nachweis der Expression von MCP-1-Rezeptoren in HUVECs und HPA-SMCs mit real-time RT-PCR wurde die RNA isoliert. Die HUVECs und HPA-SMCs wurden wie bereits beschrieben in Kultur genommen und auf mittleren Kulturschalen kultiviert. Die Zellen wurden abtrypsiniert und zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pelett in 1ml DPBS aufgenommen. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellsuspensionen bei RT, mit 1000rpm für 8min abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und ein weiteres Mal mit DPBS gewaschen. Die RNA wurde mit dem Qiagen Mini Präparations Kit extrahiert (siehe Abschnitt 2.10.6).

2.10.5 Isolierung der RNA von HUVECs und HPA-SMCs nach MCP-1-Stimulation

Zur Untersuchung der Expression von MCP-1-Rezeptoren in HUVECs und HPA-SMCs nach Stimulation mit MCP-1 habe ich die RNA ohne Stimulation und nach einmaliger bzw. zweimaliger Stimulation der Zellen mit 50ng/ml MCP-1 isoliert. Sowohl die HUVECs als auch die glatten Muskelzellen (HPA-SMCs) wurden wie bereits beschrieben in der Zellkultur herangezogen. Danach sollte eine Stimulation mit MCP-1 erfolgen und später die mRNA-Synthese der MCP-1-Rezeptoren zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen verglichen werden. Die HUVECs wurden abtrypsiniert, gepoolt und die Zellzahl bestimmt. Danach wurde die gleiche Zellzahl ($1x10^6$ Zellen/ml) auf jede Platte mit Endothelmedium ausplattiert. Es wurden drei verschiedene Stimulationen zum Vergleich gewählt. Eine Probe sollte

gänzlich unstimuliert wachsen (A), eine weitere sollte einmalig nach 24 Stunden stimuliert werden (B) und die letzte sollte zweimalig nach 24 und 48 Stunden stimuliert werden (C). Zunächst wuchsen alle Proben für 24 Stunden in normalem Medium ohne Zugabe von MCP-1. Dann wurde das Medium aller Proben gewechselt und eine (C) der drei Proben das erste Mal mit 50ng/ml MCP-1 stimuliert. Nach weiteren 24 Stunden wurde ein weiteres Mal das Medium aller Proben gewechselt und Probe C ein weiteres Mal mit der gleichen Menge MCP-1 stimuliert. Auch Probe B wurde diesmal wie Probe C mit MCP-1 behandelt. Nach weiteren 24 Stunden Wachstumszeit wurden die Zellen abtrypsiniert und mehrmals mit DPBS gewaschen und zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, so dass nur das Zellpellet übrig blieb. Anschließend wurde die RNA mittels Qiagen Mini Präparation Kit isoliert.

2.10.6 RNA-Isolierung mit Qiagen Mini Präparations Kit

RLT-Puffer	1ml RLT-Puffer + 10µl β-ME
RPE-Puffer	RPE-Puffer + 4 Volumen von Ethanol (96–100%)
RW-1 Puffer	
DNaseI-Stock	1500U in 550µl RNase-freies Wasser
DNase	10µl DNaseI-Stocklösung + 70µl RDD-Puffer
70% Ethanol	RNase-frei
Shredder Säulen	

Die RNA-Isolation erfolgte mittels RNeasy Mini Präparation von Qiagen. Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte erfolgten unter Raumtemperatur (RT). Auf das Zellpellet wurden 600µl RLT-Puffer gegeben. Das Pellet wurde dann durch Pipettieren und Vortexen gelöst. Zum Homogenisieren wurde die Lösung auf eine Qiagen Shredder Säule gegeben und 2min bei 10.000rpm zentrifugiert. Dabei wurden die DNA und RNA der zerstörten Zellen freigesetzt. Durch Mischen der Lösung mit 600µl 70%igem Ethanol wurden die Nukleinsäuren ausgefällt. Nun wurden nacheinander jeweils 600µl Lösung auf eine Qiagen Mini Säule gegeben und 15sec bei 10.000rpm (8.000g) zentrifugiert. Die Nukleinsäuren binden dabei an die Membran der Säule. Zum Waschen wurden 350µl RW1-Puffer auf die Membran gegeben und wieder 15sec zentrifugiert. Zum DNA-Verdau wurden 80µl DNase auf die Membran gegeben und 15min bei RT einwirken lassen. Dabei werden DNA-Spuren durch das Enzym DNaseI verdaut und damit aus dem Präparat beseitigt. Nun wurde erneut mit 350µl RW1-Puffer gewaschen und die Säule in ein neues Cup überführt. Die RNA wurde

nun 2x mit 500µl RPE-Puffer gewaschen. Danach wurde die Säule bei 10.000rpm für 1min zentrifugiert, um sie zu trocknen. In einem neuen 1,5ml E-Cup wurde die RNA dann mit 30µl RNase-freiem Wasser bei 10.000rpm für 1min eluiert. Dieser Schritt wurde mit der gelösten RNA wiederholt und somit die Ausbeute gesteigert. Im Nano-Drop Spektrofotometer wurde die RNA dann gemessen.

2.10.7 RNA-Gel

1% Agarosegel	1g Agarose in 100ml H_2O lösen
1x TAE-Puffer	121g Tris , 18,6g Na_2EDTA in 471ml ddH_2O lösen, 29ml Eisessig dazu geben

Ethidium-Bromid

Zur Überprüfung der RNA wurde diese auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Mit der Darstellung der RNA wurde kontrolliert, ob sie intakt war und nicht durch RNasen abgebaut war. Für das Gel wurde TAE-Puffer mit 1g Agarose erwärmt, bis sich die Agarose löste. Um die RNA sichtbar zu machen, wurden 4µl Ethidium-Bromid dazu gegeben und dann das Gel in eine Gelkammer gegossen. Nachdem das Gel sich nach 30min verfestigt hatte, wurden jeweils pro Bahn 0,5µg RNA in 10µl Aqua dest. gelöst aufgetragen. Das Gel lief für ca. 30min bei 80V und 250mA und wurde dann unter UV-Licht fotografiert. Dieses Experiment wurde nur für die RNA von nicht stimulierten HUVECs und HPA-SMCs, sowie deren Positivkontrollen durchgeführt. Bei zu geringer RNA-Ausbeute in den übrigen Experimenten wurde darauf verzichtet.

2.10.8 Herstellung der cDNA

Omniscript ™ (Reverse Transkriptase)

10x Puffer

5mM dNTP (Nukleotide)

Random Hexamere (Primer)

RNase-Inhibitor

Da die DNA-Polymerase der PCR ein DNA-abhängiges Enzym ist, ist es notwendig, die isolierten RNA-Sequenzen in eine komplementäre, einzelsträngige DNA-Kopie (Erststrang-cDNA, first-strand cDNA) umzuschreiben. Diese Reaktion nennt man, da sie dem Normalfall in der Molekularbiologie von DNA zu RNA widerspricht, Reverse Transkription (RT). Man bedient sich dabei eines in Retroviren, wie dem HIV, vorkommenden Enzyms. Diese RNA-

anhängige DNA-Polymerase nennt sich, gemäß der von ihr katalysierten Reaktion, Reverse Transkriptase. Kommerziell sind zwei Enzyme Omniscript™ und Sensiscript™ erhältlich, die beide eine überdurchschnittliche Sensitivität und Prozessivität besitzen (Bosch et al., 2000). Die Enzyme können sich mit Hilfe von Hexamer Primern an die RNA anlagern und die RNA in 3'-5' Richtung in cDNA umschreiben. Hexamer Primer sind Hexanukleotidprimer, die sich an vielen Stellen der RNA anlagern können und somit ein komplettes Abschreiben der gesamten RNA ermöglichen (Mülhardt, 2003). Beide käuflichen Systeme besitzen zusätzlich noch eine RNase H-Aktivität, dadurch wird im Laufe der reversen Transkription die RNA des sich bildenden RNA/DNA-Hybriden hydrolysiert. Das Ergebnis ist eine einzelne Kopie jeder RNA-Sequenz und ein Ausschluss einer Verzerrung des Genexpressionsmusters durch mehrfache Vervielfältigung einzelner Sequenzen. Damit würde es im Ergebnis zu einer eins-zu-eins Umschreibung der RNA in cDNA kommen, jedoch zeigt sich, dass die Enzyme keine 100% Effizienz besitzen. Somit bestimmt die Reverse Transkription die Schwankungen im experimentellen Rahmen der real-time RT-PCR (Mühlhardt, 2003).

In unseren Versuchen wurde mit Omniscript™ von Qiagen gearbeitet. Zunächst wurden die RNA-Proben auf 100ng/µl verdünnt und mit einer Nano-Drop Messung überprüft. Für die cDNA-Synthese wurde jeweils 1µg RNA eingesetzt und ein Mastermix nach Kit Vorgabe angesetzt. Dazu wurden die gleichen Mengen von Puffer (10x), Nukleotiden (5mM dNTP), Random Hexameren und RNA-freiem Wasser mit der halben Menge des Enzyms (Omniscript) und den RNase-Inhibitoren zusammen pipettiert. Für jede Probe wurden 10µl cDNA mit 10µl Mastermix gemischt. Die reverse Transkriptase-Reaktion wurde für 1h bei 37°C gestartet. Zur Denaturierung der Enzyme und Abstoppen der Reaktion wurden die Proben für einige Sekunden auf 70°C erhitzt und dann bei 4°C gelagert.

2.10.9 Primerdesign

Für das Herstellen der Taq Man-Primer für eine real-time RT-PCR zur Darstellung der MCP-1 Rezeptoren wurden zunächst die mRNA-Sequenzen der Rezeptoren ermittelt. Bei der Internetrecherche wurden unter IHOP und NCBI die möglichen Rezeptoren für MCP-1 (CCL-2) ermittelt. Sowohl für den *Homo sapiens* (CCR-1 & CCR-2) als auch *Rattus norvegicus* (CCR-2 & CCR-4) ergaben sich 2 Rezeptoren. Die mRNA-Sequenz wurde ebenfalls unter NCBI-Gene und auf Seiten der genetischen Abteilung der Stanford Universität (Stanford Universität, 2006) ermittelt. Dann wurden mit dem Programm Primer Express 2.0 mehrere Taq Man Forward- und Reverse Primer Sequenzen ermittelt. Um Kreuzreaktionen mit

anderen Genen zu vermeiden, wurden die einzelnen Primerpaare noch einmal unter NCBI Blast mit anderen mRNA-Sequenzen verglichen. Hier zeigten sich lediglich hohe Übereinstimmungen mit den gesuchten Rezeptorsequenzen, aber nicht mit Fremdmolekülen, so dass ich die errechneten Primer verwenden konnte. Diese wurden dann von der Firma Thermo Scientific hergestellt und in lyophilisiertem Zustand geliefert. Nach den Anweisungen der Herstellerfirma wurden die Primer dann zu einer Stocklösung verarbeitet, indem sie in einer Konzentration von 100pmol/l in sterilem, RNase-freiem Wasser (Aqua ad inject.) gelöst wurden. Zu Versuchszwecken wurden Mischlösungen von 50pmol/l mit dem jeweiligen Forward- und Reverse-Primern für jeden Rezeptor hergestellt.

2.10.10 Oligonukleotidprimer-Verdünnungsreihe

Die Verdünnungsreihe dient zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses der Reaktionsstoffe, also der cDNA und der Primer, um optimale Bedingungen für eine exponentielle Produktausbeute zu schaffen. Die cDNA aller Proben wurde zu gleichen Teilen als eine gesamte cDNA Probe gemischt. Danach wurde davon eine Verdünnungsreihe (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128) erstellt. Auf einer Mikrotiterplatte wurden für jeden Oligonukleotidprimer Dupletts jeder Verdünnung (5µl) und zusätzlich noch eine Wasserkontrolle aufgetragen. Des Weiteren wurde ein Mastermix hergestellt. Dazu wurde pro Primerpaar ein Mastermix mit folgenden Bestandteilen angesetzt: SYBR-Mix, Reference Dye, Oligonukleotidprimer und RNase-freies Wasser. Ein Ansatz für ein Well enthielt dabei 12,5µl SYBR-Mix, 0,2µl Reference Dye, 0,1µl Oligonukleotidprimer und 7,2µl RNase-freies Wasser. Von dem Mastermix wurden jeweils 20µl zu jedem cDNA Ansatz dazu gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde fest mit einer Folie verschlossen und die Proben bei 1000rpm, 5min bei RT herunter zentrifugiert. Danach wurden sie mit dem Sequence Detection System 7500HT gemessen. Anhand der Schmelzkurvenanalyse wurde dann die optimale Verdünnung der cDNA für die PCR bestimmt. Die cDNA aus humanen Zellen wurde dann zunächst noch einmal 1:10 verdünnt, während die cDNA aus Rattenzellkulturen nur 1:5 verdünnt wurde.

2.10.11 Schmelzkurvenanalyse

Unmittelbar nach der real-time RT-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Schmelzkurve gibt dabei ein zweidimensionales Profil des Schmelzpunktes des Amplifikats wieder. Da bei Verwendung von dsDNA-spezifischem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green Amplifikationsprodukte aller Art gebunden werden, konnten unspezifische

Amplifikationsprodukte so von den erwünschten Produkten unterschieden werden. Die Daten hierfür wurden in einem letzten Amplifikationszyklus bei 1min auf 95°C und dann schrittweisem Abkühlen der Temperatur alle 10sec um 0,2°C auf 65°C ermittelt. Dabei lagern sich die einzelsträngigen Amplifikationsprodukte ihrer Größe entsprechend zusammen. Die Daten werden nun gegen die Temperatur gerechnet und es bilden sich Graphen mit Gipfeln. Das Maximum der Gipfel stellt die Temperatur der maximalen Fluoreszenzveränderung dar und wird als Schmelzpunkt des Amplifikons bezeichnet (Nützel, 2005).

2.10.12 Real-time RT-PCR

Die real-time RT-PCRs wurden insgesamt für drei verschiedene Gruppen durchgeführt. Zunächst wurden die unstimulierten humanen Zellen untersucht. Dazu habe ich die cDNA der isolierten Monozyten, Leukozyten, HUVECs und HPA-SMCs wie beschrieben 1:10 verdünnt. Als 2. Versuch habe ich die mit MCP-1 stimulierten HUVECs und glatten Muskelzellen verglichen. Auch bei diesen Zellen wurde die cDNA 1:10 verdünnt. Die letzte real-time RT-PCR habe ich mit der aus der Ratte gewonnenen cDNA der Monozyten-, CNS-1 r-MCP-1 und CNS-1 pcDNA durchgeführt. Hier wurde die cDNA jedoch nur 1:5 verdünnt. Danach wurden jeweils Tripletts mit je 5µl cDNA auf eine Mikrotiterplatte ausplattiert, d.h. pro cDNA-Probe für ein Primerpaar wurden 3mal 5µl cDNA pipettiert. Das wurde für jedes Oligonukleotidprimerpaar wiederholt, auch für die β-Aktinprimer. Dazu wurden jeweils 3 Wasserkontrollproben pro Primer pipettiert. Es wurde wieder ein Mastermix nach bekanntem Schema (Abschnitt 2.10.10) erstellt. Von dem Mastermix wurden pro cDNA jeweils 20µl dazugegeben. Es ergab sich ein Reaktionsvolumen von 25µl. Die Mikrotiterplatte wurde wieder verschlossen, zentrifugiert und danach mit dem Sequence Detection System 7500HT gemessen.

2.10.13 Relative Nukleotidquantifizierung mittels real-time RT-PCR

Der sogenannte CT-Wert wurde für jedes einzelne Well vom Sequence Detection System 7500HT ermittelt. Da ich entweder Dupletts oder Tripletts für jede Probe verwendet habe, wurde zunächst das arithmetische Mittel als Quotient aus der Summe der CT-Werte (x) und der Anzahl (n) der CT-Werte berechnet. Danach wurde von den Mittelwerten der Proben der Mittelwert für das Aktin abgezogen, um die Proben anhand eines Eichwertes besser vergleichen zu können. Damit erhielt man den sogenannten ΔCT-Wert. Da mit dieser RT-PCR nur eine Aussage über die relativen Unterschiede der Expression der Proben

untereinander möglich war, mussten die einzelnen ΔCT-Werte zueinander in Beziehung gesetzt werden. Dies erfolgte durch die Ermittlung des ΔΔCT-Wertes. Dazu wurde ein ΔCT-Wert von sich selbst subtrahiert und damit auf null gesetzt. Von den restlichen ΔCT-Werten der anderen Proben wurde ebenfalls dieser Wert subtrahiert. Die nun entstandenen ΔΔCT-Werte wurden als negative Potenz von 2 zur relativen Expression der einzelnen Proben umgerechnet. Dabei ergibt sich für den ΔΔCT-Wert von 0 die relative Expression von 1 und die anderen Proben werden relativ zu 1 zu angegeben.

2.11 Formeln

arithmetisches Mittel (χ) = $\frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} X_i = \frac{X_1 + X_2 + ... + X_n}{n}$

Erwartungswert von X (μ) = E (X)

Varianz (Var (X)) = $E((X - \mu)^2)$

Standardabweichung (σ) = $\sqrt{Var(X)}$

STE/SEM = $\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$

arithmetisches Mittel der CT-Werte = $\frac{\text{Summe der CT-Werte einer Probe}}{\text{Anzahl (n) der Proben}}$

ΔCT-Wert = (Mittel der CT-Werte einer Probe) – (Mittel der CT-Werte von Aktin)

ΔΔCT-Wert = (ΔCT-Wert einer Probe) – (ΔCT-Wert von sich selbst bzw. anderen Proben)

Relative Expression = $2^{(-\Delta\Delta CT\text{-Wert})}$

3 Ergebnisse

Alle Ergebnisse meiner Arbeit habe ich anhand von typischen Beispielen dargestellt.

3.1 In-vitro-Untersuchungen der CNS-1-Gliomzellen

Die in meinen Untersuchungen verwendeten CNS-1-Gliomzellen (Abb. 5) unterschieden sich lediglich durch die Einbringung der rMCP-1-Sequenz mittels eines Vektors in die DNA und stammten von einer etablierten Zelllinie ab. Während in CNS-1-pcDNA-Zellen (Abb. 5 links) ein leerer Kontrollvektor eingebracht wurde, erhielten die CNS-1-rMCP-1-Zellen (Abb. 5 rechts) einen Vektor mit der genetischen Information für das MCP-1 der Ratte (Platten et al., 2003).

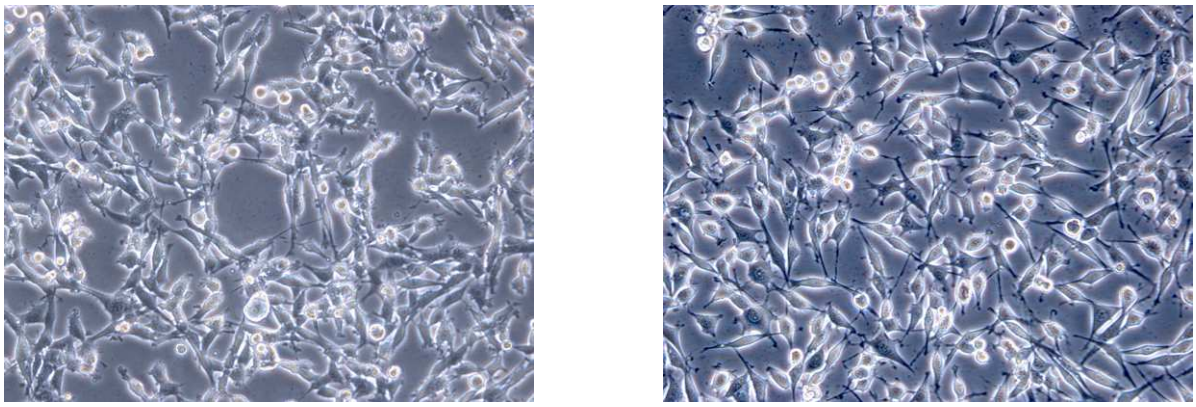


Abb. 5: Zellkultur von CNS-1-pcDNA-Kontrollzellen (links) und CNS-1-rMCP-1-Gliomzellen (rechts).

Bei meinen Untersuchungen in Zellkultur zeigten die Tumorzellen trotz gleicher Nährbedingungen unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten. So wuchsen die CNS-1-pcDNA-transfizierten Kontrollzellen durchweg etwas schneller als die CNS-1-rMCP-1-transfizierten Gliomzellen. Der *in-vitro*-Vergleich der beiden Zellkulturen im Proliferationsassay zeigte dann auch durchgehend eine geringere Wachstumsrate der CNS-1-rMCP-1-Gliomzellen gegenüber den CNS-1-pcDNA-Kontrollzellen. Zum Vergleich wurden zunächst die Mittelwerte der gemessenen Extinktionskoeffizienten verglichen. Dabei schienen bei niedriger Ausgangskonzentration von $1x10^3$ Zellen pro Well die Wachstumsraten noch annähernd gleich (Abb. 6), jedoch wurde mit steigender Zellzahl der Unterschied zwischen den beiden Zellreihen immer deutlicher mit einem Maximum bei $5x10^3$ Zellen pro Well (Abb. 7 & 10). Ab einer Zellzahl von $1x10^4$ Zellen pro Well flachte der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien wieder ab (Abb. 8).

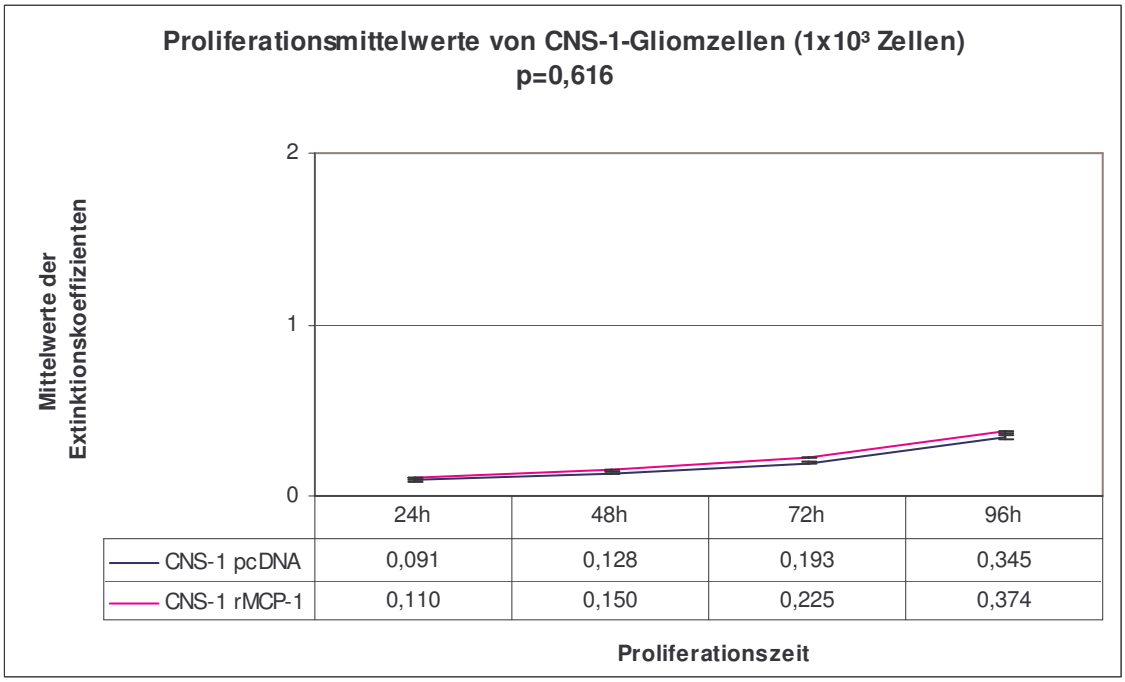


Abb. 6: Darstellung der Proliferation der CNS-1-Gliomzellen anhand der Mittelwerte der Extinktionskoeffizienten (n=8) mit SEM über die Proliferationszeit bei einer Zellausgangskonzentration von 1x10³ Zellen pro Well p= 0,61603; Beachte kein Proliferationsunterschied zwischen den CNS-1-rMCP-1-Gliomzellen und CNS-1-pcDNA-Gliomzellen bis 96h Proliferationszeit.

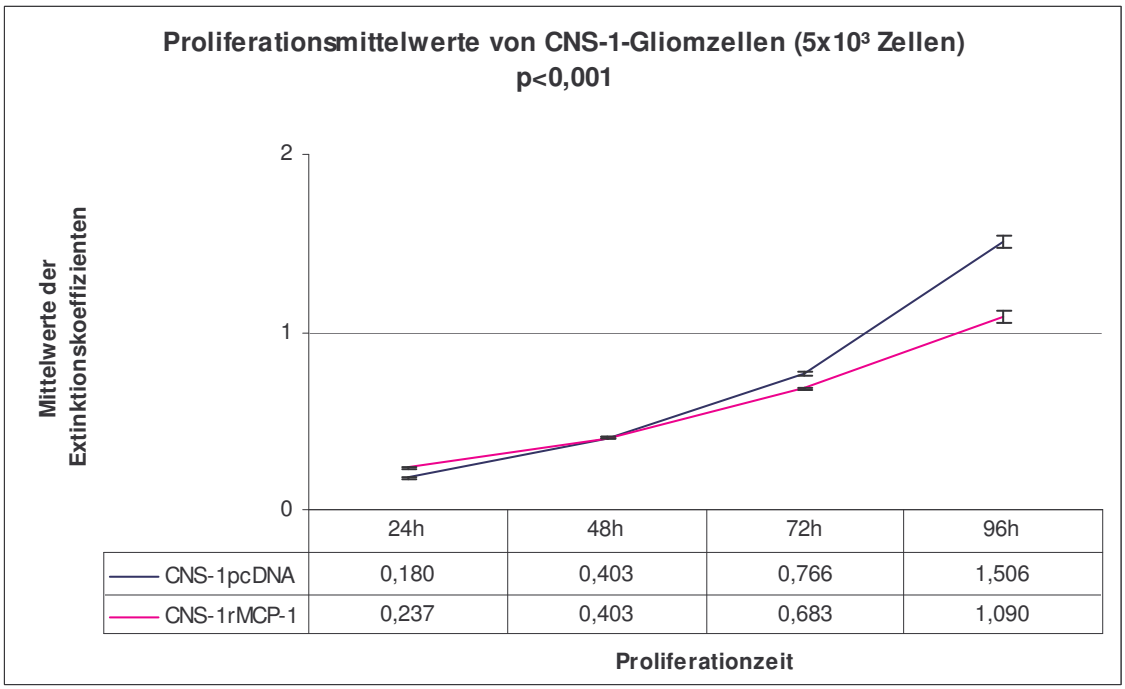


Abb. 7: Darstellung der Proliferation der CNS-1-Gliomzellen anhand der Mittelwerte der Extinktionskoeffizienten (n=8) mit SEM über die Proliferationszeit bei einer Zellausgangskonzentration von 5x10³ Zellen pro Well p< 0,001; Beachte die deutlich stärkere Proliferation der CNS-1-pcDNA-Kontrollzellen ab 72h Proliferationszeit.

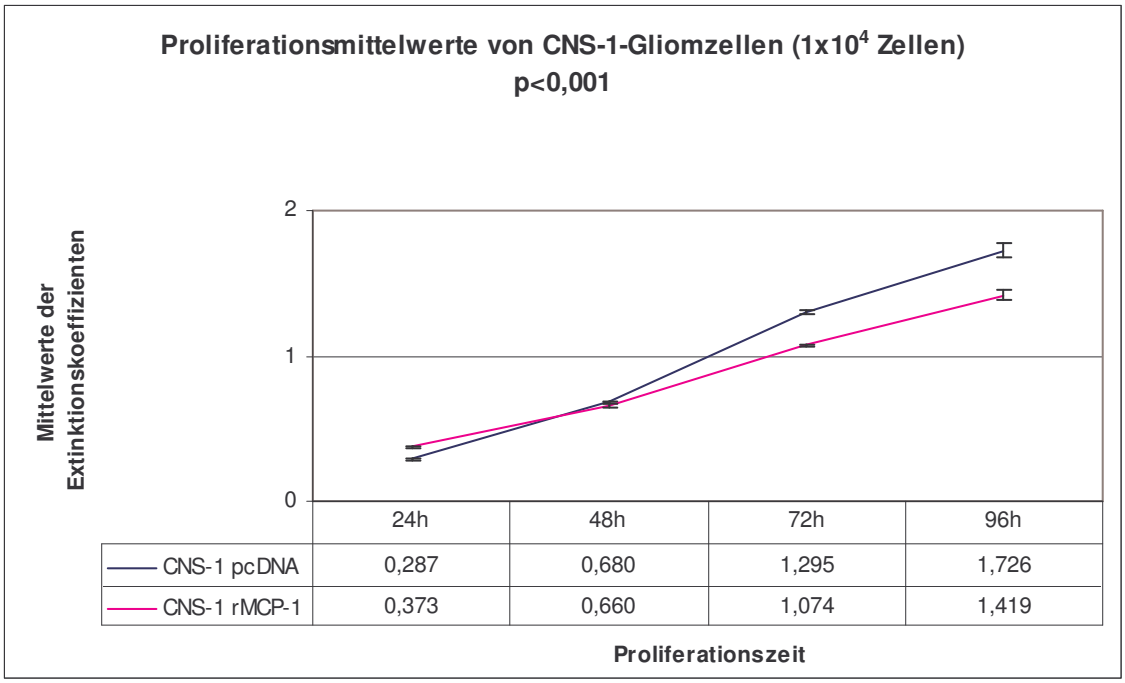


Abb. 8: Darstellung der Proliferation der CNS-1-Gliomzellen anhand der Mittelwerte der Extinktionskoeffizienten (n=8) mit SEM über die Proliferationszeit bei einer Zellausgangskonzentration von $1x10^4$ Zellen pro Well $p< 0,001$; Beachte den schwächeren Proliferationsunterschied der CNS-1-Gliomzellen bei 72h Proliferationszeit im Vergleich zu Abb.7.

Des Weiteren wurde die Steigerung des Wachstums verglichen. Auch hier zeigte sich ein Unterschied zwischen den Zelllinien wie zuvor beschrieben. Bei Konzentrationen von 5000 Zellen/Well betrug der Wachstumsfaktor/Steigerungsfaktor der CNS-1-pcDNA-Kontrollzellen das 1,4-1,8-fache des Steigerungsfaktors der CNS-1-rMCP-1-Tumorzellen (Abb. 9).

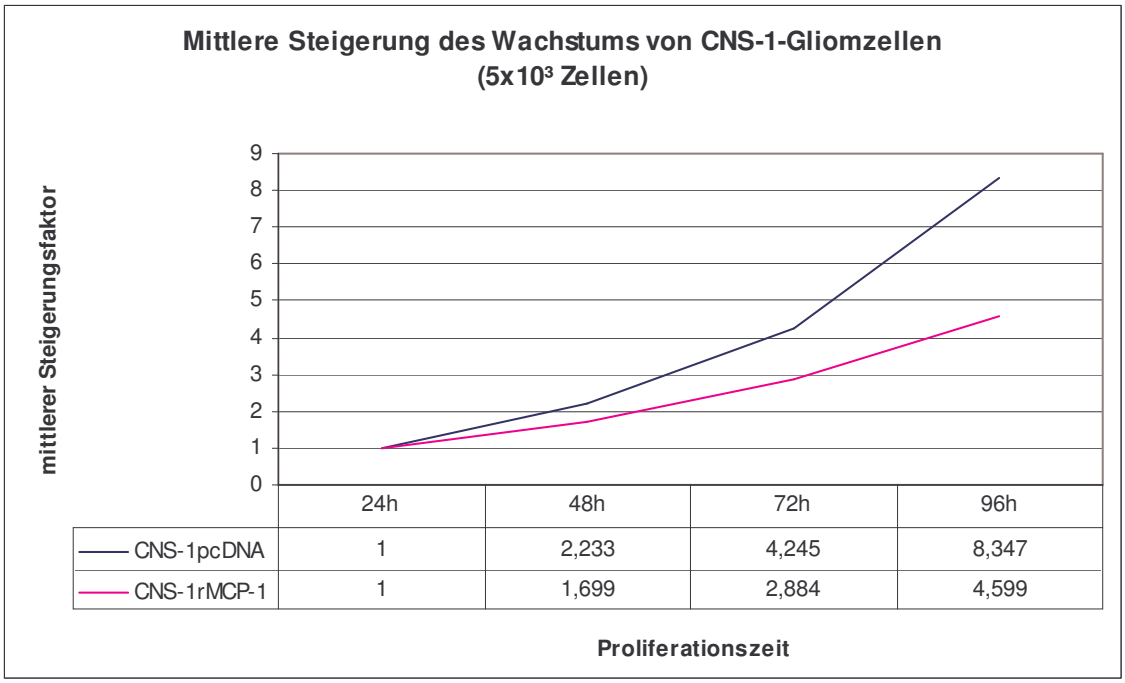


Abb. 9: Vergleich des Wachstums von CNS-1-Gliomzellen anhand des mittleren Steigerungsfaktors bezogen auf den ersten Messwert bei 24h und der Ausgangszellkonzentration von 5x10³ Zellen pro Well; Beachte die Steigerung des Wachstums der CNS-1-pcDNA-Gliomzellen um das Doppelte gegenüber den CNS-1-rMCP-1-transfizierten Gliomzellen nach 96h Proliferationszeit.

Zur Bestimmung der Signifikanz der Unterschiede wurde mit dem Programm Statistica mit einer 2 faktoriellen Anova der p-Wert bestimmt. Dieser lag bei Ausgangskonzentrationen von 1x10³ Zellen/Well bei p=0,61 und war demnach nicht signifikant. Erst ab einer Ausgangskonzentration von 2,5x10³ Zellen/Well waren die p-Werte sowohl für die einzelnen Messwerte der Zelllinien und die einzelnen Zeitpunkte der Messung als auch für das Produkt aus beidem kleiner 0,001. Da ein p-Wert kleiner 0,05 signifikant ist, ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Wachstum zwischen den beiden Zelllinien. Die nicht-MCP-1-transfizierten CNS-1-Kontrollzellen haben also *in vitro* einen Wachstumsvorteil vor den mit MCP-1 transfizierten CNS-1-Zellen und wachsen daher schneller.

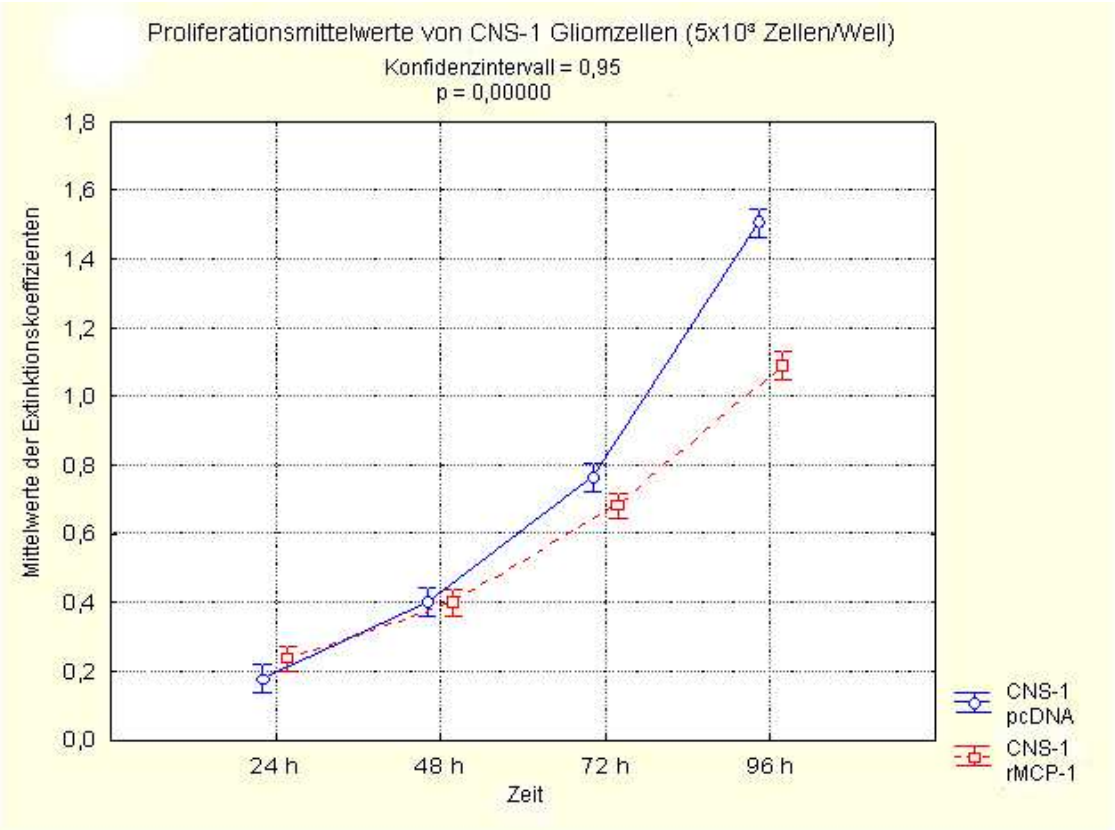


Abb. 10: Beispiel zur Darstellung der Wachstumskurve von CNS-1-Gliomzellen mit Statistica mit Box Plot (Ausgangszellkonzentration 5x10³ Zellen/Well; n=8). Beachte vergleichende Darstellung mit Excel in Abb.7.

3.2 Makroskopische Ergebnisse im CAM-Assay

3.2.1 CAM-Assay auf Gallus gallus domesticus und Coturnix coturnix japonica

Die CNS-1-rMCP-1-Gliomzellen wurden auf der CAM in 35 Eiern und die CNS-1-pcDNA-Kontrollzellen in 37 Eiern appliziert. Davon erfolgte bei beiden Tumorzelllinien für zwei Eier kein Wachstum von Tumoren, da die Embryonen abstarben. Bei den Kontrolltumoren zeigten 2 weitere kein Tumorwachstum. Also gab es kein erfolgreiches Wachstum bei 10,8% der Kontrolltumoren und 5,7% der MCP-1-Tumoren. Sonst kam es zum Anwachsen der Tumorzellen auf der CAM und es bildeten sich solide Tumorknoten oder größere Tumorkegel. In den Makrophotos von typischen Tumoren wurde schon bei subjektivem Vergleich ein stärkeres Wachstum der rMCP-1-transfizierten Tumoren (Abb. 11 D-F) im Gegensatz zu den Kontrolltumoren (Abb. 11 A-C) deutlich. Die Kontrolltumoren zeigten nur eine geringe Tendenz zur Bildung solider Tumoren. Sie bildeten kleine weißliche Flecken oder mäßig große Knoten aus. Das heißt, die *in vitro* schneller wachsenden Zellen, bildeten *in vivo* die kleineren Tumoren.

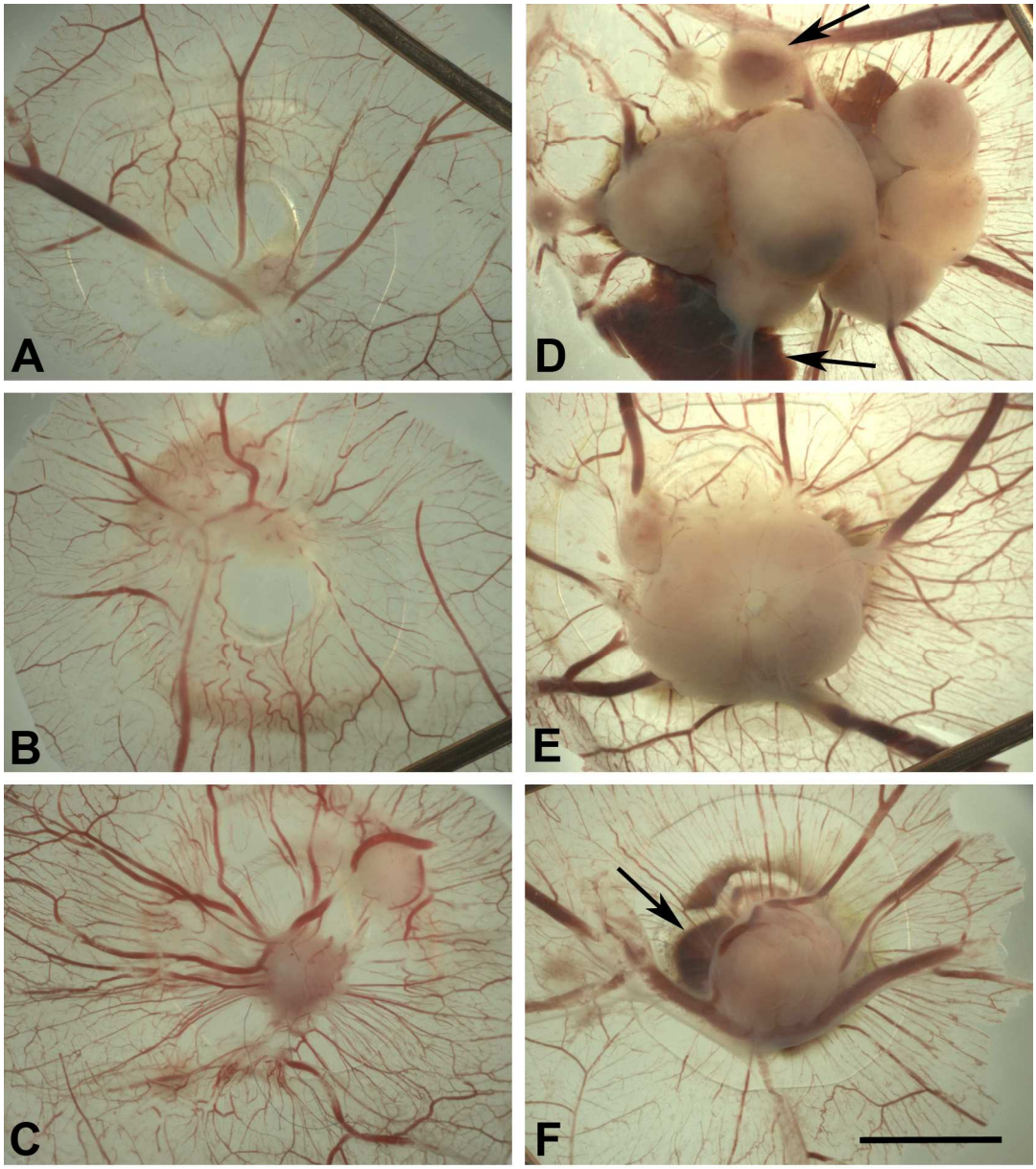


Abb. 11: CNS-1-Gliome auf der CAM von *Gallus gallus domesticus* an Tag 13 (mit Glutaraldehyd fixiert), Vergrößerung 0,8 x, Balken = 5mm; A, B und C) CNS-1-pcDNA-Kontrolltumoren; D, E und F) CNS-1-rMCP-1-transfizierte Gliome; Pfeile = Einblutungen; Beachte das deutlich stärkere Wachstum der rMCP-1-Gliome.

Weiterhin beobachtete ich eine Beeinflussung der CAM-Gefäße durch die Tumoren. Die Gefäße wuchsen in beiden Präparaten stark auf den Tumor zu, dies wurde entweder durch Trägereffekte der Thermanox-Trägerscheibe oder den Tumor selbst verursacht. So sind bei beiden Tumorzelllinien die Gefäße der CAM um den Tumor stark ausgeprägt (Abb. 11 A-F). Jedoch erschienen die großen kegelförmigen MCP-1-produzierenden Tumoren (Abb. 11 D-F & Abb. 12) innerhalb des Tumors wesentlich besser vaskularisiert (Abb. 12). Die Gliome waren z.T. blutig oder besaßen mäßig differenzierte Gefäßbäume mit kleineren und größeren Gefäßen, wobei die großen Gefäße bei Beobachtung am lebenden Präparat als Venen

identifiziert werden konnten. Ich habe morphologisch gleichartige Resultate bei Versuchen mit Wachteln beobachtet.

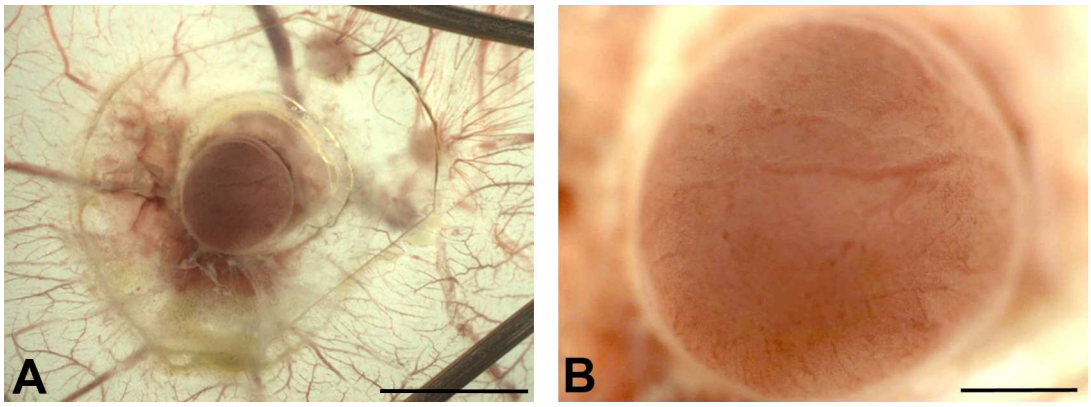


Abb. 12: CNS-1-rMCP-1-Tumor auf CAM von *Gallus gallus domesticus* an Tag 13 (mit Glutaraldehyd fixiert), A) Übersicht, Balken = 5mm, B) Vergrößerung, Balken = 1mm; Beachte das Gefäßsystem im Tumor bestehend aus Kapillaren und Venolen.

3.2.2 Bestimmung des Tumorvolumens

Bei der Bestimmung des Tumorvolumens habe ich 4 Kontrolltumoren mit 6 MCP-1-Tumoren verglichen. Dabei fiel auf, dass alle rMCP-1-transfizierten Tumoren zumindest ein doppelt so großes oder noch größeres Volumen als die Kontrolltumoren besaßen (Abb. 13).

Einzelne Tumorvolumina in „µl“

CNS-1 pcDNA	CNS-1 rMCP-1
50	150
20	90
60	300
20	100
	300
	200

Bei einem Vergleich der Mittelwerte, wurde ersichtlich, dass die Tumoren mit MCP-1-Produktion ca. 5mal größer als die Kontrolltumoren gewachsen waren (Abb. 13).

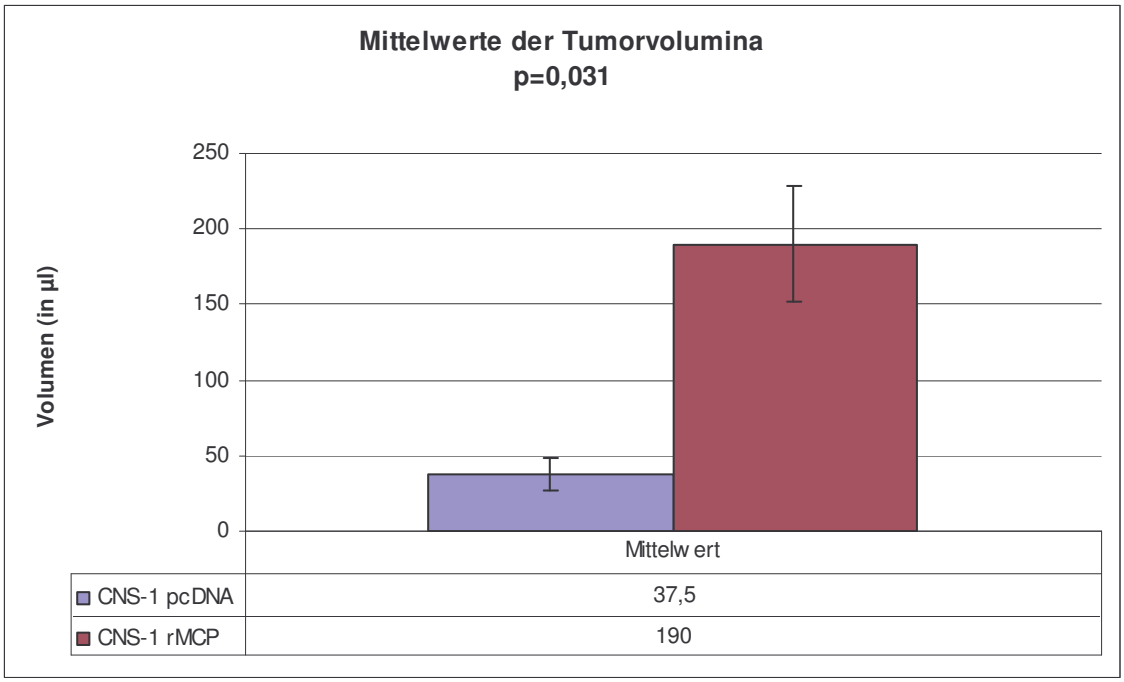


Abb. 13: Vergleich des mittleren Tumorvolumens (CNS-1 pcDNA n=4; rMCP-1 n=6) mit SEM, p = 0,031

Nach einer Analyse im Student-t-Test mit Statistica zeigte sich ebenfalls ein signifikanter p-Wert von 0,031, so dass es *in vivo* einen signifikanten Wachstumsvorteil der mit MCP-1 transfizierten Tumorzellen geben musste. Aufgrund der geringen Stichprobenanzahl ist dieser statistische Vergleich nicht valide. Er stimmt aber mit bereits publizierten Befunden bei Experimenten an Mäusen überein (Platten et al., 2003).

3.2.3 CAM-Assay mit humanem MCP-1

Zur Differenzierung zwischen allgemeinen Tumoreffekten und spezifischen MCP-1-vermittelten Effekten habe ich humanes MCP-1 auf die CAM 13 Tage alter Hühner- bzw. 11 Tage alter Wachtelembryonen appliziert. Am Embryonaltag 16 der Hühnerembryonen zeigten sich auf der 3 Tage behandelten CAM bei den 5 Negativkontrollen mit Aqua dest. sowohl bei normaler Hellfeldaufnahme als auch im Dunkelfeld praktisch ein normales Erscheinungsbild der CAM (Abb.14).

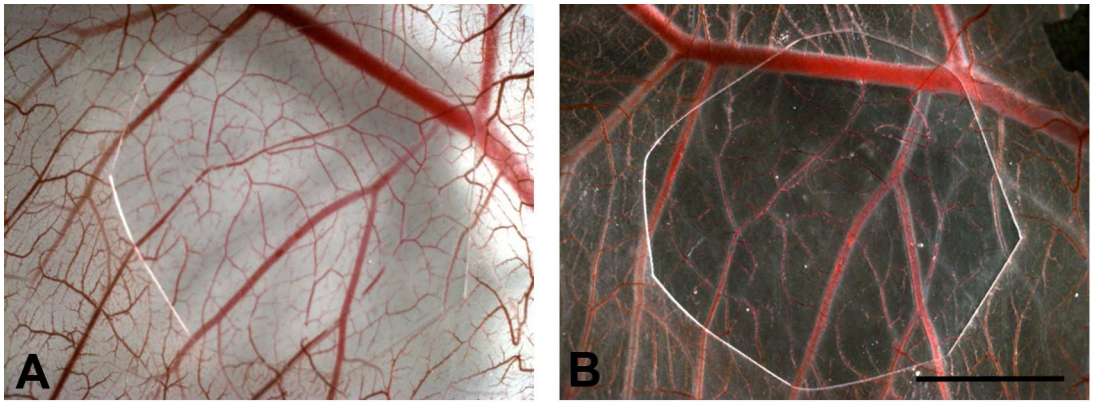


Abb. 14: Makroskopische Präparate der CAM mit Thermanoxscheibe als Substanzträger, aufgebracht an Tag 13 mit Aqua dest. (Negativkontrolle); Aufnahme von Präparat nach 3 Tagen mit Trägerauflage (mit Glutaraldehyd fixiert), A) Hellfeldaufnahme, B) Dunkelfeld, Balken = 2 mm; Beachte, dass keine Reaktion der CAM auf die 3 Tage aufliegende Trägerscheibe mit Aqua dest. (Negativkontrolle) stattgefunden hat.

Im Gegensatz dazu zeigten sich bei der Positivkontrolle (VEGF-A_{165}) typische Effekte in Sinne einer deutlichen Kapillarisierung der CAM im Applikationsbereich. Die Kapillaren waren vor allem am Rand des eingetrockneten Tropfens mit VEGF-A_{165} stark geschlängelt und fein, Bürsten-ähnlich verzweigt (Abb. 15).

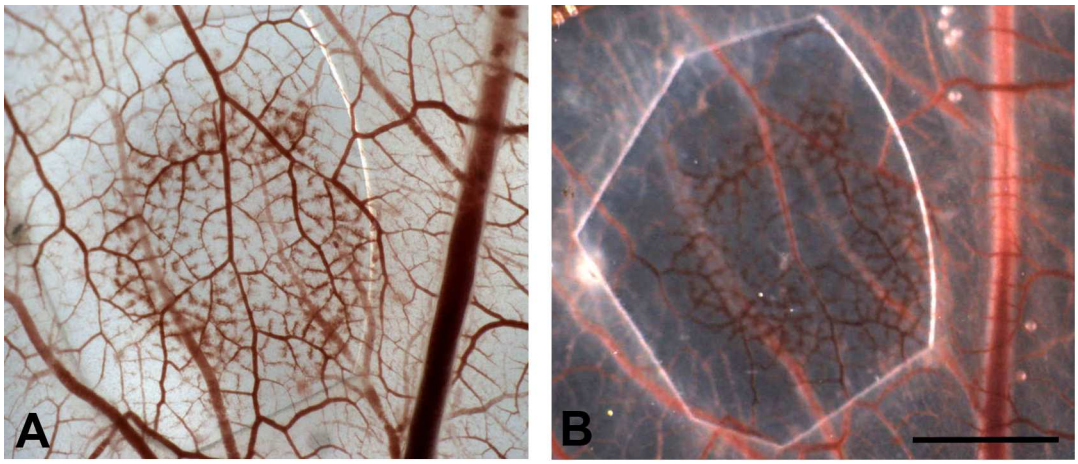


Abb. 15: Makroskopische Präparate der CAM mit Thermanoxscheibe als Substanzträger, aufgebracht an Tag 13 als Positivkontrolle mit VEGF-A_{165}; Aufnahme des Präparates nach 3 Tagen Trägerauflage (mit Glutaraldehyd fixiert), A) Hellfeldaufnahme, B) Dunkelfeld, Balken = 2mm; Beachte die starke Kapillarisierung der CAM im Applikationsbereich von VEGF-A_{165} (Positivkontrolle).

Bei den mit humanem MCP-1-behandelten CAM-Präparaten kam es zu keiner Reaktion der Gefäße (Abb. 16 A, 17 A). Die Gefäße unterhalb des Trägers wirkten eher abgeblasst. Nur im Dunkelfeld konnten weißliche Eintrübungen beobachtet werden (Abb. 16 B, 17 B), die bei den Positiv- und Negativkontrollen nicht vorhanden waren (Abb. 16 B). Es könnte sich

hierbei um eine Einwanderung von Bindegewebszellen oder anderer Zellen z.B. Zellen des Vogelimmunsystems handeln.

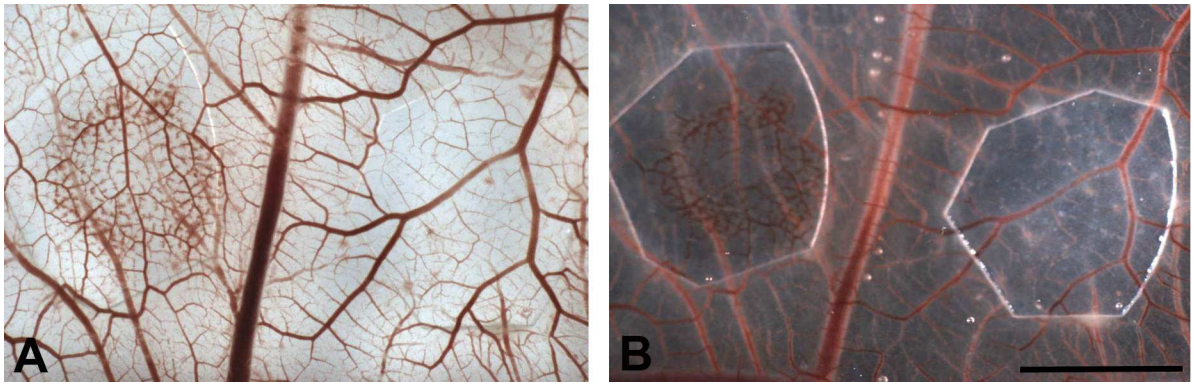


Abb. 16: Makroskopische Präparate der CAM mit Thermanoxscheibe als Substanzträger, aufgebracht an Tag 13 mit VEGF-A (linke Scheibe) und MCP-1 (rechte Scheibe), Aufnahme nach 3 Tagen Trägerauflage (mit Glutaraldehyd fixiert), A) Hellfeldaufnahme, B) Dunkelfeld, Balken = 5 mm; Beachte die Vaskularisierung unter VEGF-A (links im Bild, in A) und B)) und fehlende Reaktion (Hellfeld) bzw. weißliche Eintrübung (Dunkelfeld) unter MCP-1 (rechts im Bild).

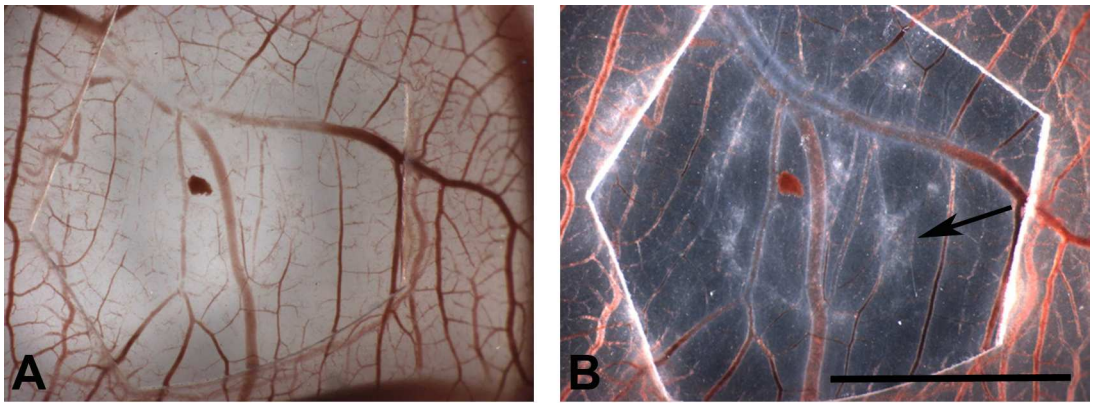


Abb. 17: Makroskopische Präparate der CAM mit Thermanoxscheibe als Substanzträger aufgebracht an Tag 13 mit MCP-1; Aufnahme nach 3 Tagen Trägerauflage (mit Glutaraldehyd fixiert); Vergrößerung aus Abb.16 A) Hellfeldaufnahme, B) Dunkelfeld, Pfeil = weißliche Eintrübung, Balken = 2,5mm; Beachte in dieser Vergrößerung die Reaktionen der CAM auf MCP-1: Im Hellfeld ist keine Reaktion sichtbar, während im Dunkelfeld weißliche Eintrübungen zu sehen sind.

3.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

3.3.1 HE-Färbung

Ich habe Paraffinschnitte von CNS-1-Tumoren, die auf der CAM vom Weißen Leghorn und der Japanischen Wachtel gewachsen waren, untersucht. Dabei wurden 7 Tage inkubierte MCP-1-transfizierte CNS-1-Gliome mit CNS-1-pc-DNA-transfizierten Gliomen

(Kontrolltumoren) verglichen. Für einen ersten histologischen Strukturvergleich habe ich eine HE-Färbung durchgeführt. In der HE-Färbung konnten die Tumoren gut vom CAM-Gewebe differenziert werden (Abb. 18). Die Kontrolltumoren waren kompakt und wirbelig strukturiert (Abb. 18 A), während die rMCP-1-transfizierten Gliome eine insgesamt aufgelockertere Struktur besaßen und sich schwieriger vom CAM-Gewebe abgrenzen ließen. Auch lagen die Tumorzellen weiter auseinander und verteilten sich mehr im angrenzenden CAM-Gewebe. Daher könnte man ein invasiveres Wachstum der MCP-1-Tumoren annehmen (Abb. 18 D). Die Vergrößerung zeigte bei den Kontrolltumoren kleinere Tumorzellen, die gedrängt und fast parallel aneinander lagen (Abb. 18 C). Gefäße waren im Tumorzentrum kaum oder gar nicht zu sehen (Abb. 18 B), könnten aber auch durch die Tumorzellen komprimiert worden sein. Vergrößerungen der mit MCP-1-transfizierten Gliome zeigten sehr große Tumorzellen, die locker nebeneinander lagen. Dazwischen waren viele Gefäße mit ihren Epithelzellen sichtbar. Die Vogelerythrozyten, welche im Gegensatz zum Menschen Zellkerne besitzen, waren ebenfalls gut zu erkennen, und ließen auf eine starke Perfusion dieser Gefäße und des Tumors schließen (Abb. 18 E). Bei stärkerer Vergrößerung zeigte sich in beiden Gliomgewebeschnitten Mitosefiguren der Gliomzellen und identifizierte diese als stark proliferierende Zellen (Abb. 18 C, F). Hierbei wurde noch einmal die stärkere und kompaktere Organisation der Kontrollzellen in einer Wirbelstruktur deutlich (Abb. 18 C), während die rMCP-1-transfizierten Zellen locker um Kapillaren herum lagen (Abb. 18 F).

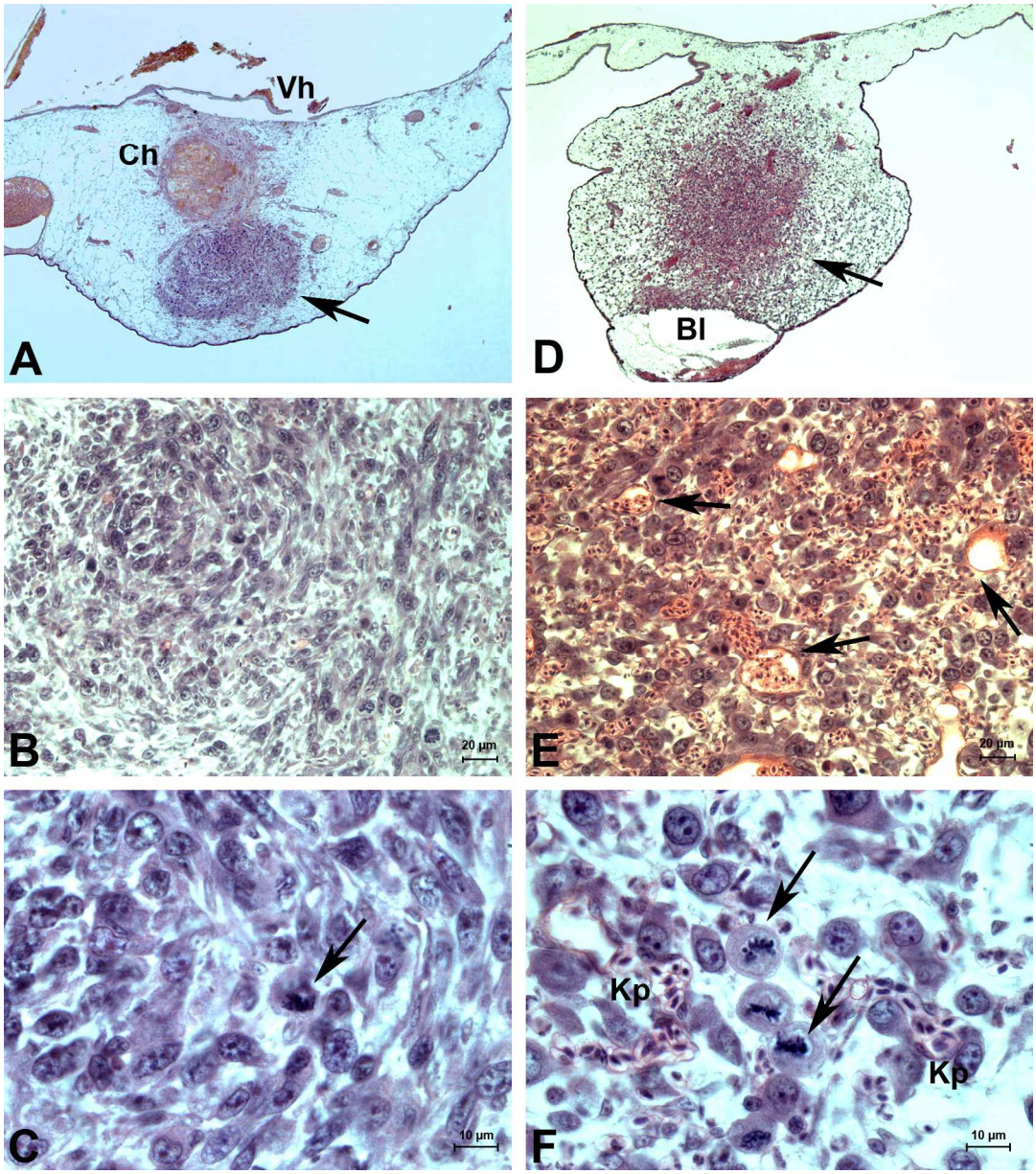


Abb. 18: Paraffinschnitte von CNS-1-Tumoren auf der CAM, HE-Färbung, A-C) CNS-1-pcDNA-Kontrolltumoren, D-F) CNS-1-rMCP-1-Tumoren; A) Übersicht, oben Chorion, unten Alantois, Vh = Verhornung des Chorionepithels an der Auflagestelle des Trägers, Ch = abgesunkenes Chorionepithel, Pfeil = Tumorgewebe; B) Vergrößerung mit 40-facher Objektivgröße aus A; C) Vergrößerung mit 100-facher Objektivgröße aus A, Pfeil = Mitosefigur von Gliomzellen; D) Übersicht, Bl = Einblutung, Pfeil = Tumorgewebe; E) Vergrößerung mit 40-facher Vergrößerung aus D, Pfeile = Gefäße mit Vogelerythrozyten (Zellkern sichtbar); F) Vergrößerung mit 100-facher Objektivvergrößerung, Kp = Kapillaren mit Erythrozyten, Pfeile = Mitosefiguren von Gliomzellen; Beachte die gut von der CAM abgrenzbaren Kontrolltumoren (links) mit eng beieinander liegenden Gliomzellen und die schlecht abgrenzbaren MCP-1-produzierenden Gliome (rechts) mit vielen Kapillaren. In beiden Tumoren sind viele Mitosefiguren zu sehen.

3.3.2 Immunperoxidase-Färbung

Ich habe die über einen Zeitraum von 7 Tage gewachsenen Gliome der Hühner-CAM entnommen, Paraffinschnitte angefertigt und zur Darstellung des Glattmuskel-Aktinanteils der Tumoren mit anti-α-SMA-Antikörpern gefärbt. Die Peroxidasefärbung zur Visualisierung der anti-α-SMA-Antikörper zeigte Glatt-Muskelaktin in Myofibroblasten und glatten Muskelzellen. Dabei fiel am Chorion eine starke Myofibroblastenansammlung auf (Abb. 19, Pfeil), die wahrscheinlich durch die Irritation aufgrund der Trägerscheibe entstanden war. Dieses ist als eine Art der Wundheilung zu interpretieren. Bei den MCP-1-transfizierten Gliomen scheint dabei im Vergleich zu den Kontrolltumoren die Narbenbildung intensiver zu sein. Ebenso erschienen die Gefäße der Kontrolltumoren wesentlich englumiger als die der MCP-1-produzierenden Tumoren (Abb. 19 - Pfeilspitzen).

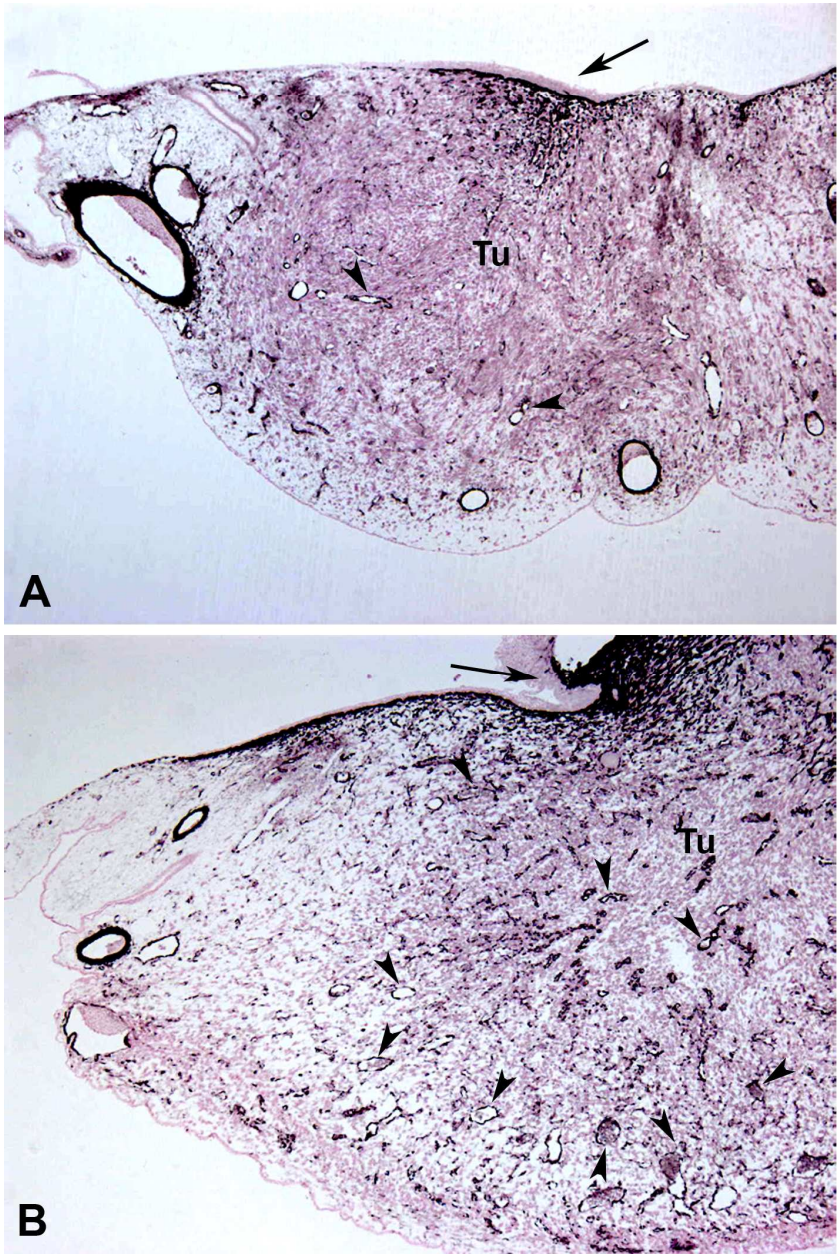


Abb.19: Paraffinschnitte: CNS-1-Tumoren mit Peroxidase-Färbung des anti-α-SMA-Antikörpers und Kernechtrot-Gegenfärbung Übersichten: A) CNS-1-pcDNA- Kontrolltumor, B) CNS-1-rMCP-1-Tumor, Pfeil = Myofibroblasten, Tu = Tumor, Pfeilspitzen = Gefäße mit Peroxidase-positiver Glattmuskel-Aktinummantelung; Beachte die starke Färbung des Chorions durch Myofibroblasten an der Auflagestelle des Trägers und die ausgeprägteren Gefäße mit Media in den rMCP-1-transfizierten Gliomen.

Bei stärkerer Vergrößerung war eine Anlagerung der Gliomzellen an die Media der peripheren Gefäße bei beiden Zelllinien zu beobachten. Dabei konnte jedoch nur bei den MCP-1-produzierenden Tumoren eine Einwanderung in die Media beobachtet werden (Abb. 20 D). Jedoch reagierten die glatten Muskelzellen der Media bei beiden Zelllinien auf Stimuli des Tumors. Abbildung 20 B demonstriert auch bei den Kontrolltumoren auf der Tumor zugewandten Seite ein sehr unruhiges, auf Migration hindeutendes Bild der Media, während auf der abgewandten Seite die glatten Muskelzellen ein ruhigeres Bild zeigen.

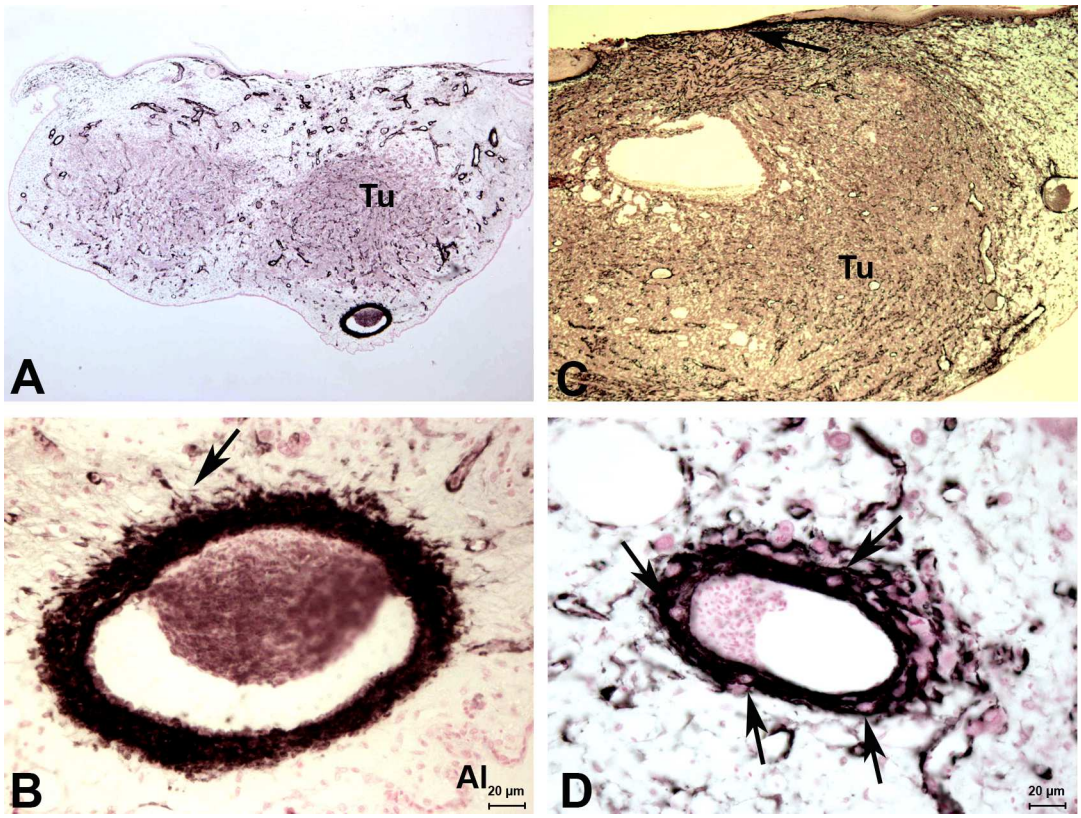


Abb. 20: Paraffinschnitte von CNS-1 Gliomen nach Peroxidase-Färbung mit anti-α-SMA-Antikörpern und Kernechtrot-Gegenfärbung, A-B) CNS-1 pcDNA Kontrolltumor, A) Übersicht, Tu = Tumor, B) 40-fache Objektivvergrößerung aus A zeigt eine periphere Arterie, Al = Allantois, Pfeil = glatte Muskelzellen der Media; C-D) CNS-1 rMCP-1 transfizierter Tumor, C) Übersicht, Tu = Tumor, Pfeil = viele Myofibroblasten, D) 40-fache Objektivvergrößerung einer peripheren Arterie, Pfeile = Tumorzellen an und in der Media; Beachte die unruhige Struktur der dem Tumor zugewandten Seite der Media als Hinweis auf Migration der glatten Muskelzellen bei Kontrolltumoren und rMCP-1-transfizierten Gliomen. Zusätzlich ist bei rMCP-1-transfizierten Gliomen eine Einwanderung von Tumorzellen in die Media zu beobachten.

3.4 Untersuchungen mittels Immunfluoreszenztechniken

3.4.1 Quantifizierung mit anti-α-SMA-Färbungen

Zur Quantifizierung der mit anti-α-SMA-Antikörpern gefärbten Paraffinschnitte habe ich bei 5-8 in Hühner- und Wachteleiern produzierten Tumoren den prozentualen Anteil der α-SMA-Fluoreszenz an der Gesamtfläche des Bildausschnitts bestimmt. In Bezug auf die Gesamtfläche eines Ausschnitts, die Anzahl der Schnitte und die Anzahl der Schnittebenen wurde der prozentuale Anteil des Fluoreszenzvolumens vom untersuchten Gesamtvolumen ermittelt. Bei allen rMCP-1-transfizierten Gliomen lag die prozentuale Fluoreszenz des Gesamtvolumens deutlich höher als bei den Kontrolltumoren (Abb. 21). Dabei ergab sich bei den Kontrolltumoren ein Mittelwert von 9,15% und bei den rMCP-1-Gliomen ein Mittelwert von 19,57%. Da anti-α-SMA-Antikörper selektiv an glattes Muskelaktin in glatten Muskelzellen oder Myofibroblasten binden und nur dort auch der Floureszenzantikörper bindet, dessen Floureszenz gemessen wurde, wiesen die rMCP-1-Tumoren einen höheren Anteil an Myofibroblasten oder glatten Muskelzellen auf.

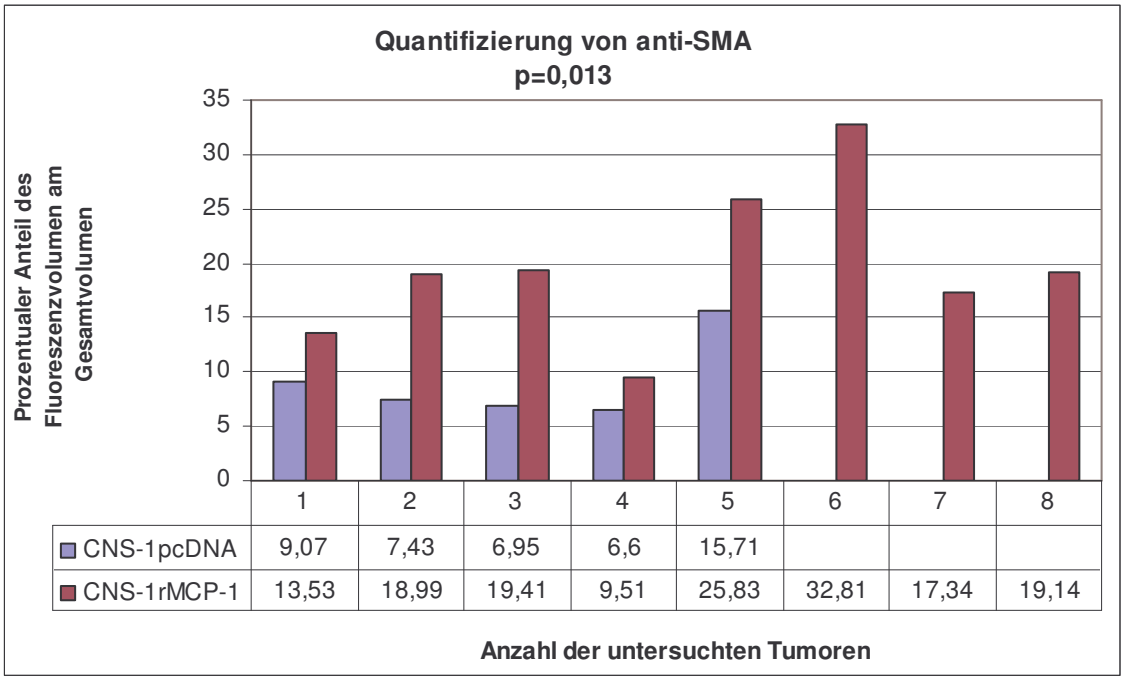


Abb. 21: Quantitativer Vergleich der anti-α-SMA-Fluoreszenz von CNS-1-Gliomen (Paraffinschnitte): Prozentualer Anteil des Fluoreszenzvolumens am untersuchten Gesamtvolumen des Tumors. Das Fluoreszenzvolumen war in den MCP-1-transfizierten Gliomen signifikant höher als in den Kontrolltumoren (p=0,013).

Eine statistische Auswertung erfolgte mit dem Student-t-Test mittels Statistica. Dabei ergab sich ein p-Wert von 0,013. Damit ergibt sich ein signifikanter Unterschied des Fluoreszenzvolumens. Dieses Ergebnis ist aufgrund des geringen Stichprobenumfangs lediglich hinweisend, jedoch sind die Unterschiede der Mittelwerte als eindeutig zu werten.

3.4.2 QH1- und Anti-α-SMA-Doppelfärbung von Wachtel-Paraffinschnitten

Ich habe experimentelle Gliome aus der Wachtel-CAM ausgeschnitten und die Paraffinschnitte sowohl mit QH1- als auch anti-α-SMA-Antikörpern behandelt, um die Interaktion von Glattmuskelaktin-positiven Zellen und Endothelzellen darzustellen. Der QH1-Antikörper markiert Endothelzellen und Leukozyten der Wachtel. Zum einen konnte ich bei den Kontrolltumoren wieder das Bild des dicht gepackten, spindelförmigen Glioms beobachten (Abb. 22), während zwischen den MCP-1-produzierenden Gliomzellen deutliche Interzellularräume vorhanden waren (Abb. 24-27). Zum anderen war in den rMCP-1-Gliomen ein deutlicheres Signal des QH1-Antikörpers zu sehen. Es zeigte sich jedoch im Allgemeinen eine starke Einwanderung von Wachtelzellen, also Endothelzellen und Immunzellen, in den Tumor. Bei genauerer Analyse sah man eine Auskleidung von Gefäßen mit einer durch QH1-angefärbten Zellschicht (Abb. 23 A, D, 24 A, D, 26 D). Die innerste Schicht von Gefäßen stellen Endothelzellen dar, die QH1 grundsätzlich anfärbt. Somit stammten die Endothelzellen der Tumorgefäße aus der Wachtel. Auch die Anfärbung mit anti-α-SMA zeigte bei beiden Gliomarten ein Signal. Dennoch zeigten die mit MCP-1 transfizierten Gliome eine stärkere Anfärbung durch anti-α-SMA. Anti-α-SMA-Antikörper kennzeichnen u.a. das Glatt-Muskelaktin von Muskelzellen in der Media. Nur differenzierte arterielle und venöse Gefäße besitzen eine Media. Sollten also in den Tumoren Gefäße mit Endothel und Media existieren, so wäre dies ein Hinweis auf das Vorhandensein von Leitungsbahnen in den Gliomen. Die Endothel-Anfärbung durch den QH-1-Antikörper ließ zwar auf eine Vaskularisierung der Kontrolltumoren schließen. Im Mischbild zeigte sich jedoch keine Kolokalisation mit der Fluoreszenz des durch α-SMA-rb-Antikörper angefärbten Glatt-Muskelaktins. Daher schienen im Kontrolltumor nur wenig differenzierte und unzureichend perfundierte Leitungsbahnen zu existieren. Nur bei einigen großen Gefäßen zeigte sich eine Schichtung von roter Floureszenz des QH1-Antikörpers innen und einer äußeren Schicht grüner Fluoreszenz des α-SMA-Antikörpers. Diese Gefäße befanden sich jedoch nur am äußeren Rand des Tumors, so dass man hier von präexistenten Gefäßen der CAM ausgehen konnte

(Abb. 22 & 23). Eine durch den Tumor bewirkte Arteriogenese konnte ich aber nicht ganz ausschließen.

In Abbildung 23 zeigten die Kontrolltumoren neben markiertem Endothel auch Einzelzellen, die mit QH-1 angefärbt wurden. Da der QH1-Antikörper außer Endothelzellen auch Leukozyten der Wachtel markiert, konnte also von einer Infiltration des Tumors durch Leukozyten ausgegangen werden. Am Tumorrand zeigte sich erneut eine stärkere Anfärbung mit Anti-Glatt-Muskelaktin, aber auch hier nur um die präexistenten Gefäße der CAM. Im Tumor gab es, wie bereits festgestellt, keine Kolokalisation zwischen QH-1 und α-SMA. Die Gefäße der Kontrollgliome besitzen also keine Media und sind als englumige Kapillaren einzustufen.

Die rMCP-1-transfizierten Gliome wiesen eine stärkere QH1-Endothel-Färbung auf als die Kontrolltumoren (Abb. 24 B vs. 22 B und 23 B). Ich konnte somit eine deutlich höhere Kapillarisierung der Tumoren beobachten. Des Weiteren fanden sich vor allem im Randbereich der Tumoren viele QH-1-gefärbte Strukturen (Abb. 24 B). Die Abbildungen der rMCP-1-Tumorschnitte (Abb. 24 D, 26 D, 27 B) zeigten zusätzlich eine Anfärbung mit DAPI. DAPI färbt alle Zellkerne. Offensichtlich handelte es sich bei den QH1-positiven Rundzellen um eingewanderte Leukozyten der Wachtel, eventuell auch um Endothelzellen von Kapillaren. Der anti-α-SMA-Antikörper färbte ebenso wie QH-1 mehr Zellen in den rMCP-1-transfizierten Gliomen an als in den Kontrollgliomen. Auch zeigten sich in rMCP-1-transfizierten Gliomen größere Gefäße als in den Kontrolltumoren. Da Vogelerythrozyten Zellkerne besitzen, färben sich die Erythrozyten durch DAPI an. So konnte man viele einzelne Gefäße in diesen Gewebeschnitten identifizieren (Abb. 27 A, 24 & 26). Diese zeigten auch eine Schichtung mit QH1-Antikörpern innen und anti-α-SMA-Antikörpern außen (Abb. 24 D & 26 D – Pfeile). Somit schienen die transfizierten Tumoren stark vaskularisiert zu sein und die Gefäße waren strukturierter, als in den Kontrolltumoren.

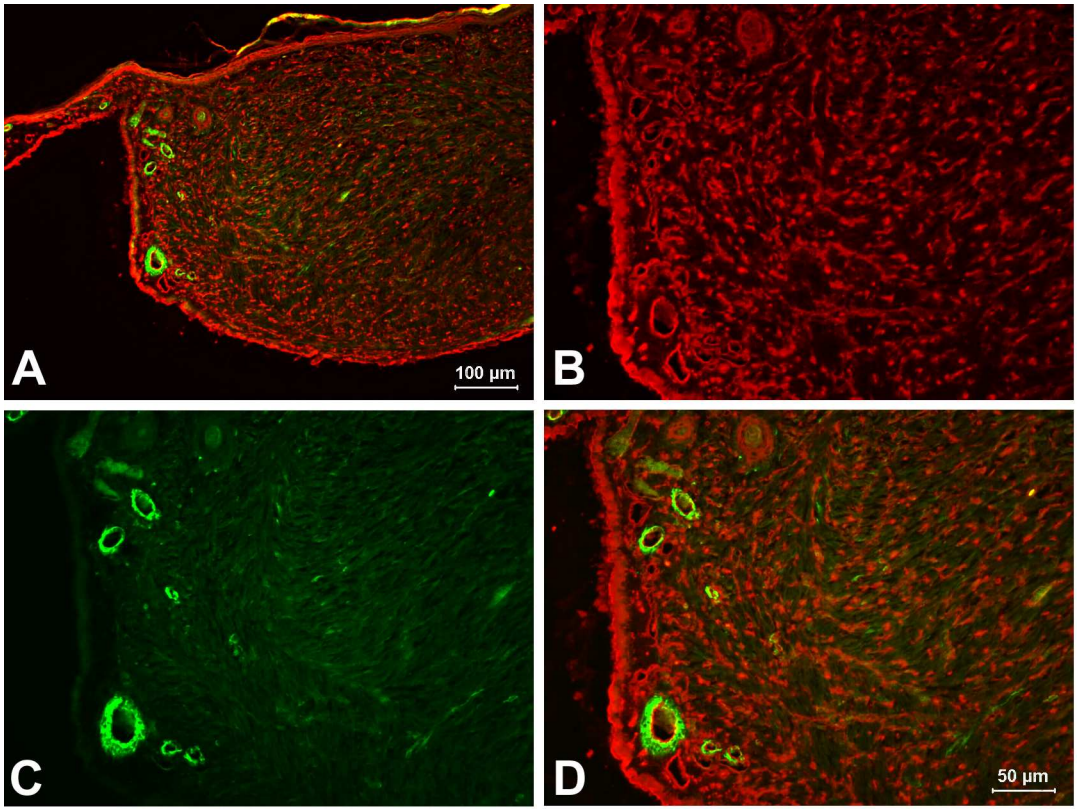


Abb. 22: CNS-1-pcDNA-Kontrolltumor, Immunfluoreszenz Färbung: QH1 - Antikörper = rot, anti-α-SMA-Antikörper = grün; A) Übersicht des Kombinationsbildes in 10-facher Objektivvergrößerung; B und C) Vergrößerungen der Einzelfärbungen mit 20-facher Objektivvergrößerung, D) Kombinationsbild (von B und C) als Ausschnitt von A); Größere Gefäße sind in den Kontrolltumoren nur in der Tumorperipherie zu finden.

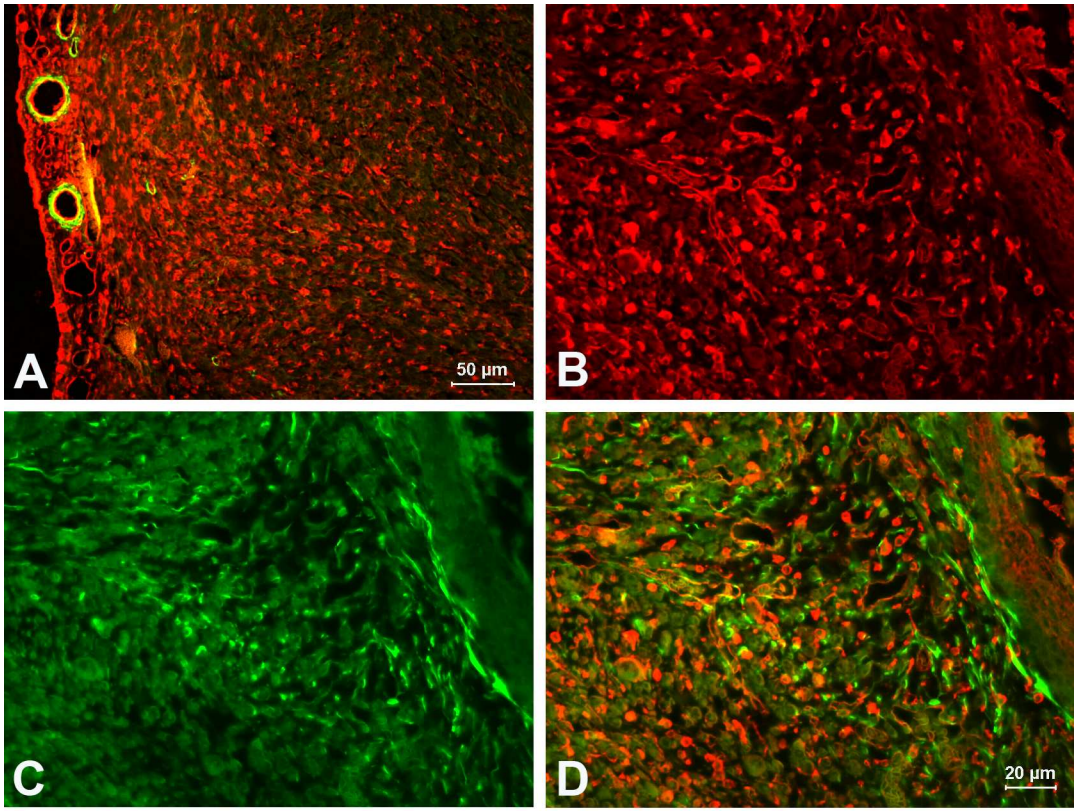


Abb. 23: CNS-1-pcDNA-Kontrolltumor, Immunfluoreszenz Färbung: QH1-Antikörper = rot, anti-α-SMA-Antikörper = grün; A) Übersicht des Kombinationsbildes in 20-facher Objektivvergrößerung; B und C) Vergrößerung der Einzelfärbungen mit 40-facher Objektivvergrößerung, D) Kombinationsbild (von B und C) als Ausschnitt von A); Färbung vieler Zellen mit QH-1 zeigte die Einwanderung von Wachtelleukozyten in die Kontrolltumoren. Färbung mit anti-α-SMA-Antikörper zeigt das Vorkommen von Myofibroblasten im Kontrolltumor an. In der CAM war eine Schichtung der großen Gefäße in Endothel (QH1 – rot) und Media (anti-α-SMA – grün) erkennbar.

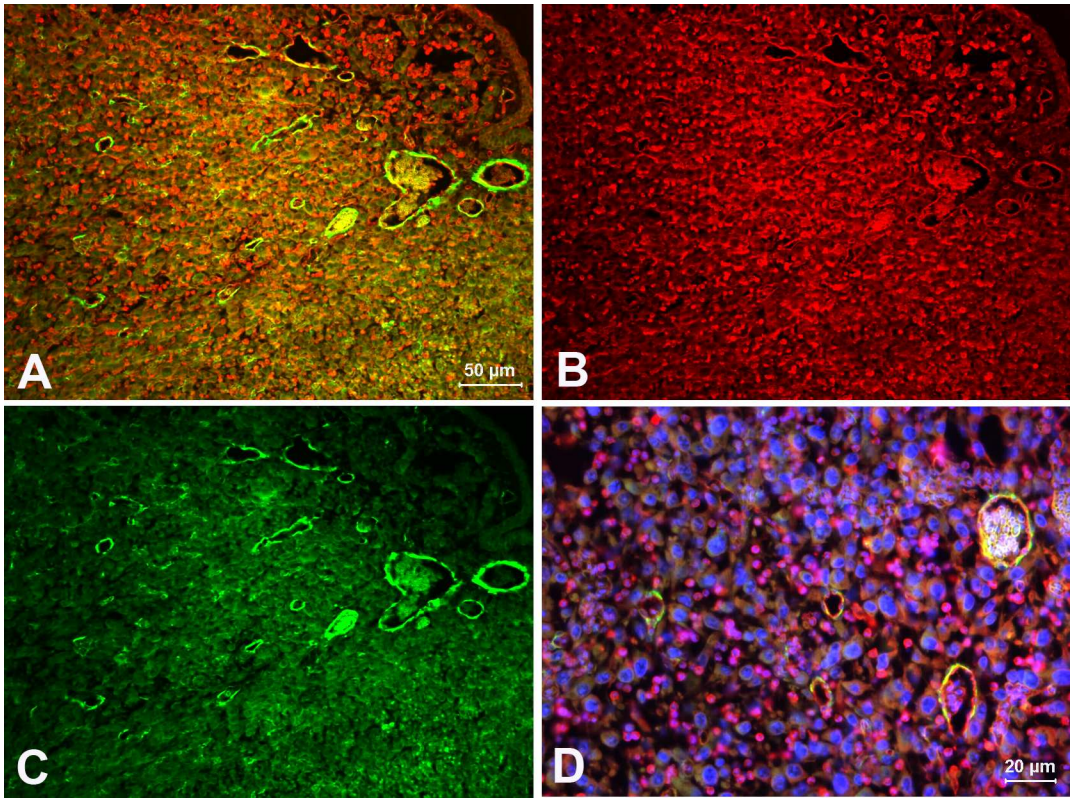


Abb. 24: Paraffinschnitt von CNS-1-rMCP1-transfizierten Gliomen; Immunfluoreszenzfärbung: QH1-Antikörper = rot, anti-α-SMA-Antikörper = grün, DAPI = blau, A) Übersicht des Kombinationsbildes aus B und C mit 20-facher Objektivvergrößerung; B & C) Einzelfärbungen bei 20-facher Objektivvergrößerung, D) Kombinationsbildes mit zusätzlicher DAPI-Färbung in 40-facher Objektivvergrößerung; Im Vergleich mit den Kontrolltumoren sieht man bei den rMCP-1-transfizierten Gliomen eine höhere Anzahl der durch QH1- und anti-α-SMA-Antikörper gefärbten Zellen. Ebenfalls sind mehr Gefäße mit einer Media zu sehen. Die DAPI-Färbung in D zeigt mehr Vogelerythrozyten in den Gefäßen.

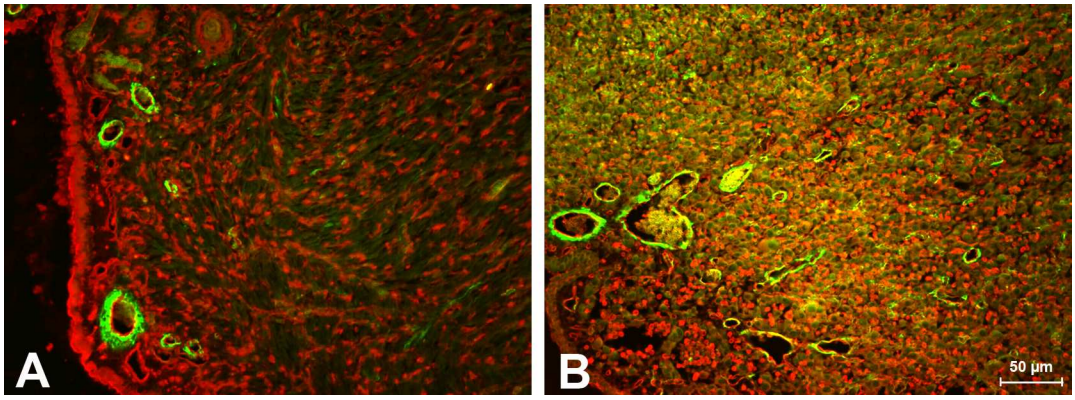


Abb. 25: Vergleich von CNS-1-Gliomen; Immunfluoreszenzfärbung: QH1-Antikörper = rot; anti-α-SMA-Antikörper = grün; Kombinationsbilder in 20-facher Objektivvergrößerung A) CNS-1-pcDNA-Kontrolltumor (siehe Abb. 22 D); B) CNS-1-rMCP-1-transfiziertes Gliom (siehe Abb. 24 A). Beachte die größere Anzahl an Glattmuskelaktin-positiven Leitungsbahnen in rMCP-1 Gliomen.

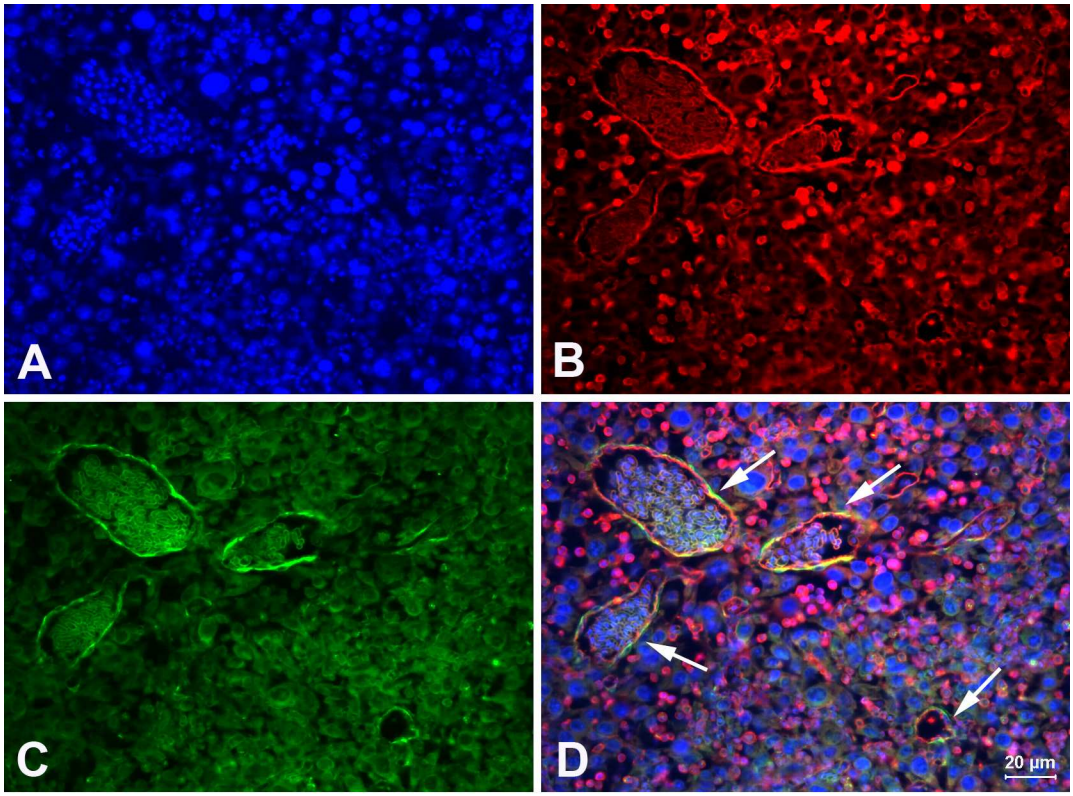


Abb. 26: Paraffinschnitt von CNS-1-rMCP1-transfizierten Gliomen in 40-facher Objektivvergrößerung; Immunfluoreszenz Färbung: QH1-Antikörper = rot, anti-α-SMA-Antikörper = grün, DAPI = blau; A-C) Einzelfärbungen, D) Kombinationsbild; Im Kombinationsbild kann man die Schichtung der Gefäßwände gut erkennen. Die QH1-positiven Rundzellen sind Leukozyten.

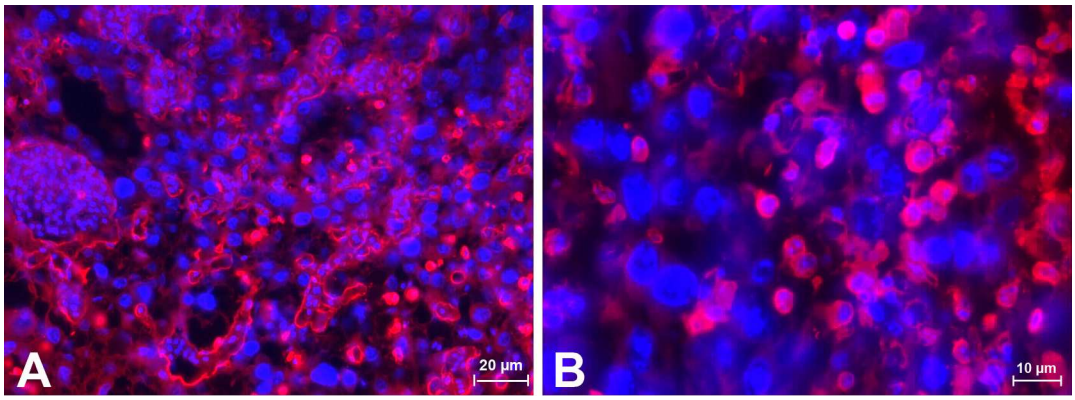


Abb. 27: Paraffinschnitt von CNS-1-Tumorgewebe aus dem Wachtel-CAM-Assay: CNS-1-rMCP1-transfizierter Tumor; Immunfluoreszenz Färbung: QH1-Antikörper = rot, DAPI = blau; A) Kombinationsbild in 40-facher Objektivvergrößerung, B) Kombinationsbild in 100-facher Objektivvergrößerung. In der hohen Vergrößerung von rMCP-1-transfizierten Gliomen zeigt sich, dass die QH1-gefärbten Rundzellen einen Zellkern besitzen.

3.4.3 GFAP-α-SMA-Färbung von Hühner-Paraffinschnitten

Eine Färbung mit dem anti-GFAP-Antikörper markiert Gliazellen und auch Gliomzellen, die von Gliazellen abstammen. In den Präparaten zeigte sich jedoch lediglich eine Autofluoreszenz der Zellen. Der anti-α-SMA-Antikörper färbte die Strukturen normal an. In den Präparaten (Abb. 28) konnten Tumorzellen gefunden werden, die sich um ein Gefäß in der Peripherie des Tumors gruppierten. Dabei bildeten sie die Struktur einer unechten Rosette. Das Gefäß war dabei das Zentrum und die Tumorzellen lagerten sich kreisförmig drum herum. Hier bestand also eine Analogie zu humanen Hirntumoren der Klasse der Gliome. Weiterhin zeigte sich nochmals die hohe Affinität der Tumorzellen zu den Gefäßen des Wirtsorganismus.

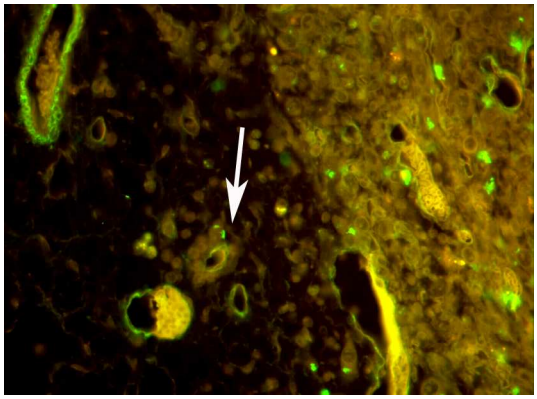


Abb. 28: CNS-1-rMCP1-transfizierter Tumor. Immunfluoreszenz: GFAP-Antikörper = rot, a-SMA-Antikörper = grün, 40-fache Objektivvergrößerung, Pfeil = unechte Rosette

3.5 Histologische Untersuchungen der CAM nach MCP-1-Stimulation

Von der mit humanem MCP-1 stimulierten Wachtel-CAM habe ich Färbungen mit dem QH1-Antikörper in Kombination mit DAPI angefertigt, um eine mögliche Leukozyteneinwanderung zu untersuchen. Zusätzlich wurden Semidünnschnitte mit Methylenblaufärbung angefertigt, um die Veränderungen der CAM unter MCP-1 darzustellen. Die Stimulation der CAM mit humanem MCP-1 (MCAF) zeigte vereinzelte, kleinere Leukozyten-Ansammlungen in der Nähe von Gefäßen. Dies konnte sowohl an Paraffinschnitten durch Immunfluoreszenz-Färbung mit QH1-Antikörpern, als auch an Semidünnschnitten mit Methylenblau-Färbung deutlich gemacht werden. In der Methylenblau-Färbung wurde eine Granulierung im Plasma der Leukozyten deutlich, daher handelte es sich hierbei offensichtlich um Granulozyten. Insgesamt war aber im Vergleich mit den Positiv- und Negativkontrollen kein signifikanter Unterschied feststellbar. Dies betrifft sowohl die erwartete Monozyteninfiltration durch Chemotaxis, als auch eine erhöhte Gefäßentstehung (Abb. 29).

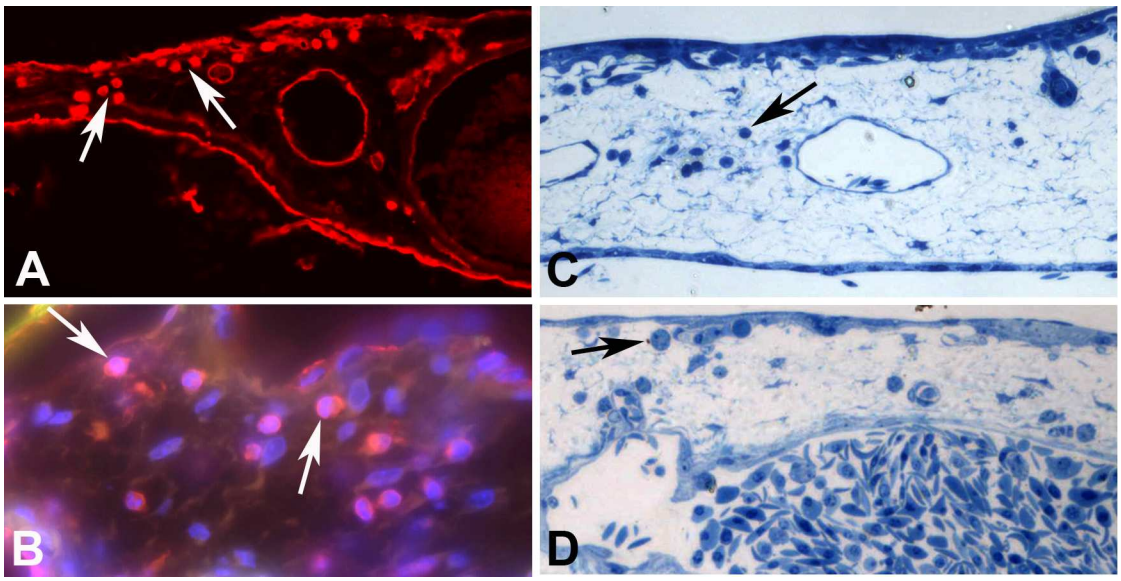


Abb. 29: Gewebeschnitte der CAM nach 3 Tagen MCP-1-Stimulation, Pfeile = Leukozyten; A & B Immunfluoreszenz-Färbung: A) QH1-Antikörper in 40-facher Objektivvergrößerung, B) Kombinationsbild (QH1, DAPI) in 100-facher Objektivvergrößerung; C & D) Semidünnschnitte mit Methylenblaufärbung in 40-facher Objektivvergrößerung. Sowohl die Immunfluoreszenz, als auch histologische Färbungen mit Methylenblau zeigten Leukozyteneinwanderungen in die Wachtel-CAM nach MCP-1-Stimulation, jedoch ergab sich kein deutlicher Unterschied zu den Positiv- (VEGF-A) und Negativkontrollen.

3.6 In-vitro-Ergebnisse mit HUVECs und HPA-SMCs

3.6.1 Proliferationsassay mit HUVECs

Mit diesem Experiment sollte ein Einfluss von MCP-1 auf das Wachstum bzw. die Proliferation von HUVECs untersucht werden. Dazu wurden die HUVECs mit unterschiedlichen Konzentrationen von MCP-1 stimuliert. Die Ergebnisse waren jedoch widersprüchlich. In einem ersten Versuch schien bei Betrachtung der Mittelwerte und der mittleren Wachstumssteigerung kein Wachstumsvorteil der HUVECs bei einer Konzentration von 1 und 10ng/ml MCP-1 zu bestehen, während aber Konzentrationen von 30ng/ml einen Einfluss auf das Wachstum hatten. Bei Berechnung der p-Werte mit einer mehrfaktoriellen Anova mit Statistica ergab sich für dieses Experiment ein statistisch signifikanter p-Wert ($p = 0,01$) ab einer Konzentration von 10ng/ml MCP-1. Insgesamt zeigte sich für diesen Versuch ein signifikanter p-Wert von $p = 0,008$ für die Interaktion über die Zeit. Bei einem zweiten Versuch konnte ich diese Ergebnisse allerdings nicht reproduzieren. Der p-Wert für die Interaktion über die Zeit lag bei diesem weiteren Versuch bei $p = 0,134$. Somit konnte nicht noch einmal ein signifikanter p-Wert ermittelt werden. Auch Experimente mit Konzentrationen mit 50 ng/ml zeigten keinen signifikanten Effekt ($p = 0,833$) (Abb. 30). Daher musste ich von der Richtigkeit der Nullhypothese, also einem gleichen Wachstum zwischen unterschiedlich stimulierten und unstimulierten Zellen ausgehen. Dem entsprechend hatte eine Stimulation mit MCP-1 mit den Konzentrationen von 1, 10, 30, 50ng/ml keinen Effekt auf das Wachstum der HUVECs. MCP-1 bringt somit keinen Wachstumsvorteil bzw. löst keinen Proliferationsreiz aus. Aufgrund des langsameren Wachstums und des verwendeten Mediums, sowie der nicht geklärten Haltbarkeit von MCP-1 in wässriger Lösung wären zusätzliche Experimente nötig, um die Fragestellung abschließend zu klären.

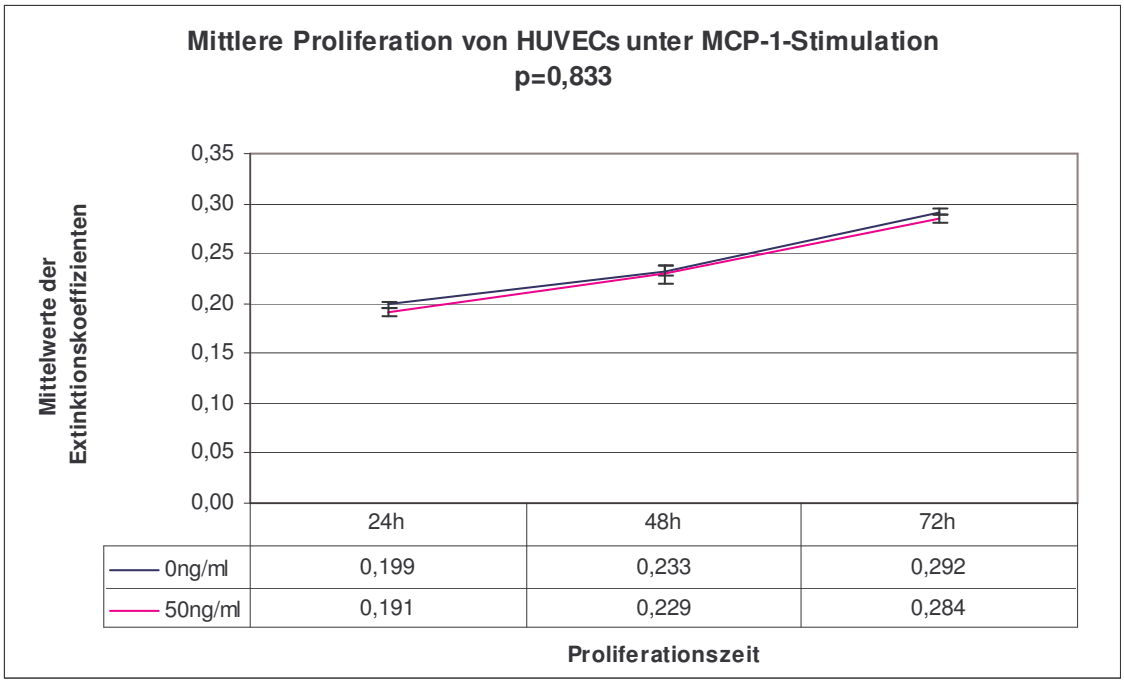


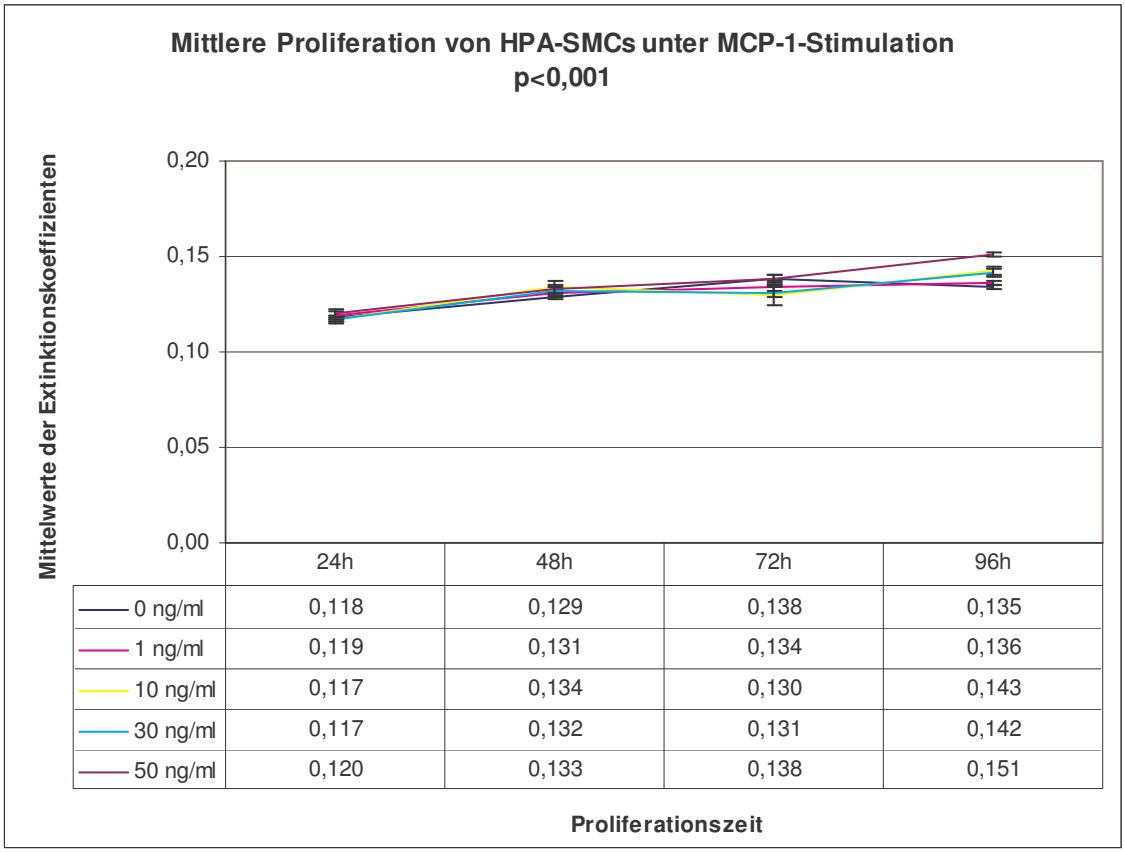
Abb. 30: Exemplarische Darstellung der Proliferation von HUVECs unter MCP-1-Stimulation durch graphische Darstellung der Mittelwerte der gemessenen Extinktionskoeffizienten mit SEM über 72h; p = 0,833. Beachte, dass kein Unterschied in der Proliferation der HUVECs durch MCP-1-Stimulation mit 50ng/ml über 72h zu beobachten ist.

3.6.2 Proliferationsassay mit HPA-SMCs

Bei einem ersten Versuch mit glatten Muskelzellen habe ich die Zellen mit 0ng/ml, 1ng/ml 10ng/ml, 30ng/ml und 50ng/ml humanem MCP-1 für 96h stimuliert. Die Auswertung der Mittelwerte und der mittleren Wachstumssteigerung zeigten einen Einfluss von MCP-1 ab einer Konzentration von 50ng/ml (Abb. 31). Die Wachstumskurven lagen aufgrund des langsamen Wachstums noch nach 96 Stunden sehr nah beieinander, aber die Zellen, die mit 50ng/ml behandelt wurden, schienen dennoch etwas stärker zu proliferieren. Also schien es ab dieser Konzentration zu einer Steigerung der Proliferation der Zellen zu kommen. Dies zeigte sich auch bei Betrachtung des Steigerungsfaktors. Eine Auswertung mittels mehrfaktorieller Anova mit Statistica ergab ebenfalls einen für die Konzentration 50ng/ml signifikanten p-Wert kleiner 0,001. Dabei habe ich die einzelnen Konzentrationen mit 0ng/ml verglichen. Nur für eine Konzentration von 50ng/ml war der p-Wert kleiner als 0,01 und damit signifikant. MCP-1 Konzentrationen von 50ng/ml führten zu einer Wachstumssteigerung der HPA-SMCs.

Ein weiteres Experiment mit Konzentrationen von 0ng/ml, 1ng/ml, 50ng/ml und 100ng/ml zeigten ähnliche Ergebnisse. Auch hier wurde für die Konzentrationen von 50ng/ml und 100ng/ml MCP-1 ein Unterschied in der Proliferation festgestellt. Die mit Statistica

ermittelten p-Werte waren (p<0,001). Damit zeigte sich erneut ein positiver Proliferationsreiz für die HPA-SMCs durch MCP-1 bei Konzentrationen von 50ng/ml und zusätzlich 100ng/ml. Zusammenfassend konnte ich einen Wachstumsvorteil von HPA-SMCs, die mit 50ng/ml oder 100ng/ml MCP-1 stimuliert wurden, gegenüber unstimulierten oder mit geringeren Konzentrationen stimulierten HPA-SMCs zeigen. Die Experimente sind jedoch nur Stichprobenartig durchgeführt worden. Zur Bestätigung dieser Aussage müssten weitere Versuche durchgeführt werden.



	24h	48h	72h	96h
0 ng/ml	0,118	0,129	0,138	0,135
1 ng/ml	0,119	0,131	0,134	0,136
10 ng/ml	0,117	0,134	0,130	0,143
30 ng/ml	0,117	0,132	0,131	0,142
50 ng/ml	0,120	0,133	0,138	0,151

Abb. 31: Exemplarische Darstellung der Proliferation von HPA-SMCs unter MCP-1-Stimulation durch graphische Darstellung der Mittelwerte der gemessenen Extinktionskoeffizienten über 96h. Beachte die statistisch signifikante aber geringe Steigerung der Proliferation von HPA-SMCs ab einer Konzentration von 50ng/ml MCP-1; p < 0,001.

3.7 Ergebnisse der semiquantitativen real-time RT-PCR

3.7.1 Kontrolle der RNA-Qualität

Die RNA-Proben unstimulierter HUVECs und HPA-SMCs, zweier Positivkontrollen aus Monozyten und der CNS-1 Gliomzellen wurden nach Isolierung auf einem 1%igen

Agarosegel getestet. Dabei zeigten sich jeweils 2 abgegrenzte RNA-Banden der 18s- und 28s-rRNA (Abb. 32). Da die Banden sich rein darstellten, konnte von einer intakten RNA ausgegangen werden, somit war die RNA nicht mit RNasen kontaminiert und konnte zur cDNA-Herstellung verwendet werden.

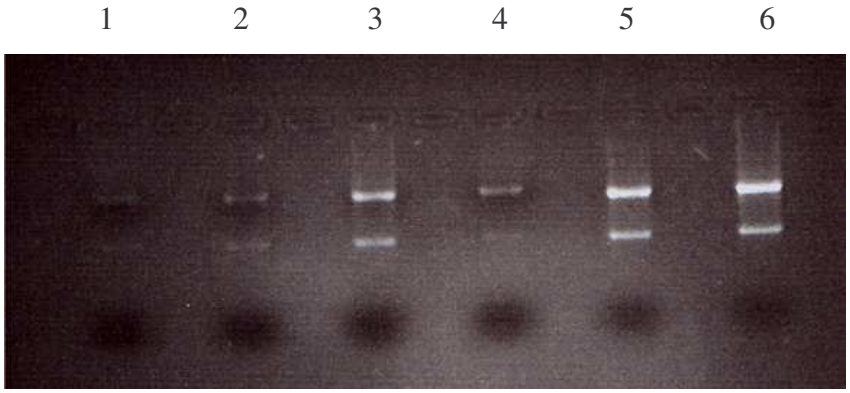


Abb. 32: 1%iges Agarosegel mit circa 0,5 mg RNA pro Template. Isolierte RNA-Proben von: (1 + 2) 2x Positivkontrolle von Monozyten, (3) HUVECs, (4) HPA-SMCs, (5) CNS-1 pcDNA, (6) CNS-1 rMCP-1. Man sieht die typischen Banden für 18s und 28s rRNA. Somit hat kein Abbau durch RNase stattgefunden.

3.7.2 Schmelzkurvenanalyse

Für die Austestung der Primer wurde ein cDNA-Gemisch aus den cDNAs der humanen Monozyten, der HUVECs und der HPA-SMCs, sowie ein Gemisch aus den cDNAs der Rattenmonozyten und der CNS-1-Gliomzellen hergestellt und dann mit einer Verdünnungsreihe der cDNAs eine real-time RT-PCR durchgeführt. Die Analyse der cDNA-Schmelzkurven zeigte, dass für meine Versuche ein optimales Verhältnis zwischen Primer und cDNA bei einer 10-fachen Verdünnung der humanen cDNAs und 5-fachen Verdünnung der Ratten-cDNAs gegeben war.

Bei den einzelnen real-time RT-PCRs wurden die Schmelzkurven für die cDNAs noch einmal untersucht. Im ersten Versuch mit unstimulierten HUVECs und HPA-SMCs entstanden bei den Positivkontrollen (Monozyten) sicher erkennbare spezifische Produkte und keine Primerdimere, die ein falsch-positives Ergebnis hätten vortäuschen können. Die unstimulierten HUVECs und HPA-SMCs zeigten jedoch erst bei sehr späten Zyklen eine Amplifikation mit entsprechend hohen CT-Werten. Im Vergleich mit der Negativkontrolle (Wasser) konnte daher nicht mit Sicherheit von einer unspezifischen Dimerisierung der Primer unterschieden werden. Dies gilt auch für die Versuche mit der cDNA der Ratten-Monozyten und der CNS-1-Gliomzellen. Auch hier ließen sich die Positivkontrollen

(Monozyten) sicher von Primerdimeren abgrenzen. Für die cDNA der CNS-1-rMCP-1- und pcDNA-Gliomzellen ergaben sich erneut sehr späte Amplifikationszyklen bzw. sehr hohe CT-Werte, so dass auch hier nicht sicher eine unspezifische Reaktion ausgeschlossen werden. konnte.

3.7.3 Real-time RT-PCR-Untersuchung von unstimulierten HUVECs & HPA-SMCs

Die Proben der Positivkontrollen, humane Monozyten- und Leukozyten-cDNA, wurden aus peripherem Blut gewonnen und daher ohne weitere Stimulation mit MCP-1 analysiert. Dennoch zeigten sowohl die reinen Monozyten als auch das Leukozytengemisch nach Abgleich mit Aktin für beide MCP-1-Rezeptoren (CCR1 und CCR2) eine hohe relative Expression von mRNA der MCP-1-Rezeptoren. HUVECs wurden aus einer Nabelschnur frisch gewonnen und wuchsen eine Passage lang unstimuliert in Zellkultur. Ebenso wuchsen die HPA-SMCs ohne MCP-1-Stimulation in Zellkultur. Diese beiden Zellen zeigten unstimuliert im Vergleich mit den Positivkontrollen praktisch keine Expression der MCP-1-Rezeptoren CCR 1 und CCR 2 (Abb. 33).

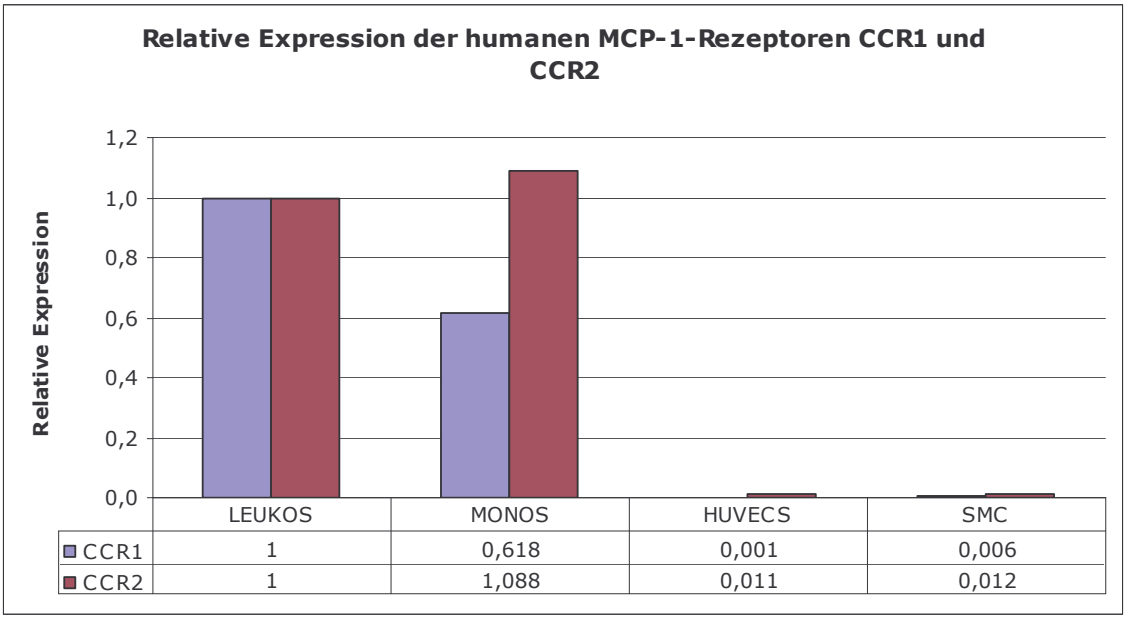


Abb. 33: Relative Expression von Rezeptoren-cDNA humaner Zellen: Leukozyten, Monozyten, HUVECs und HPA-SMCs. Im Vergleich zu den Monozyten und Leukozyten fand sich praktisch keine Expression von CCR1 und CCR2 in den HUVECs und HPA-SMCs.

Ein weiterer rechnerischer Vergleich nur zwischen den HUVECs und HPA-SMCs zeigte einen deutlichen Unterschied in der Expression von CCR1 zwischen diesen beiden Zelllinien. HUVECs schienen im Vergleich zu HPA-SMCs kaum mRNA für den MCP-1-Rezeptor

CCR1 zu exprimieren, während die Expression von CCR2 bei beiden annähernd gleich war (Abb. 34).

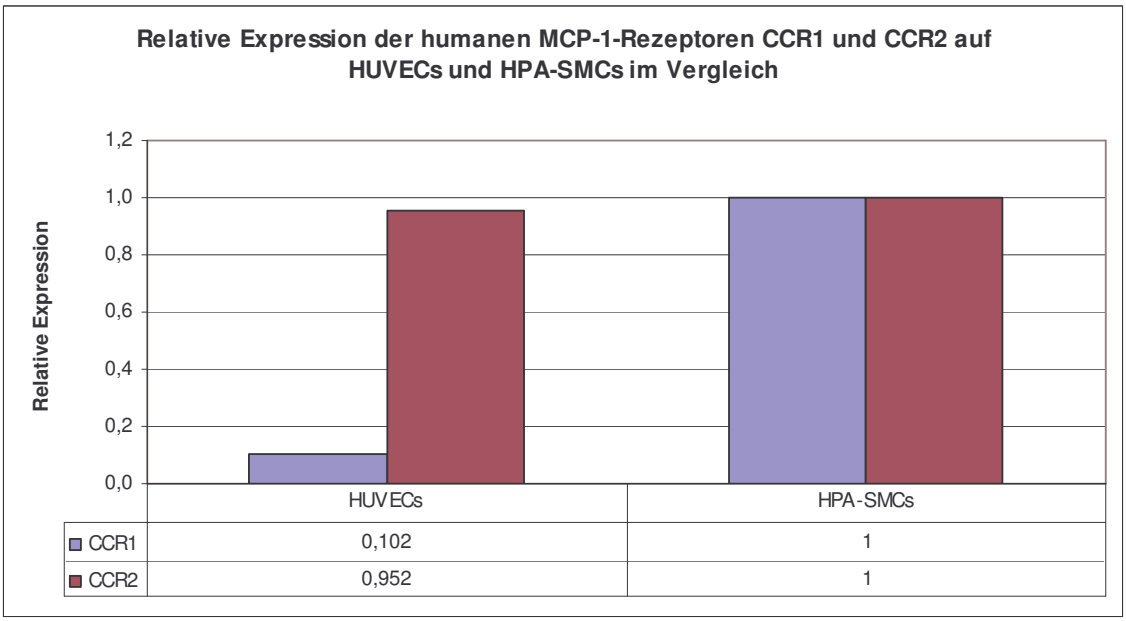


Abb. 34: Relative Expression von Rezeptoren-cDNA im Vergleich von HUVECs und HPA-SMCs. Man sieht, dass beide Zelllinien CCR2 in etwa gleichen Mengen exprimieren. HUVECs scheinen jedoch im Vergleich zu HPA-SMCs kaum CCR1 zu exprimieren.

3.7.4 Real-time RT-PCR-Untersuchung von stimulierten HUVECs und HPA-SMCs

Die semiquantitative real-time RT-PCR zum Vergleich unstimulierter versus MCP-1-stimulierter HUVECs und glatter Muskelzellen (HPA-SMCs) zeigte sowohl bei HUVECs als auch bei glatten Muskelzellen einen starken Anstieg des Rezeptors CCR2 nach einmaliger Stimulation mit MCP-1, während CCR1 auch nach zweimaliger Stimulation nahezu unverändert blieb (Abb. 35 & 36). Bei der weiteren Betrachtung der Expression von CCR2 zeigte sich folgendes Bild: In den HUVECs schien die Expression von CCR2 bei zweimaliger Stimulation noch einmal zuzunehmen (Abb. 35). Bei den glatten Muskelzellen fiel die Expression dagegen wieder etwas ab, blieb aber noch weit über dem Ausgangswert (Abb.36).

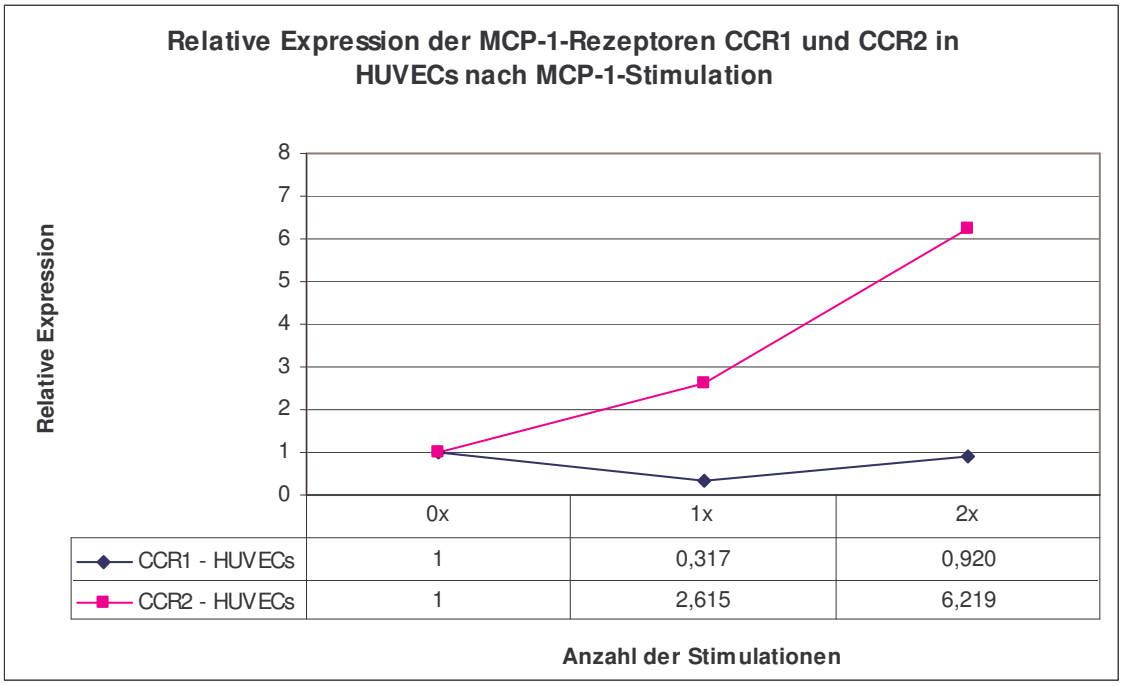


Abb. 35: Real-time RT-PCR- Ergebnis von unstimulierten, 1x und 2x mit 50ng/ml MCP-1-stimulierten HUVECs: Dargestellt wurde die relative Expression der MCP-1-Rezeptoren CCR1 & CCR2 in den HUVECs als Potenz des negativen ΔΔ-CT-Wertes von 2 (Abschnitt 2.11 - Formeln). Beachte den Anstieg der Expression von CCR2 unter MCP-1-Stimulation.

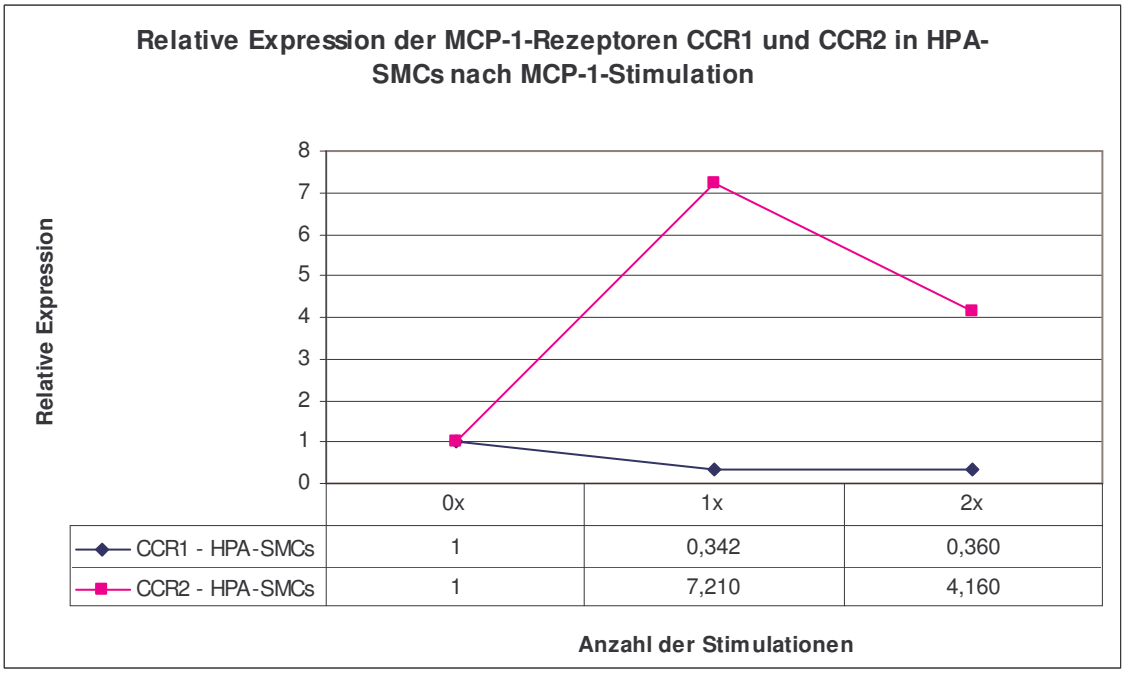


Abb. 36: Real-time RT-PCR- Ergebnis von unstimulierten, 1x und 2x mit 50ng/ml MCP-1-stimulierten HPA-SMCs: Dargestellt wurde die relative Expression der MCP-1-Rezeptoren CCR1 & CCR2 als Potenz des negativen ΔΔ-CT-Wertes von 2 (Abschnitt 2.11). Beachte den Anstieg der Expression von CCR2 unter MCP-1-Stimulation.

3.7.5 Real-time RT-PCR-Untersuchung von CNS-1-Gliomzellen

Die semiquantitative real-time RT-PCR der Ratten-Gliomzellen CNS-1 pcDNA und CNS-1 rMCP-1 zeigte ähnliche Ergebnisse, wie die der unstimulierten HUVECs und HPA-SMCs. Dabei konnte in den Positivkontrollen der cDNA von Monozyten eine hohe relative Expression im Abgleich mit Aktin festgestellt werden. Die Monozyten der Gruppe A wurden vorher mit LPS (Large Polyp Scleractinia) stimuliert, während die Gruppe B nicht stimuliert wurde. Beide Gruppen zeigten jedoch eine signifikant höhere Expression gegenüber den beiden Gliomzelllinien. Daher gehe ich davon aus, dass beide Gliomzelllinien die Rezeptoren für MCP-1 kaum oder gar nicht ausbilden (Abb.37). Dabei ist für die mit MCP-1-transfizierten Gliomzellen von einer Situation ähnlich einer Stimulation mit MCP-1 auszugehen, da für diese Zellen nach ihrer Transfizierung die Produktion von MCP-1 nachgewiesen worden ist (Platten et al., 2003).

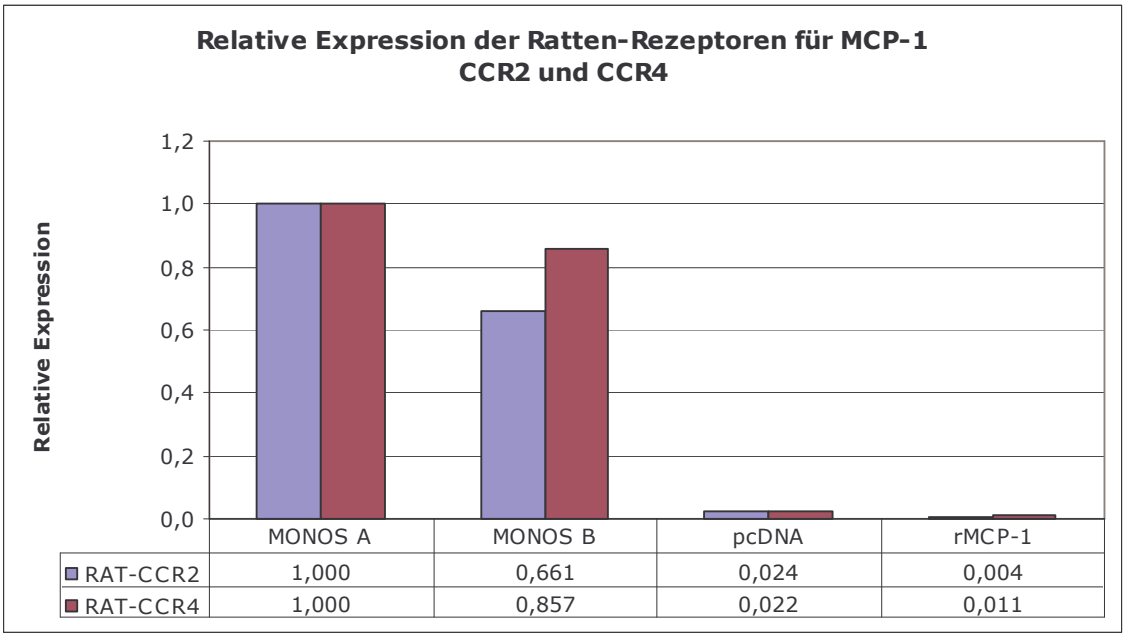


Abb. 37: Relative Expression von Rezeptoren-mRNA in Ratten-Monozyten und CNS-1-Gliomzellen (mit und ohne MCP-1-Produktion); Es ist praktisch keine Expression von mRNA der MCP-1-Rezeptoren CCR2 & CCR4 in den CNS-1-Gliomzellen im Vergleich mit Monozyten nachweisbar.

Betrachtete man die CNS-1-Gliomzellen isoliert, zeigte sich ein Unterschied von über 50% in der mRNA-Expression der MCP-1-Rezeptoren CCR2 & CCR4. Dabei exprimierten die rMCP-1-transfizierten CNS-1-Gliomzellen weniger CCR2 & CCR4 als die Kontrollzellen (pcDNA) (Abb. 38).

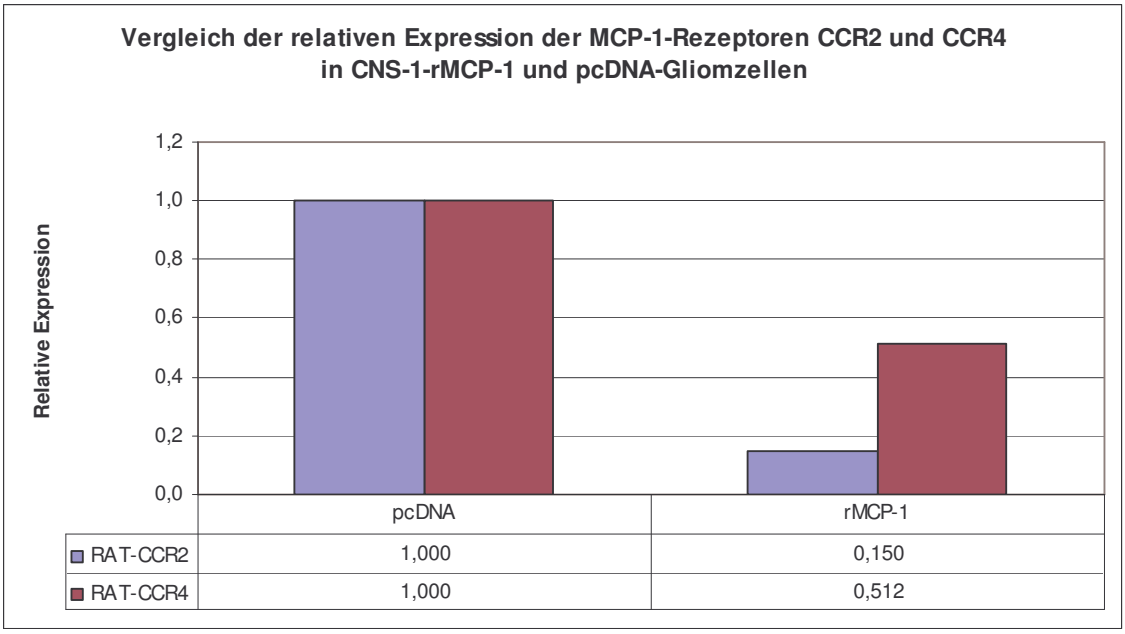


Abb. 38: Vergleich der relativen Expression von MCP-1-Rezeptoren-mRNA bei Ratten-CNS-1-Gliomzellen mit und ohne MCP-1-Produktion. Die MCP-1-produzierenden (rMCP-1) CNS-1-Gliomzellen produzieren wesentlich weniger mRNA der MCP-1 Rezeptoren CCR2 und CCR4 als die Kontrollzellen.

3.8 MCP-1-Strukturvergleich

Da ich in meinen Versuchen Zellen und Gewebe von 4 verschiedenen Spezies verwendet habe, stellte sich die Frage, wie groß die Homologie des Chemokins MCP-1 bei diesen Spezies ist. *Gallus gallus domesticus* und *Coturnix coturnix japonica* sind sich phylogenetisch so ähnlich, dass hier auf einen Vergleich verzichtet werden konnte. Somit habe ich *Gallus gallus*, *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus* verglichen. Zunächst wurden die mRNA Sequenzen auf der NCBI Seite unter „Nucleotides“ ermittelt (NCBI-Nukleotides, 2006) und dann mittels „Align 2 Sequences“ verglichen (NCBI- Align 2 Sequences, 2006). Dabei zeigten sich zwischen Ratte und Mensch Übereinstimmungen von circa 80% für MCP-1. Eine mRNA von *Gallus gallus* konnte nicht sicher identifiziert werden, so dass hier der Vergleich ausbleiben musste. Da der Austausch einzelner Basen im Gen nicht zwangsläufig zur Translation einer anderen Aminosäure führt und somit bei leicht unterschiedlicher mRNA durchaus ähnliche oder gleiche Proteine entstehen können, untersuchte ich auch die Proteinstruktur. Über Internetseiten von „IHOP“ und „Swissprot“ wurden die Proteinsequenzen identifiziert (MCP-1: human P13500, *Rattus norvegicus* P14844). Ein Vergleich von Ratte und Mensch unter „Blast“ (NCBI-Blast, 2006) auf der NCBI Seite (NCBI-Startseite, 2006) ergab eine Übereinstimmung von circa 55%. Meine Vergleiche der

Proteine von *Rattus rattus norvegicus* und *Mus musculus* (P10148) ergaben eine 81%ige Übereinstimmung. Die phylogenetische Verwandtschaft zwischen *Rattus rattus norvegicus* und *Mus musculus* ist wesentlich enger, als zu *Homo sapiens*, und Platten et al. (2003) konnte zeigen, dass rMCP-1-transfizierte Gliome mit Ratten-MCP-1-Produktion in der Maus Veränderungen bewirken. Somit scheint die nur teilweise übereinstimmende Primärstruktur der Proteine den Einfluss auf die Funktion nicht zu stören. In der Literatur wurde von Rollins et al. (1991) gezeigt, dass das bei Mäusen vorkommende Gen JE auch beim Menschen das Protein für das humane MCP-1 (MCAF) kodiert. Das von ihm hergestellte rekombinante humane MCP-1/JE zeigte gleichartige Funktionen in Bezug auf die Rekrutierung von humanen Monozyten wie das der Maus (Rollins et al., 1991). Die menschliche und murine Aminosäuresequenz unterscheiden sich jedoch um 49 Aminosäuren am carboxylterminalen Ende (COPE, 2006b und 2006c). Bezüglich der Funktion des kürzeren humanen MCP-1 Proteins auf Ratten- bzw. Mauszellen oder umgekehrt, konnte ich jedoch keine Literatur finden und damit keine Aussage treffen.

Die Proteinsequenz für MCP-1 bei *Gallus gallus domesticus* bleibt fraglich. Eventuell ist das Chemokin CCL20 beim Huhn das Homolog zu CCL2 (MCP-1) beim Menschen. Ein Vergleich mit „Align 2 sequenzes“ ergab circa 38% Homologie. Da von mir lediglich ein Vergleich der Proteinprimärstruktur erfolgte, kann keine Aussage über die entsprechende Faltung der Proteine und deren Sekundär- und Tertiärstruktur getroffen werden. Somit konnten auch keine Prognosen zur Homologie des aktiven Zentrums der Proteine aufgestellt werden. Über eine Wirkung von humanem MCP-1 und MCP-1 von Ratten-Gliomzellen auf Zellen der CAM kann daher nur spekuliert werden. Meine Untersuchungen mit CNS-1 Gliomen auf der Hühner-CAM zeigen jedoch zumindest eine Wirkung des MCP-1 der Ratte auf *Gallus gallus domesticus*, analog der von Platten et al. (2003) dargestellten Wirkungen an Mäusen.

4 Diskussion

4.1 Die CAM als geeignetes Versuchsmodell?

In dieser Studie wurde der Vogel als ein Modell zum Studium der Tumorangiogenese verwendet. Dabei sollte der Einfluss von MCP-1 auf die Angiogenese im Allgemeinen und die Tumorangiogenese im Speziellen betrachtet werden. Da artfremde Tumorzellen für das anfängliche Wachstum eine immunsupprimierte Umgebung benötigen (Goldbrunner et al., 2000), stellte ich mir zunächst die Frage, ob die CAM zum Versuchszeitpunkt diese Vorraussetzungen erfüllte. In der Literatur wurde die CAM in den frühen Entwicklungstagen als ein gängiges nicht-immunkompetentes Versuchsmodell beschrieben (Folkman, 1985). In meinen Experimenten konnte ich dies ebenfalls durch das beobachtete Tumorwachstum bestätigen. Denn nur bei 5,7% von 35 rMCP-1-transfizierten CNS-1-Ratten-Gliomen und 10,8% von 29 Kontrolltumoren ergab sich kein Wachstum. Dabei kam als Ursache auch eine fehlerhafte Inkubation oder das Absterben des Embryos durch äußere Einflüsse in Betracht. In allen anderen Fällen kam es zu einem Wachstum von Tumoren, auch wenn diese bei den Kontrolltumoren klein und avaskulär waren. Man kann also davon ausgehen, dass das unreife Immunsystem des Vogelembryos ein erfolgreiches Tumorwachstum auf der CAM nicht verhindert.

Da ich mich in meinen Versuchsreihen hauptsächlich auf MCP-1 fokussierte, ein Chemokin, das hauptsächlich Makrophagen/Monozyten anlockt, stellte sich mir als zweite Frage, ob Monozyten zum Versuchszeitpunkt im Vogelembryo vorhanden sind. Bei den Säugetieren entwickeln sich die mononukleären Zellen zusammen mit den Erythrozyten und Thrombozyten aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Vorläuferzelle. Sie gehören weiterhin zur angeborenen, unspezifischen Immunabwehr des Körpers und sind in allen Organen als Gewebsmakrophagen oder Histiozyten, sowie im Blut als Monozyten vorhanden. Ihre Hauptaufgaben sind Phagozytose und Antigenpräsentation (Hahn et al., 2001). Eine Interaktion mit Lymphozyten lässt sie weiterhin zu einem Teil des spezifischen Immunsystems werden (Mantovani, 1982). Die Immunentwicklung des Vogels wurde nicht in gleichem Maße studiert, wie die von Säugetieren. In der Entwicklung wurden mononukleäre Zellen jedoch auch als die erste, unspezifische Immunabwehr des Vogels betrachtet. Monozyten und Makrophagen stammen beim Vogel ebenfalls aus dem Knochenmark, wo sie sich aus hämatopoetischen Stammzellen über Monoblasten differenzieren. Während

Monozyten wiederum nur im Blut vorkommen, sind Makrophagen in fast jedem Gewebe vorhanden. In der Embryonalentwicklung des Vogels wurden paraaortal bereits hämatopoetische Stammzellen an Tag 4 nachgewiesen, die dann nach und nach die blutbildenden Organe, wie Milz, Leber und das Knochenmark besiedeln (Cooper et al., 1991). Funktionstüchtige Makrophagen wurden dabei in der Huhnentwicklung an Tag 13 in der Leber und an Tag 16 in der Niere beobachtet. Zu dieser Zeit waren sie auch bereits zur Phagozytose fähig. Durch einen inflammatorischen Stimulus konnten allerdings auch schon am Tag 3 Makrophagen in der Bauchhöhle von Vögeln induziert werden. Diese waren dann nach einigen Stunden so weit differenziert, dass sie zur Phagozytose fähig waren (Qureshi et al., 2000). Das restliche Immunsystem, im Speziellen die Teile der spezifischen Abwehr wie B- und T-Lymphozyten, war zu diesem Stadium noch nicht ausdifferenziert. B-Lymphozytenvorläuferzellen besiedeln die „Bursa of Fabricius“ an Tag 8-14 der Entwicklung und reifen dort zu B-Lymphozyten aus (Houssaint et al., 1976). Die Ausreifung von T-Lymphozyten im Vogel erfolgt in drei Perioden im Thymus an Tag 15, 18 und 21 (Cooper et al., 1991). Zum Versuchszeitpunkt an Tag 10 bis 13 gab es also keine durch B- oder T-Lymphozyten gewährleistete spezifische Immunabwehr im Vogel. Somit kann geschlussfolgert werden, dass zum Implantationszeitpunkt der Gliomzellen wahrscheinlich nur eine unspezifische Immunabwehr durch Makrophagen vorlag, die dennoch das Tumorwachstum nicht verhindern konnte. In meinen Immunfluoreszenzpräparaten konnte ich ebenfalls eine Besiedlung der Tumoren mit kernhaltigen Einzelzellen beobachten. Unter Berücksichtigung der in der Literatur beschriebenen Kolonisierung von Gliomen mit Makrophagen (Leung et al., 1997; Nishie et al., 1999; Platten et al., 2003) und dem Stand der Immunentwicklung des Vogels zum Versuchszeitpunkt, konnte ich schließen, dass es sich hier um Makrophagen und unreife Lymphozyten handelte. Eventuell ebenfalls in Betracht kämen Killerzellen oder Granulozyten, die auch zur angeborenen unspezifischen Immunabwehr zählen (Hahn et al., 2001) und damit sehr früh in der Embryonalentwicklung auftreten müssten. Eine weitere Differenzierung war jedoch aufgrund eines fehlenden selektiven Markers für diese Zellen nicht möglich.

Da ich auf der CAM die Tumorangiogenese verfolgte, musste ich ebenfalls die Eignung der CAM als Angiogenesemodell hinterfragen. Pardanaud et al. (1989) zeigten bereits an Tag 3-4 der Embryonalentwicklung paraaortal das Auftreten hämatopoetischer Stammzellen. An Tag 4 bzw. 6 wurde Gefäßentwicklung in der CAM von Ausprunk et al. (1974) bzw. Sethi und Brookes (1971) beschrieben. Hämatopoetische Stammzellen wurden bereits vor Entwicklung

von Gefäßen in der CAM nachgewiesen (Caprioli et al., 1998). Bis Tag 14 der Embryonalentwicklung wurde eine Weiterentwicklung der bestehenden Gefäße beobachtet (Ausprunk et al., 1974). Eine angiogene Potenz der CAM und eine Nutzung dieser bestehenden Gefäße als Angiogenesemodell wurde ebenfalls mehrfach etabliert (Folkman, 1974, 1985; Wilting et al., 1991, 1992). Ich beobachtete in meinen Experimenten ein starkes Wachstum der CAM-Gefäße zum Tumor. Auf dieser Beobachtung und vorangegangenen Experimenten aufbauend, bestätigten sich somit für mich die angiogenen Reaktionen der CAM und ihre Funktion als Tumorangiogenesemodell.

Weiterhin benutzte ich die CAM an Tag 13 der Embryonalentwicklung für die Untersuchung von MCP-1 als Angiogenesefaktor. Das CAM-Assay wurde ursprünglich von Folkman (1974) an Tag 9 der Entwicklung etabliert. Da Beobachtungen zeigten, dass die Endothelzellen der Blutgefäße bis zum 11. Tag stark proliferierten (Ausprunk et al., 1974), erschien mir eine Applikation eines Angiogenese beeinflussenden Stoffes vor Tag 11 sinnvoll. Andere Experimente stellten jedoch dar, dass eine Trägerapplikation auf diese unzureichend entwickelte CAM zusätzliche Träger-assoziierte Reaktionen der CAM induzierten. Nachfolgend wurde eine angiogene Wirkung von Angiogenesefaktoren für das CAM-Modell an Tag 13 und das Ausbleiben von Trägereffekten bewiesen (Wilting et al., 1991, 1992). In Bezug auf das von mir verwendete Tumormodell traten mögliche Trägereffekte auf. Diese konnten aber vernachlässigt werden, da sie bei Kontrollzellen und MCP-1-Transfektanten in gleicher Weise auftraten. In meinen Versuchen mit humanem MCP-1 auf der CAM an Tag 13 schloss ich nach den Versuchen von Wilting et al. Versuchen (1991, 1992) einen Trägereffekt aus. Hier konnte ich einen angiogenen Effekt durch VEGF-A_{165} analog zu Wilting et al. (1991, 1992) nachweisen. Durch Aufbringen von humanem rekombinanten MCP-1 auf die CAM konnte ich im Gegensatz zum Tumormodell keine Effekte im Sinne einer Angiogenese oder vermehrten Monozyteneinwanderung nachweisen. Zwar zeigten sich in Dunkelfeldaufnahmen der mit MCP-1 stimulierten CAM weißliche Eintrübungen, die auf eine Einwanderung oder Vermehrung von Zellen hinweisen könnten, jedoch konnte ich keine nennenswerte Monozyteneinwanderung in Semidünnschnitten oder Immunfluoreszenzaufnahmen der mit MCP-1 stimulierten Wachtel-CAM nachweisen. Die Gründe dafür könnten in der Proteinstruktur bei unterschiedlichen Spezies sein. Der Literaturrecherche war jedoch nicht zu entnehmen, ob das humane MCP-1 auch bei Vogelzellen Wirkungen verursachen könnte. Das Tumormodell der CNS-1 Rattengliomzellen mit Ratten-MCP-1 zeigte einen Einfluss auf die CAM. Ein Grund für meine negativen

Resultate im CAM-Assay mit humanem MCP-1 könnte die zu geringe Einwirkzeit von nur 3 Tagen sein. Die Tumoren wuchsen 7 Tage. Dabei könnte es zu einer nicht ausreichenden Einwanderung von Monozyten gekommen sein. Allerdings zeigte Qureshi et al. (2000), dass die maximale Einwanderung von Monozyten bereits nach 72h erreicht wird. Ein anderer Grund könnte eine Instabilität des MCP-1-Proteins in wässriger Lösung sein und dass es bereits zu Beginn des Versuchs zerfiel. Abschließend konnte ich somit nicht sicher feststellen, ob die CAM auf MCP-1 reagiert oder die Gliomzellen durch einen anderen Effekt die CAM beeinflussen. Andererseits sollten sich die Gliomzellen nur durch die MCP-1 Produktion unterscheiden. Daher nehme ich an, dass MCP-1 eine Reaktion der CAM auslöst und andere Faktoren die negativen Ergebnisse der Versuche mit humanem MCP-1 bedingen.

4.2 MCP-1 als Selektionsvorteil

4.2.1 Wachstum in vitro

Die untersuchten CNS-1-Ratten-Gliomzelllinien sollten sich lediglich in einem Faktor unterscheiden, der Produktion und Sekretion von MCP-1. Damit sollte eine Beeinflussung der Tumorangiogenese unabhängig von anderen Faktoren durch MCP-1 erfolgen. Die entsprechenden Zellen erhielt ich von Dr. Platten. Platten et al. (2003) zeigten die Einbringung des Vektors mittels Bio-Rad Gene Pulser bei den CNS-1-Ratten-Gliomzellen. Es entstanden mehrere Kontrollzelllinien. Eine Zelllinie erhielt den Vektor mit der Ratten-MCP-1-Gensequenz und wurde als CNS-1 rMCP-1 bezeichnet. Die mit pcDNA-Leer-Vektoren-behandelten Zellen wurden als CNS-1 pcDNA (Kontrolltransfektanten) bezeichnet. Mittels Elisa wurde nachgewiesen, dass es tatsächlich zu einer MCP-1-Produktion bei CNS-1-rMCP-1-Zellen kam. Die Kontrolltransfektanten zeigten keine Produktion von MCP-1. Auch gab es keine MCP-1-Sekretion der unbehandelten CNS-1-Zellen. *In vitro* gab es keinen Hinweis auf Wachstumsunterschiede (Platten et al., 2003). Meine Ergebnisse zeigen allerdings einen signifikanten Wachstumsunterschied der beiden Gliomzelllinien. Die mit dem Vektor für MCP-1-transfizierten Gliomzellen wuchsen deutlich langsamer in Kultur als die Kontrollzellen. Dieser Unterschied wurde bei steigender Zellzahl von circa 1000 Zellen/Well auf 5000 Zellen/Well immer ausgeprägter. Zellen benötigen *in vitro* eine gewisse Zelldichte zum Wachstum. Bei niedriger Ausgangskonzentration bestand offensichtlich ein zu gering ausgeprägter Zellkontakt. Dadurch waren beide Zelllinien gleichermaßen im Wachstum gehemmt, so dass hier die Ursache für einen nicht signifikanten Wachstumsunterschied lag. Diese These wird unterstützt, durch die Tatsache, dass ab einer Ausgangskonzentration von

2500 Zellen/Well ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelllinien bestand. Ab einer Zellzahl von 10.000 Zellen/Well wurde bei beiden Zelllinien die Wachstumsdifferenz wieder geringer. Hier ist umgekehrt anzunehmen, dass ein gewisser Platzmangel bei hoher Zelldichte im Versuchsaufbau herrschte. Da sich beide Zellreihen nur durch den Faktor MCP-1 unterscheiden sollten, konnte nur die Produktion von MCP-1 einen Unterschied bewirken. Im Idealfall lag also lediglich eine zusätzliche Energie verbrauchende Proteintranslation für MCP-1 vor, die den Zellen in Kultur keinen Wachstumsvorteil brachte und sie daher langsamer als ihre Vergleichsgruppe wachsen ließ. Eine Bestimmung der mRNA Expression für die Ratten-Rezeptoren von MCP-1 (CCR2 und CCR4) mittels real-time RT-PCR ergab eine sehr niedrige Expression der Rezeptoren im Vergleich zu Ratten Monozyten. Schlussfolgert man nun, dass die Tumorzellen keine ausreichende Menge Rezeptoren für MCP-1 besitzen, kommt auch eine autokrine Hemmung der Tumorzellen durch MCP-1 nicht in Betracht. Somit kann ich eine Wachstumsverzögerung durch die zusätzliche Produktion von MCP-1 annehmen. Bei einem direkten Vergleich der mRNA-Expression der beiden CNS-1-Gliomzelllinien zeigte sich allerdings ein Unterschied in der Rezeptor-Expression. Allerdings exprimierten die MCP-1-produzierenden Gliomzellen wesentlich weniger CCR2- und CCR4-mRNA als die Kontrollzellen. Daher könnte vermutet werden, dass die CNS-1-Gliomzellen, da sie geringe Mengen an Rezeptoren für MCP-1 besitzen, ihre Produktion von CCR2 und CCR4 autokrin hemmen.

Ein weiteres Problem besteht darin, dass eingebrachte Vektoren nur für kurze Zeit stabil sind und nach einigen Tagen die artfremde DNA in den Zellen wieder abgebaut wird. Durch Selektion mit Hilfe eines dominanten Markers konnte die Lebensdauer jedoch verlängert werden. Die Zellen wurden dabei mit einem Resistenzgen kotransfiziert, dass bedeutet der Vektor der CNS-1-Zellen enthält neben dem Gen für MCP-1 auch ein Resistenzgen gegen G418. Selektive Bedingungen wurden dann mit einer zytotoxischen Substanz, hier G418 (Platten et al., 2003), geschaffen. Zellen mit stabil integriertem Vektor blieben daher erhalten, während andere abstarben (Mühlhardt, 2003). Ebenfalls führen Vektoreinbringungen in ein Genom nicht ausschließlich nur zu der gewollten zusätzlichen Geninformation. Mit dieser Technik kann es durchaus zu einer heterogenen Gruppe von transfizierten Zellen mit einer unterschiedlichen Expression von MCP-1 kommen (Mantovani et al., 1992). Da Platten et al. (2003) jedoch einen signifikanten Unterschied der MCP-1-Expression mittels Elisa nachweisen konnten, nahm ich unter Vernachlässigung der Heterogenität der Zellen lediglich einen absoluten Unterschied für die Sekretion von MCP-1 an. Also setzte ich eine

gleichbleibende Produktion von MCP-1 bei den CNS-1-rMCP-1-Zellen voraus, während die Kontrollzellen kein MCP-1 produzierten. Damit entsteht also die Wachstumsverzögerung der CNS-1-rMCP-1-Gliomzellen *in vitro* durch die zusätzliche Proteinproduktion, oder eine autokrine Hemmung.

4.2.2 Wachstum in vivo

Die vorangegangenen Experimente an Mäusen zeigten nach intrazerebraler Einbringung der CNS-1-Gliomzellen und circa 10 Tagen Wachstumszeit ein 3,4 mal größeres Volumen der mit MCP-1-transfizierten Tumoren gegenüber den Kontrolltumoren (CNS-1 pcDNA). Auch das mittlere Überleben dieser Tiere war 5 Tage kürzer, als bei den mit Kontrolltumoren inokulierten Tieren (Platten et al., 2003). Beim Menschen ergeben sich schlechtere Prognosen bei hohem MCP-1-Gehalt in Brusttumoren und Hirntumoren (Roggendorf et al., 1996; Ueno et al., 2000). Im CAM-Assay beobachtete ich ähnliche Ergebnisse. Makroskopisch betrachtet besaßen die mit MCP-1-transfizierten Tumoren ein größeres Volumen als die Kontrolltumoren. Daher wurde das Volumen einiger Tumoren bestimmt und es zeigte sich ein im Mittel fünf mal so großes Volumen der MCP-1-Tumoren gegenüber den Kontrolltumoren. Statistische Vergleiche ergaben einen signifikanten Unterschied. Da sich beide Tumoren nur durch die Expression von MCP-1 unterschieden, kann man von einem Wachstumsvorteil durch MCP-1 *in vivo* ausgehen.

4.3 MCP-1 fördert die Tumorangiogenese bzw. Arteriogenese

In der Literatur finden sich viele Beispiele für eine Mitwirkung von MCP-1 an der Angiogenese und Arteriogenese. Ito et al. (1997), Hoefer et al. (2001, 2005) und Schirmer et al. (2004) demonstrierten mit MCP-1-Infusionen an Kaninchenmodellen die arteriogene Wirkung auf Kollateralen nach Verschluss einer versorgenden Arterie. Ebenso konnten Muhs et al. (2004) eine bessere periphere Kollateralenbildung nach Verschluss einer versorgenden Arterie durch die Einbringung des Gens für MCP-1 erreichen. MCP-1 induzierte auch Gefäßneubildungen in der nicht vaskularisierten Kaninchenhornhaut (Goede et al., 1999). Yamada et al. (2003) zeigten durch Neutralisierung von MCP-1 mit Antikörpern eine Beteiligung von MCP-1 bei der Angiogenese, da in dem Versuch eine Gefäßentstehung inhibiert wurde. Eine gesteigerte Tumorangiogenese mit einer Beteiligung von MCP-1 konnte in Mammakarzinomen, Magenkarzinomen, Melanomen und Gliomen nachgewiesen werden (Ueno et al., 2000; Nesbit et al., 2001; Platten et al., 2003; Kuroda et al., 2005). Die Dichte

von kleinen Gefäßen war bei allen MCP-1-produzierenden Gliomen höher als bei den Kontrolltumoren (Platten et al., 2003; Kuroda et al., 2005). Meine Untersuchungen zeigen ebenfalls eine höhere Dichte von Gefäßen in den Tumoren. In makroskopischen Aufnahmen zeigte sich zusätzlich zu einem signifikanten Größenunterschied der Tumoren eine erhöhte Zahl von Gefäßen zum und im Tumor bei den MCP-1 Tumoren. Große Gefäße waren im Wesentlichen abfließend und damit venös. Die Kontrolltumoren waren wesentlich kleiner, ebenso wie die zu ihnen hinführenden Gefäße. In den Kontrolltumoren selbst war kaum eine Vaskularisation sichtbar. Dies ließ vermuten, dass bei den MCP-1-sezernierenden Gliomen ein bessere Tumorangiogenese und Bildung größerer Gefäße (Arterien und Venen) erfolgt.

Einige Tumoren wurden mit Hilfe von HE-Färbungen untersucht. Auch hier zeigte sich eine stärkere Perfusion der MCP-1-Tumoren. Dabei fiel auf, dass die MCP-1-produzierenden Gliome nicht so dicht gewachsen waren wie die Kontrollzellen und eine schlechtere Abgrenzbarkeit zum restlichen CAM-Gewebe besaßen. Die MCP-1-transfizierten Tumorzellen wirkten größer, lagen in einem lockereren Zellverband mit größeren Zellzwischenräumen und waren weiter in die Peripherie gewandert, während die Kontrollzellen kleiner waren und dicht gepackte, wirbelartige Strukturen bildeten. In den MCP-1-Tumoren lagen viele Gefäße zwischen den Tumorzellen, während in den Kontrolltumoren selten Gefäße sichtbar waren. Die HE-Färbungen zeigten somit eine erhöhte Kapillarendichte in den MCP-1-produzierende Tumoren gegenüber den Kontrolltumoren. Somit kann geschlussfolgert werden, dass MCP-1-Tumoren stärker vaskularisiert sind. Damit konnte ich den selben Effekt beschreiben wie Platten et al. (2003). Auch dort zeigte sich mit Hilfe von Antikörpern gegen den von-Willebrandt-Faktor (vWF) eine signifikant höhere Gefäßdichte (Platten et al., 2003).

Bei Immunperoxidase-Färbungen mit anti-α-SMA-Antikörpern konnte ich eine vermehrte Anzahl Glattmuskel-Aktin-positiver Zellen beobachten. Dies wurde durch eine quantitative Fluoreszenzbestimmung von markiertem Glattmuskelaktin überprüft. Ein Vergleich des Fluoreszenzvolumens pro untersuchtem Schnittvolumen ergab eine signifikant höhere Glattmuskel-Aktinfärbung für die MCP-1-Tumoren gegenüber den Kontrolltumoren. Glattmuskelaktin kommt in glatten Muskelzellen der Media von Gefäßen und in Myofibroblasten im Gewebe vor. Somit kam es entweder zu einer Bindegewebsvermehrung oder Gefäßdifferenzierung im Tumor. Doppel-Färbungen mit QH1 und α-SMA an Wachtelpräparaten zeigten keine direkte Verbindung zwischen Endothel und glatten

Muskelzellen an kleineren Gefäßen innerhalb des Tumors. Jedoch zeigten sich in den makroskopischen Präparaten vermehrt größere venöse Gefäße, die in den histologischen Doppel-Färbungen in der Peripherie sichtbar wurden. Daher kann eine erhöhte Organisation im Sinne von Arterio- und Venogenese angenommen werden.

Wie bereits oben diskutiert, kann ich eine autokrine Stimulation der Gliomzellen durch MCP-1 nicht völlig ausschließen. Aber auch eine Interaktion der Tumorzellen durch MCP-1 mit dem Stroma der CAM konnte zu einer Differenzierung der Gefäße und besserem Wachstum der Tumoren führen. Um einen vom Tumor unabhängigen direkten MCP-1-Effekt auf der CAM zu untersuchen, habe ich 2µg humanes MCP-1 (MCAF) mit einem Träger auf die CAM aufgebracht. Wie erwartet stellte sich für die Positivkontrolle mit 3µg VEGF-A_{165} eine Reaktion der CAM-Gefäße und für die Negativkontrollen mit sterilem Wasser keine Reaktion ein. Die Träger mit MCAF zeigten keine offensichtliche Reaktion der CAM. Lediglich im Dunkelfeld stellten sich weißliche Eintrübungen der CAM unter dem Träger dar. Diese lagen in dem Bereich des aufgetragenen, eingetrockneten Tropfens des in Wasser gelösten MCAF, das für drei Tage auf die CAM eingewirkt hatte. Hier könnte es sich entweder um eine Reaktion und Proliferation des Bindegewebes der CAM oder um eingewanderte Makrophagen handeln. Einige Veröffentlichungen zeigen, dass nach circa 72 Stunden eine Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen durch Stimulierung mit MCP-1 stattfindet (Arras et al., 1998; Lu et al., 1998). Da MCP-1 chemotaktisch auf Monozyten wirkt und Monozyten zum Untersuchungszeitpunkt bereits im Vogel existieren, habe ich eine Einwanderung von Monozyten vermutet. Daraufhin habe ich histologische Semidünnschnitte mit Methylenblaufärbung und Schnitte mit Immunfluoreszenzfärbungen mittels QH1- und anti-α-SMA-Antikörpern hergestellt. Es zeigte sich jedoch im Vergleich mit den Negativkontrollen keine relevante Zunahme von Leukozyten oder Gefäßen. Da ich keinen Aminosäuresequenz-Vergleich von humanem MCP-1 und dem Äquivalent beim Huhn herstellen konnte und auch die Haltbarkeit von MCP-1 fraglich ist, konnte ich durch meine Beobachtungen keine weiteren Aussagen treffen, ob der bei den Gliomzellen dargestellte Effekt dem MCP-1 oder einer weiteren Interaktion der Tumorzellen mit der CAM zu zuschreiben war.

Andere Untersuchungen konnten nach 3 Tagen ein signifikantes Gefäßwachstum auf der CAM mit Konzentrationen von 10ng/ml und 100ng/ml MCP-1 darstellen. Dabei wurde ein Radspeichen-förmiges Muster von Gefäßen im applizierten Bereich als positives Ergebnis

gewertet (Salcedo et al., 2000; Hong et al., 2005). Weiterhin berichteten Hong et al. (2005), dass die angiogene Wirkung von MCP-1 bei Konzentrationen über 100ng/ml wieder abnahm. Demnach könnte das negative Ergebnis meiner Experimente auf eine überhöhte Konzentration zurückzuführen sein. Meine Experimente fanden allerdings auf der 13 Tage alten CAM statt, die von Salcedo et al. (2000) und Hong et al. (2005) dagegen auf der 9 bzw. 10 Tage alten CAM. Publikationen von Wilting et al. (1991) stellen diesbezüglich eine Eignung der CAM an Tag 13 zur Beobachtung der Angiogenese fest. Weiterhin wurde der Verdacht geäußert, dass Applikationen zu einem früheren Zeitpunkt auf eine noch unreife CAM treffen und sich daher die Ergebnisse allein durch den Trägereffekt auslösen ließen (Wilting et al., 1991). Zusammenfassend konnte ich eine signifikant höhere Vaskularisierung der MCP-1-Tumoren gegenüber den Kontrolltumoren darstellen. Damit konnte eine Wirkung von MCP-1 auf die Tumorangiogenese gezeigt werden. Die Art der Wirkung des produzierten MCP-1 blieb jedoch unklar.

4.4 Wirkungen von MCP-1: direkt oder durch Monozyten vermittelt

Tumoren besitzen oft ein inflammatorisches Infiltrat. Hauptbestandteil dieses Infiltrats scheinen Makrophagen oder Monozyten zu sein. Sie wurden als Tumor-begleitende Makrophagen (Tumor-assoziierte Makrophagen, TAM) bezeichnet. Ihre Funktion scheint mit der Tumorart zu variieren (Mantovani et al., 1992). Zum Einen wurde beschrieben, dass Tumorwachstum verhindert wurde (Stewart und Beetham, 1978; Rollins und Sunday, 1991). Zum Anderen schienen TAM das Tumorwachstum und die Tumorangiogenese zu unterstützen (Ueno et al., 2000). Auch das Ausmaß der Infiltration scheint mit der Tumorart zu schwanken (Mantovani et al., 1992). Allgemein akzeptiert ist jedoch, dass aktivierte Makrophagen Wachstumsfaktoren ausschütten können, die einen Einfluss auf das Tumorwachstum und die Tumorvaskularisation haben (Mantovani et al., 1992; Sunderkötter et al., 1994). Bei der Aktivierung werden bestimmte Funktionen dieser Monozyten herunterreguliert. Oftmals geht die tumorizidale Fähigkeit der Monozyten/Makrophagen verloren. Dafür exprimieren sie andere Oberflächenmoleküle und Wachstumsfaktoren, die den Tumor positiv beeinflussen können (Sunderkötter et al., 1994).

MCP-1 wirkt wie bereits besprochen über den Rezeptor CCR2 chemotaktisch auf Monozyten (Yoshimura und Leonard, 1990; Gunn et al., 1997; Monteclaro und Charo, 1997; Boring et al., 1998; Lu et al., 1998; Ni et al., 2001). Es induziert Adhäsionsmoleküle auf Monozyten

(Jiang et al., 1992; Scholz et al., 2000) und regelt dort im Gegensatz zu unseren CNS-1-Gliomzellen die Expression seines Rezeptors hoch (Han et al., 2004). In Brust- und Magentumoren mit einer Sekretion von MCP-1 wurde eine stärkere Monozyteninfiltration beobachtet als in Vergleichstumoren. Hohe MCP-1-Level korrelierten mit der Menge an TAM. Erhöhte MCP-1-Spiegel korrelierten außerdem meist mit einer negativen Prognose (Goede et al., 1999; Ueno et al., 2000; Kuroda et al., 2005; Muta, 2006). Histologische Analysen von Gliomen haben ebenfalls eine signifikante Makrophagen- und Mikrogliainfiltration dieser Tumoren gezeigt (Morantz et al., 1979; Roggendorf et al., 1996; Leung et al., 1997). Die Infiltrationsdichte korreliert dabei mit der Dichte der Vaskularisation (Nishie et al., 1999; Platten et al., 2003). Andere konnten zeigen, dass TAM in Gliomen und Gliomzellen auch hohe Level von MCP-1-mRNA exprimieren (Yoshimura et al., 1989; Leung et al., 1997; Muta et al., 2006).

Die Immunfluoreszenzfärbungen mit QH1-Antikörper und dem Kernmarker DAPI an Wachtelpräparaten ermöglichten es mir, die Einwanderung von Wirtszellen zu untersuchen. Bei den einwandernden Zellen könnte es sich um Bindegewebszellen, Endothelzellen oder Immunzellen handeln. Die rundliche Struktur vieler QH1-positiver Zellen mit rund - ovalem Zellkern und regelmäßigem Zytoplasmasaum deuteten auf Zellen des Immunsystems hin. Unter Berücksichtigung der bereits diskutierten Immunentwicklung des Vogels und der vielfach beobachteten Monozyteninfiltration von Tumoren konnte es sich somit bevorzugt um Monozyten handeln. Zusammenfassend konnte ich somit zeigen, dass es in CNS-1-Gliomen zu einer starken Einwanderung von Monozyten kommt. Ebenfalls konnte ich zeigen, dass die MCP-1-produzierenden CNS-1 Gliome eine wesentlich höhere Einwanderungsrate von Monozyten besitzen als die Kontrollgliome. Ein weiterer Unterschied bestand in der Vaskularisation, mit deutlicherer Kapillarisierung und Perfusion der rMCP-1-transfizierten Gliome. Angesichts der zuvor für Gliome beschriebenen erhöhten Makrophageninfiltration bei hohen MCP-1-Spiegeln (Desbaillets et al., 1994; Leung et al., 1997, Platten et al., 2003) und der ebenfalls beschriebenen höheren Gefäßdichte unter MCP-1 (Platten et al., 2003) legt die Schlussfolgerung nahe, dass hohe MCP-1-Produktion in Gliomen auch bei Vogel-Xenon-Transplantaten eine hohe Monozyteninfiltration bedingen und diese wiederum zu einer besseren Angiogenese, Arteriogenese und Venogenese in diesen Tumoren beitragen. In einigen Experimenten hat sich allerdings keine vermehrte Gefäßdichte durch MCP-1 gezeigt, sondern lediglich eine schnellere Bildung von Gefäßen. Das Ausmaß der Angiogenese blieb im Vergleich mit den Kontrollen in späteren Stadien gleich (Hoefer et al., 2001). Somit liegt

die Schlussfolgerung nahe, dass die bestehende Entzündungsreaktion oder Tumorreaktion und die entsprechende Neovaskularisation durch TAM in jedem Tumor besteht, jedoch durch MCP-1 und entsprechende Rekrutierung von Monozyten gefördert bzw. beschleunigt wird.

Zusätzlich sollte jedoch das Tumorstroma, und insbesondere die Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Gefäße, betrachtet werden. Es stellte sich mir also die Frage, ob eine Angiogenese durch MCP-1 indirekt über Makrophagen stattfand und damit das Tumorwachstum positiv beeinflusst wurde, oder ob die Angiogenese auch direkt durch MCP-1 vermittelt wurde. Die lockerere Struktur der MCP-1-Tumoren im Gegensatz zur kompakten, wirbelförmigen Struktur der Kontrolltumoren ließ auf eine stärkere Einwanderung von Wirtszellen schließen. Ersichtlich wurde dies durch den Wachtel-spezifischen Marker QH1, mit dem eine stärkere Wechselwirkung der MCP-1-Tumoren mit ihrer Umgebung gezeigt werden konnte. Fluoreszenzaufnahmen mit QH1 und anti-α-SMA zeigten Gefäße in den Tumoren, die mit Endothel ausgekleidet waren sowie eine hohe Anzahl an Myofibroblasten und glatten Muskelzellen im Tumor. Die Endothelien dieser Gefäße ließen sich durch QH1 markieren. Dies zeigt, dass sie aus der Wachtel als Wirtsorganismus stammen. Die MCP-1-Tumoren waren dabei dichter mit Kapillaren versorgt. Auch eine Narbenbildung war bei den Untersuchungen mit Immunperoxidase deutlicher bei den MCP-1-Tumoren sichtbar. Somit war eine Wirtsgewebsreaktion bei den MCP-1-Tumoren wesentlich stärker. Eine direkte Wirkung von MCP-1 auf Endothelzellen und glatte Muskelzellen war somit möglich und wurde von mir weiter untersucht. Untersuchungen der Wundheilung und von entzündetem Gewebe konnten den CCR2 Rezeptor auf arteriellen und venösen Endothelzellen nachweisen. Dabei wurde CCR2 durch Entzündungsmediatoren wie Zytokine zusätzlich hochreguliert (Weber et al., 1999). Andere Arbeiten haben gezeigt, dass Endothelzellen keine CC-Chemokin-Rezeptoren und damit weder CCR2 noch CCR1 besitzen (Feil und Augustin, 1998). Globale Mikroarrayanalysen zeigen aber eine Expression von CCR2 auf HUVECs (Wilting, Internet-Daten). Außerdem konnte ein Einfluss von MCP-1 auf glatte Muskelzellen beschrieben werden (Denger et al., 1999; Schecter et al., 2004). Versuche die mRNA-Expression der Rezeptoren CCR1 und CCR2 mittels real-time RT-PCR darzustellen gelangen mir zunächst nicht. Im Vergleich mit Monozyten als Positivkontrolle ergab sich praktisch keine Expression dieser Rezeptoren auf HUVECs und glatten Muskelzellen. Da es sich hier aber um eine relative, vergleichende Darstellung der Rezeptoren handelt, konnte eine geringe Expression nicht völlig ausgeschlossen werden. Daher stimulierte ich Endothelzellen der Umbilikalvene (HUVECs) und glatte Muskelzellen der Lunge (HPA-SMCs) einmalig und

zweimalig mit MCP-1. Die Stimulation fand alle 24h statt. Im Vergleich zu unstimulierten Zellen konnte ich dabei sowohl bei den Endothelzellen als auch den glatten Muskelzellen einen relativen Anstieg der Expression von CCR2 messen. Der Unterschied war sowohl für die zeitliche Expression der einzelnen Rezeptoren, als auch für den Unterschied zwischen CCR1 und CCR2 signifikant. Somit kann eine Expression des MCP-1-Rezeptors CCR2 auf HUVECs und HPA-SMCs demonstriert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass dieser Rezeptor durch MCP-1-Stimulation *in-vitro* hoch reguliert wird.

Zur Untersuchung des Einflusses von MCP-1 auf die Proliferation beider Zellarten habe ich Proliferationsassays durchgeführt. Im Falle der HUVECs konnte ich jedoch keinen proliferativen Stimulus durch Konzentrationen bis 50ng/ml MCP-1 nachweisen. Dies legt nahe, dass MCP-1 auf Endothelzellen keinen proliferativen Effekt hat, sondern, unter Berücksichtigung der dargestellten Wachtelendothelzellen im Tumor, lediglich eine Migration von Endothelzellen auslöst. Salcedo et al. (2000) haben die Migration von HUVECs mit MCP-1-Dosis-abhängigen Migrationsassays demonstriert. In anderen Versuche konnte Sekretion von MCP-1 durch Endothelzellen gezeigt werden (Miyamoto et al., 2002). Somit scheinen Endothelzellen durch MCP-1-Induktion vermehrt zu migrieren, ihre Rezeptoren für MCP-1 vermehrt zu exprimieren und selbst MCP-1 zu bilden. Damit wäre eine Wechselwirkung und gegenseitige Steigerung zwischen Endothelzellen, Monozyten und Tumorzellen denkbar. Alternativ haben Hong et al. (2005) gezeigt, dass MCP-1 in humanen Endothelzellen der Aorta (HAECs) über HIF-1α VEGF-A_{165} induziert. VEGF-A ist ein potenter Angiogenesefaktor, der durch Stickstoffmonoxid (NO) zu Gefäßerweiterung und Gefäßneubildung führt (Bouloumié et al., 1999; Bussolati et al., 2001). Außerdem fördert VEGF-A die Proliferation von Endothelzellen (Wilting et al., 1992; Zhang H und Issekutz, 2002). Auch Yamada et al. (2003) konnten durch Neutralisierung von MCP-1 die VEGF-A vermittelte Angiogenese inhibieren. Somit könnte die durch MCP-1 ausgelöste Produktion von VEGF-A durch Endothelzellen zur Kapillarisierung der Gliome beitragen.

Meine Proliferationsassays mit glatten Muskelzellen zeigen dagegen eine Zunahme der Proliferation *in-vitro* unter MCP-1 Stimulation ab Konzentrationen von 50ng/ml. Auch bei ihnen konnte ich eine Zunahme der mRNA Expression des CCR2 Rezeptors unter MCP-1 Stimulation beobachten. Andere Veröffentlichungen legen den Schluss nahe, dass glatte Muskelzellen einen alternativen Rezeptor für MCP-1 besitzen. Allerdings ist die Wirkung von MCP-1 auf glatte Muskelzellen nicht umstritten (Schecter et al., 2004). Im Gegensatz zu

Skelett- oder Herzmuskelzellen besitzen glatte Muskelzellen der Gefäße auch im erwachsenen Individuum die Fähigkeit, ihre Morphologie den Umständen anzupassen und so z.B. zu proliferieren, migrieren und extrazelluläre Matrix zu produzieren (Owens et al., 2004). So konnte gezeigt werden, dass Sauerstoffmangel zu einer Sekretion von MCP-1 durch vaskuläre glatte Muskelzellen führt (Lee et al., 2005). Zusätzlich konnte Jauchem (1982) zeigen, dass das Medium glatter Muskelzellen chemotaktisch auf Monozyten wirkte. Denger et al. (2006) stellten eine Phänotypveränderung der glatten Muskelzellen vom kontraktilen zum synthetisierenden Typ fest. Dieser Zelltyp besitzt eine wesentlich höhere Anzahl von interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und VCAM-1) für Interaktionen mit Monozyten und anderen Zellen (Scholz et al., 2000; Denger et al., 2006). Scholz et al. (2000) zeigten zusätzlich eine Monozytenadhäsion 12 Stunden nach Okklusion einer zuführenden Arterie. Etwa 24 Stunden nach dem Erstereignis traten Mitosen von Endothelzellen und glatten Muskelzellen auf. Insgesamt steigert MCP-1 Adhäsionsmoleküle auf Monozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen und damit die Monozyteninfiltration und die Gefäßmodellierung (Scholz et al., 2000). In meinen Immunperoxidasefärbungen der Tumorschnitte wurde eine Wirkung des Tumors auf glatte Muskelzellen der Media ersichtlich. In der Peripherie des Tumors liegende größere CAM-Gefäße zeigten auf der Tumor-zugewandten Seite eine aufgelockerte Struktur der Media. Die glatten Muskelzellen waren unruhiger in ihrer Anordnung und schienen auf den Tumor ausgerichtet, als würden sie auf ihn zu wandern. Dies war in MCP-1-Gliomen aber auch in den Kontrolltumoren ersichtlich. Zusätzlich dazu konnte ich in MCP-1-Gliomen ein Einwandern der Tumorzellen in die Media dieser Gefäße darstellen. Nimmt man in den MCP-1-Gliomen die erhöhte Menge an Glattmuskel-Aktin-positiven Zellen gegenüber den Kontrolltumoren hinzu, liegt der Schluss nahe, dass MCP-1 die Interaktion zwischen Tumorzellen und glatten Muskelzellen fördert. Die Affinität beider Zellen zueinander scheint durch MCP-1 zu steigen. Weiterhin stellt das Einwandern in die Media von Gefäßen und ein Wachstum entlang dieser einen Versorgungsvorteil der Zellen dar.

Abschließend konnte ich die CAM als Tumorangiogenesemodell für die Wirkung von MCP-1-produzierenden CNS-1-Ratten-Gliomzellen etablieren. Man kann zusammenfassend sagen, dass die rMCP-1-Gliomzellen zueinander einen größeren Zellabstand haben, besser vaskularisiert und stärker durch Monozyten infiltriert sind als die Kontrolltumoren. Vor allem scheint es sich hier um Kapillaren zu handeln, die entweder durch die lockerere Struktur nicht abgedrückt werden oder an sich zahlreicher gebildet wurden. Die Gefäße der MCP-1-

produzierenden Gliome besitzen ein Endothel aus eingewanderten Endothelzellen des Wirtsorganismus. Der Glattmuskel-Aktinanteil ist signifikant höher als der der Kontrolltumoren. Das Glattmuskelaktin steht nur in peripheren größeren Gefäßen mit den Endothelzellen in direkter Verbindung. Dies stützt die Hypothese, dass im Gliom vor allem Kapillaren gebildet werden. Dennoch sind größere Gefäße der rMCP-1-transfizierten Gliome mit wesentlich mehr Glattmuskelaktin ummantelt als die in den Kontrolltumoren. Zusammen mit den makroskopischen Untersuchungen könnte man also annehmen, dass bereits bestehende Gefäße der CAM vom Tumor rekrutiert und durch Venogenese und Arteriogenese zu größeren ableitenden Gefäßen umgewandelt werden. MCP-1-Gliomzellen wurden vermehrt in der Media von größeren Gefäßen gesehen. Die glatten Muskelzellen dieser Gefäße schienen ebenfalls in Richtung Tumor zu migrieren. Endothelzellen wanderten in die MCP-1-Gliome ein. Endothel- und glatte Muskelzellen regeln ihre Expression von CCR2 unter MCP-1 hoch. Dies spricht für eine erhöhte Interaktion dieser Zellen mit den MCP-1-produzierenden Gliomzellen gegenüber den Kontrollzellen, sowie für einen direkten Einfluss des MCP-1 auf Endothel- und glatte Muskelzellen. Einwanderung von Makrophagen bzw. Monozyten konnte ebenfalls beobachtet werden. MCP-1 induziert dabei laut Literaturangaben sowohl Adhäsionsmoleküle in glatten Muskelzellen als auch auf den Monozyten selbst (Scholz et al., 2000; Denger et al., 2006). Weiterhin wird der Rezeptor CCR2 auf Monozyten durch MCP-1 autokrin hoch reguliert (Han et al., 2004). Zusammen mit Belegen der Literatur für eine chemotaktische Wirkung von MCP-1 auf Monozyten und der vermehrten Angiogenese bei steigender Infiltration der Gliome, kann ein Einfluss der Monozyten auf die Tumorangiogenese angenommen werden. Ich konnte nicht sicher differenzieren, ob der Monozyteneinfluss oder der direkte MCP-1-Einfluss auf Stromazellen die Tumorangiogenese maßgeblich förderten. Angesichts der gezeigten Wirkung von humanem MCP-1 auf HUVECs und HPA-SMCs und den durch Literaturbelege dargestellten Monozyteneinfluss, ist eine gemeinsame sich gegenseitig eventuell fördernde Wirkung von MCP-1-produzierenden Gliomzellen, Monozyten, Endothelzellen und glatter Muskelzellen anzunehmen.

5 Zusammenfassung

Ziel meiner Arbeit war die Untersuchung der Wirkung des Chemokines MCP-1 bei der Progression des Glioms. Ich habe experimentelle Rattengliome der Zelllinie CNS-1 auf der Chorioallantoismembran (CAM) von *Gallus gallus domesticus* und *Coturnix coturnix japonica* wachsen lassen. Die CNS-1-Gliome waren zuvor mit dem Vektor für rMCP-1 und dem Leervektor pcDNA3 (Kontrolle) stabil transfiziert werden, so dass zwei Zelllinien mit bzw. ohne (Kontrolle) rMCP-1-Produktion untersucht werden konnten. *In-vitro*-Proliferationsassays zeigen einen deutlichen Wachstumsvorteil der Kontrollgliomzellen. I*n-vivo*-CAM-Assays zeigen dagegen einen deutlichen Vorteil der rMCP-1-Zellen in Bezug auf Größenwachstum und Gefäßdifferenzierung in den Tumoren. Bei Untersuchungen mit dem Antikörper gegen Glattmuskel-Aktin (anti-α-SMA-Antikörper) sah man bei den rMCP-1-Gliomen eine signifikant höhere Zahl von Myofibroblasten bzw. glatten Muskelzellen als bei den Kontrolltumoren. In beiden Gliomen deutet sich eine Migration von glatten Muskelzellen aus der Media der Gefäße zum Tumor hin an. Zusätzlich konnte in rMCP-1-Gliomen eine Einwanderung von Gliomzellen in die Media der Gefäße beobachtet werden. Zusätzliche Färbungen mit QH1-Antikörpern zeigen eine vermehrte Einwanderung von Wachtelimmunzellen und Endothelzellen und somit eine erhöhte Kapillarisierung und Perfusion in rMCP-1-Gliomen gegenüber den Kontrollgliomen. Größere Gefäße besaßen in der Doppel-Färbung eine Schichtung aus Endothel und Media. Insgesamt zeigt sich ein stärkeres Auftreten von Kapillaren und Venolen, also eine stärkere Angio- und Venogenese bei den rMCP-1-Gliomen. CAM-Assays mit isoliertem humanem rekombinanten MCP-1 zeigen jedoch weder Ergebnisse hinsichtlich Angiogenese noch der Einwanderung von Monozyten. Gründe können die Beständigkeit von MCP-1 oder Strukturungleichheiten des Proteins zwischen verschiedenen Spezies sein. Zur Differenzierung des Einflusses von MCP-1 auf Endothelzellen und glatte Muskelzellen habe ich HUVECs und HPA-SMCs als *in-vitro*-Modell gewählt. In Proliferationsassays mit humanem rekombinantem MCP-1 zeigt sich kein Proliferationsvorteil für HUVECs. Bei HPA-SMCs kann ein statistisch signifikanter Proliferationsvorteil bei Konzentrationen von 50 und 100ng/ml MCP-1 gezeigt werden. Real-time RT-PCRs von HUVECs und HPA-SMCs zeigen für beide das Vorhandensein der MCP-1-Rezeptoren CCR1 und CCR2, jedoch vergleichend mit humanen Monozyten in sehr geringem Maße. Die Expression von CCR2-mRNA konnte jedoch nach Stimulation mit MCP-1 sowohl in HUVECs als auch in HPA-SMCs gesteigert werden. Dies zeigt einen direkten Einfluss von MCP-1 auf HUVECs und HPA-SMCs. Zur Überprüfung eines möglichen autokrinen Effektes der Gliomzellen wurde die mRNA-Expression der Ratten-

MCP-1-Rezeptoren CCR2 und CCR4 in den Gliomzellen mittels real-time RT-PCR bestimmt. Hierbei zeigt sich eine niedrigere mRNA-Expression beider MCP-1-Rezeptoren bei den rMCP-1-Gliomen. Einen positiven autokrinen Effekt der Gliomzellen schließe ich daher aus. Fakt ist also, dass die rMCP-1-Gliome eine bessere Tumorangiogenese bzw. -venogenese besitzen. Ebenfalls konnte ich zeigen, dass sie eine höhere Monozyteneinwanderung aufweisen als die Kontrolltumoren. *In vitro* zeigt sich auch ein Einfluss von MCP-1 auf HUVECs und HPA-SMCs. Zusammenfassend kann ich sagen, dass MCP-1 die Tumorprogression fördert, allerdings bleibt unklar, ob MCP-1 die Angiogenese indirekt mittels Monozyten oder direkt durch Wirkungen auf glatte Muskelzellen bzw. Endothelzellen beeinflusst. Jedoch sind beide Wege parallel denkbar. Die CAM wurde erfolgreich als Tumorangiogenesemodell für Gliome etabliert.

6 Literaturverzeichnis

Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, Risau W, Klein R (1999): Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* **13:** 295-306

Arras M, Wulf DI, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W (1998): Monocyte Activation in Angiogenesis and Collateral Growth in the Rabbit Hindlimb. *J Clin Invest* **101/1:** 40-50

Augustin HG, Reis Y (2003): EphB receptors and ephrinB ligands: regulators of vascular assembly and homeostasis. *Cell Tissue Res* **314:** 25-31

Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J (1974): Differentiation of vascular Endothelium in the Chick Chorioallantois: A Structural and Autoradiographic Study. *Dev Biol* **38:** 237-248

Badie B, Schartner J (2001): Role of Microglial in Glioma Biology. *Microsc Res Tech* **54:** 106-113

Berlit P: Klinische Neurologie, 2. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2006

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF (1998): Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Natur* **394:** 894-897

Bouloumié A, Schini-Kerth VB, Busse R (1999): Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res* **41:** 773-780

Buschmann I, Katzer E, Bode C (2003): Arteriogenesis - is this terminology necessary?. *Basic Res Cardiol* **98:** 1-5

Bussolati B, Dunk C, Grohman M, Kontos CD, Mason J, Ahmed A (2001): Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Modulates Vascular Endothelial Growth Factor-Mediated Angiogenesis via Nitric Oxide. *Am J Pathol* **159:** 993-1008

Caprioli A, Jaffredo T, Gauttier R, Dubourg C, Dieterlen-Lièvre F (1998): Blood-borne seeding by haemapoietic and endothelial precursors from the allantois. *Dev Biol* **95:** 1641-1646

Caprioli A, Minko K, Drevon C, Eichmann A, Dieterlen-Lèvre F, Jaffredo T. (2001): Hemangioblast Commitment in the Avian Allantois: Cellular and Molecular Aspects. *Dev Biol* **238:** 64-78

Carmeliet P (2000): Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Natur* **3:** 389-395

Cohen Jr. MM 2006: Vascular Update: Morphogenesis, Tumors, Malformations, and Molecular Dimensions. *Am J Med Genet Part A* **140A:** 2013-2038

Cooper MD, Chen C-L H, Bucy RP, Thompson CB (1991): Avian T Cell Ontogeny. *Adv Immunol* **50:** 87-117

COPE (2009a): http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=CNS-1 (Stand: 06.02.2009)

COPE (2009b): http://copewithcytokines.de/cope.cgi?keyJE (Stand 22.05.2009)

COPE (2009c): http://copewithcytokines.de/cope.cgi?keyMCP-1 (Stand 22.05.2009)

Denger S, Jahn L, Wende P, Watson L, Gerber SH, Kübler W, Kreuzer J (1999): Expression of monocyte chemoattractant protein-1 cDNA in vascular smooth muscle cells: induction of the synthetic phenotype - A possible clue to SMC differentiation in the process of atherogenesis. *Atherosclerosis* **144:** 15-23

Desbaillets I, Tada M, De Tribolet N, Diserens A-C, Hamou M-F (1994): Human Astrocytomas and Glioblastomas express Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) InVivo and InVitro. *Int J Cancer* **58:** 240-247

Djonov V, Baum O, Burri PH (2003): Vascular remodeling by intusseptive angiogenesis. *Cell Tissue Res* **314:** 107-117

Feil C, Augustin HG (1998): Endothelial Cells Differentially Express Functional CXC-Chemokin Receptor-4 (CXCR-4/Fusin) under the Control of Autocrine Activity and Exogenous Cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* **247:** 38-45

Ficoll-Paque® Handbuch 71-7167-00 Pharmacia Biotech

Flamme I, Breier G, Risau W (1995): Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF Receptor 2 (flk-1) are expressed during Vasculogenesis and vascular differentiation in the Quail Embryo. *Dev Biol* **169:** 699-712

Flamme I, Fröhlich T, Risau W (1997): Molecular Mechanisms of Vasculogenesis and Embryonic Angiogenesis. *J Cell Physiol* **173:** 206-210

Folkman J (1974): Tumor Angiogenesis Factor. *Cancer Res* **34:** 2109-2113

Folkman J (1985): Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* **43:** 175-203

Folkman J, Watson K, Donald I, Hanahan D (1989): Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Natur* **339:** 58-61

Franci C, Wong LM, Damme JV, Proost P, Charo IF (1995): Monocyte Chemoattractant Protein-3, but not Monocyte Chemoattractant Protein-2, is a functional Ligand of the human Monocyte Chemoattractant Protein-1 Receptor. *J Immunnol* **154:** 6511-6517

Gerhardt H, Betsholtz C 2003: Endothelial - pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* **314:** 15-23

Goede V, Brogelli L, Ziche M, Augustin HG (1999): Induction of Inflammatory Agiogenesis by Monocyte Chemoattractant protein-1. *Int J Cancer* **82:** 765-770

Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Plate KH, Vince GH, Roosen K, Tonn J-C (1999): Vascularization of Human Glioma Spheroids implanted into Rat Cortex is conferred by two distinct Mechanisms. *J Neurosci Res* **55:** 486-495

Goldbrunner RH, Wagner S, Roosen K, Tonn J-C (2000): Models for assessment of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol* **50:** 53-62

Gronenborn AM, Clore GM (1991): Modeling the three-dimensional structure of the monocyte chemo-attractant and activating protein MCAF/MCP-1 on the basis of the solution structure of interleukin-8. *Protein Eng* **4:** 263-269

Gunn MD, Nelken NA, Liao X, Williams LT (1997): Monocyte Chemoattractant Protein-1 is Sufficient for the Chemotaxis of Monocytes and Lymphocytes in Transgenic Mice but Requires an Additional Stimulus for Inflamatory Activation. *J Immunol* **158:** 376-383

Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2001

Hamilton LH: Lillie's Development of the Chick - An Introduction to Embryology, 3. Auflage, Holt, Rinehart and Winston, New York 1965

Han KH, Hong K-H, Park J-H, Ko J, Kang D-H, Choi K-J, Hong M-K, Park S-W, Park S-J (2004): C-reactive Protein promotes Monocyte Chemoattractant Protein-1 – mediated Chemotaxis through upregulating CC Chemokine Receptor 2 Expression in human Monocytes. *Circulation* **109:** 2566-2571

Hanahan D, Folkman J (1996): Patterns and Emerging Mechanisms o the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* **86:** 353-364

Hirschi KK, D'Amore PA (1996): Pericytes in the microvascular. *Cardiovasc Res* **32:** 687-698

Hoefer IE, van Royen N, Buschmann IR, Piek JJ, Schaper W (2001): Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *CardiovascRes* **49:** 609-617

Hoefer IE, Grundmann S, van Royen N, Voskuil M, Schirmer SH, Ulusuans S, Bode C, Buschmann IR, Piek JJ (2005): Leukocyte subpopulations and arteriogenesis: Specific role of monocytes, lymphocytes and granulocytes. *Atherosclerosis* **181:** 285-293

Holmgren L, Glaser A, Pfeifer-Ohlson S, Ohlson R (1991): Angiogenesis during human extra-embryonic development involves the spatiotemporal control PDGF ligand and receptor gene expression. *Development* **13:** 749-754

Hong KH, Ryu J, Han KH (2005): Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood* **105/4:** 1405-1407

Houssaint E, Belo M, Le Douarin NM (1976): Investigations on Cell Lineage and Tissue Interactions in the Developing Bursa of Fabricius through Interspecific Chimeras. *Dev Biol* **53:** 250-264

IHOP: http://www.ihop-net.org/

Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W (1997): Monocyte Chemotactic Protein-1 increases Collateral and Peripheral Conductance after Femoral Artery Occlusion. *Circ Res* **80:** 829-837

Jauchem JR, Lopez M, Sprangue EA, Schwartz CJ (1982): Mononuclear Cell Chemoattractant Activity from Cultured Arterial Smooth Muscle Cells. *Exp Mol Pathol* **37:** 166-174

Jiang Y, Beller DI, Frendl G, Graves DT (1992): Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates Adhesion Molecule Expression and Cytokine Production in human Monocytes. *J Immunol* **148:** 2423-2428

Joussen AM, Kirchhof B, Gottstein C 2003: Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. *Ophthalmologe* **100:** 284-291

Kuroda T, Kitadai Y, Tanaka S, Yang X, Mukaida N, Yoshihara M, Chayama K (2005): Monocyte Chemoattractant Protein-1 Transfection induces Angiogenesis and Tumorigenesis of Gastric Carcinoma in Nude Mice via Macrophage Recruitment. *Clin Cancer Res* **11(21):** 7629-7636

Kuwano M, Fukushi J, Okamoo M, Nishie A, Goto H, Ishibashi T, Ono M (2001): Angiogenesis Factors. *Intern Med* **40 (7):** 565-572

Lange S, Bender R (2001a): Was ist ein Signifikanztest?. *Dtsch Med Wochenschr* **126:** T42-T44

Lange S, Bender R (2001b): Was ist der p-Wert?. *Dtsch Med. Wochenschr* **126:** T39-T40

Lee P-C, Ho I-C, Lee T-C (2005): Oxidative Stress Mediates Sodium Arsenite-Induced Expression of Heme Oxygenase-1, Monocyte Chemoattractant Protein-1, and Interleukin-6 in Vascular Smooth Muscle Cells. *Toxicol Sci* **85:** 541-550

Leeson TS, Leeson CR (1963): The chorio-allantois of the chick. Light and electron microscopic observations at various times of incubation. *J Anat Lond.* **97/4 :** 585-595

Leung SY, Wong MP, Chung LP, Chan ASY, Yuen ST (1997): Monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in gliomas. *Acta Neuropathol* **93:** 518-527

Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerad C, Rollins BJ (1998): Abnormalities in Monocyte Recruitement and Cytokine Expression in Monocyte Chemoattractant Protein-1-deficient Mice. *J Exp Med* **4:** 601-608

Mantovani A (1982): The Interaction of Cancer Chemotherapy Agents with Mononuclear Phagocytes. *Adv Pharmacol Chemother* **19:** 35-66

Mantovani A, Botazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L (1992): The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* **13/7:** 265-270

Matsushima K, Larsen CG, DuBois GC, Oppenheim JJ (1989): Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med* **169:** 1485-1490

Mentlein R, Held-Feindt J (2003): Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumour therapy?. *Naturwissenschaften* **90:** 385-394

Miyamoto H, Sugawara I, Azuma A, Saito Y, Kohno N, Kudoh S (2002): Differential secretion of cytokines and adhesion molecules by HUVEC stimulated with low concentrations of bleomycin. *Cell Immunol* **219:** 73-81

Monteclaro FS, Charo IF (1997): The Amino-terminal Domain of CCR2 Is Both Necessary and Sufficient for High Affinity Binding of Monocyte Chemoattractant Protein 1. *J Biol Chem* **272/37:** 23186-23190

Morantz RA, Wood GW, Foster M, Clark M, Gollahon K (1979): Macrophages in experimental and human brain tumors. Part 2: studies of the macrophage content of human brain tumors. *J Neurosurg* **50/3:** 305-311

Mühlhardt: Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, 4. Auflage, Spektrum, München 2003

Muhs A, Lenter MC, Seidler RW, Zweigerdt R, Kirchengast M, Weser R, Ruediger M, Guth B (2004): Nonviral monocyte chemoattractant protein-1 gene transfer improves arteriogenesis after femoral artery occlusion. *Gene Ther* **11:** 1685-1693

Muta M, Matsumoto G, Nakashima E, Toi M (2006): Mechanical Analysis of Tumor Growth Regression by Cyclooxygenase-2 Inhibitor, DFU, in a Walker256 Rat Tumor Model: Importance of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Modulation. *Clin Cancer Res* **12/1:** 264-272

Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T, Inoue N, Hirata K-I, Matsukawa A, Morshita R, Kaneda Y, Yokoyama M (2002): Local Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 at Vessel Wall induces Infiltration of Macrophage and Formation of Atherosclerotic Lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22:** 115-120

NCBI-Align 2 Sequences (2006): http.//www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi (Stand: 15.10.2006)

NCBI-Blast (2006): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi (Stand: 15.10.2006)

NCBI-Nukleotides (2006): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide (Stand: 15.10.2006)

NCBI-Startseite (2006): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/ (Stand: 15.10.2006)

Nesbit M, Schaider H, Miller TH, Herlyn M (2001): Low-Level Monocyte Chemoattractant Protein-1 Stimulation of Monocytes leads to Tumor formation in nontumorigenic Melanoma cells. *J Immunol* **166:** 6483-6490

Ni W, Egashira K, Kitamoto S, Kataoka C, Konyanagi M, Inoue S, Imaizumi K, Akiyama C, Nishida K-I, Takeshita A (2001): New Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Therapy Attentuates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice. *Ciculation* **103:** 2096-2101

Nicosia RF, Tchao R, Leighton J (1986): Interactions between newly formed endothelial channels and carcinoma cells in plasma clot cultures. *Clin Exp Metastasis* **4/2:** 91-104

Nishie A, Ono M, Shono T, Fukushi J, Otsubo M, Onoue H, Ito Y, Inamura T, Ikezaki K, Fukui M, Iwaki T, Kuwano M (1999): Macrophage Infiltration and Heme Oxygenase-1 Expression Correlate with Angiogenesis in Human Gliomas. *Clin Cancer Res* **5:** 1107-1113

Nützel F: Relative Quantifizierung vaskulogenese- und angiogenese-assozierter Wachstumsfaktoren der frühen Embryonalentwicklung des Huhns (*Gallus gallus domesticus*) mittels der real-time RT-PCR. *Vet Med Diss* München 2005

Oh S-J, Jeltsch MM, Birkenhäger R, McCarthy JEG, Weich HA, Christ B, Alitalo K, Wilting J (1997): VEGF and VEGF-C: Specific Induction of Angiogenesis and Lymphangiogenesis in the Differentiated Avian Chorioallantoic Membrane. *Dev Biol* **188:** 96-109

OMIM (2006):http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM&itool=toolbar (Stand: 15.10.2006)

Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR (2004): Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol Rev* **84:** 767-801

Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lievre F (1989): Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* **105:** 473-485

Patan S, Haenni B, Burri PH (1996): Implementation of Intusseptive Microvascular Growth in the Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM)–1. Pillar Formation by Folding of the Capillary Wall. *Microvasc Res* **51:** 80-98

Patan S, Haenni B, Burri PH (1997): Implementation of Intusseptive Microvascular Growth in the Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM)–2. Pillar Formation by Capillary Fusion. *Microvasc Res* **53:** 33-52

Patan S (2000): Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol* **50:**1-15

Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W (1993): Up-regulation of vascular endothelial growth factor and ist cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res* **53:** 5822-5827

Platten M, Kretz A, Naumann U, Aulwurm S, Egashira K, Isenmann S, Weller M (2003): Monocyte Chemoattractant Protein – 1 Increases Microglial Infiltration and Aggressivness of Gliomas. *Ann Neurol* **54:** 388-392

Polverini PJ (1977): Acticated macrophages induce vascular proliferation. *Natur* **269:** 804-806

Polverini PJ, Leibovich SJ (1984): Induction of Neovascularization in Vivo and Endothelial Proliferation in Vitro by Tumor-Associated Macrophages. *Lab Invest* **51/6:** 635-642

Pudliszewski M, Pardanaud L (2005): Vasculogenesis and angiogenesis in the mouse embryo studied using quail/mouse chimeras. *Int J Dev Biol* **49:** 355-361

Qureshi MA, Heggen CL, Hussain I (2000): Avian macrophage: effector functions in health and disease. *Dev Comp Immunol* **24:** 103-119

Ribatti D, Vacca A, Dammacco F (1999): The Role of the Vascular Phase in Solid Tumor Growth: A Historical Review. *Neoplasia* **4:** 293-302

Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A (2006) The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia*: 1-9

Riede U-N, Werner M, Schäfer H-E: Allgemeine und spezielle Pathologie, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2004

Risau W (1997): Mechanisms of angiogenesis. *Natur* **386:** 671-674

Risau W, Flamme I (1995): Vasculogenesis. *Annu Rev Cell.Dev Biol* **11:** 73-91

Roggendorf W, Strupp S, Paulus W (1996): Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. *Acta Neuropathol* **92:** 288-293

Rollins BJ (1997): Chemokines. *Blood* **3:** 909-928

Rollins BJ, Sunday ME (1991): Suppression of Tumor Formation InVivo by Expression of the JE Gene in Malignant Cells. *Mol Cell Biol* **11/6:** 3125-3131

Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M (1991): Recombinant Human MCP-1/JE Induces Chemotaxis, Calcium Flux, and the Respiratory Burst in Human Monocytes. *Blood* **78/4:** 1112-1116

Ross R (1993): The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Natur* **362:** 801-809

Safari MN, Garcia-Zepeda EA, MacLean JA, Charo IF, Luster AD (1997): Murine Monocyte Chemoattractant Protein (MCP) – 5: A novel CC Chemokine that is structural and functional homologue of human MCP – 1. *J Exp Med* **185/1**: 99-109

Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wassermann K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ (2000): Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* **96:** 34-40

Schecter AD, Berman AB, Yi L, Ma H, Daly CM, Soejima K, Rollins BJ, Charo IF, Taubman MB (2004): MCP-1-dependent signaling in CCR2-/- aortic smooth muscle cells. *J Leukoc Biol* **75:** 1079-1085

Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K: Anatomie, 8. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York 1999

Schirmer SH, Buschmann IR, Jost MM, Hoefer IE, Grundmann S, Andert J-P, Ulusans S, Bode C, Piek JJ, van Royen N (2004): Differential effects of MCP-1 and leptin on collateral flow and arteriogenesis. *Cardiovasc Res* **64:** 356-364

Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, Busse R, Schaper J, Schaper W (2000): Ultrastructure and molecular histologie of rabbit-hindlimb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch* **436:** 257-270

Sehgal A (1998): Molecular Changes during the Genesis of Human Gliomas. *Semin Surg Oncol* **14:** 3-12

Sethi N, Brookes M (1971): Ultrastructure of the blood vessels in the chick allantois and chorioallantois. *J Anat* **109/1:** 1-15

Siegenthaler W: Klinische Pathophysiologie, 8. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart 2001

Stanford Universität 2006: http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult?option =Number&criteria=NM_00648&choice=Gene (Stand:19.12.2006)

Stewart CC, Beetham KL (1978): Cytocida Activity and Proliferative Ability of Macrophages Infiltrating the EMT6 Tumor. *Int J Cancer* **22:** 152-159

Sunderkötter C, Goebeler M, Schulze-Osthoff K, Bhardwaj R, Sorg C (1991): Macrophage-derived Angiogenesis Factors. *Pharmac Ther* **51:** 195-216

Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C (1994): Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* **55:** 410-422

Swissprot (2006): http://www.expasy.ch/sprot/ und http://www.expasy.org/cgi- bin/niceprot.pl/printable?ac=P32246 (Stand 19.12.2006)

Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Inadera H, Matsushima K (2000): Significance of Macrophage Chemoattractant Protein-1 in Macrophage Recruitement, Angiogenesis, and Survival in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **6:** 3282-3289

van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hoefer I, Voskuil M, Schaper W (2001) : Stimulation of arteriogenesis : a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res* **49:** 543-553

Wang HU, Chen Z-F, Anderson DJ (1998): Molecular Distinction and Angiogenic Interaction between Embryonic Arteries and Veins Revealed by ephrin-B2 and Its Receptor Eph-B4. *Cell* **93:** 41-753

Weber KSC, Nelson PJ, Gröne H-J, Weber C (1999): Expression of CCR2 by Endothelial Cells: Implications for MCP-1 mediated Wound Injury Repair and In Vivo Inflammatory Activation of Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19:** 2085-2093

Wesseling P, Schlingemann RO, Rietveld FJ, Link M, Burger PC, Ruiter DJ (1995): Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immuno-light and immuno-electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* **54/3:** 304-310

Wikipedia (2009 a): http://de.wipedia.org/wiki/Ficoll (Stand 22.06.2009)

Wikipedia (2009b): http://de.wikipedia.org/wiki/real_time_quantitative_PCR (Stand 22.06.2009)

Wikipedia (2009c): http://de.wikipedia.org/wiki/varianz (Stand 22.06.2009)

Williams LT (1989): Signal transduction by the platelet-derived growth factor. *Science* **243:** 1564-1570

Wilting J, Christ B, Bokeloh M (1991): A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors. *Anat Embryol* **183:** 259-271

Wilting J, Christ B, Weich HA (1992): The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of $VEGF_{165}$ and PDGF-BB. *Anat Embryol* **186:** 251-257

Wilting J, Christ B, Yuan L, Eichmann A (2003): Cellular and molecular mechanisms of embryonic haemangiogenesis and lymphangiogenesis. *Naturwissenschaften* **90:** 433-448

Wilting Microarray-Daten (2006): https://ukbc-tal15.biochemie.med.uni-goettingen.de/evibank/cgi-bin/exp_browse.cgi?statver=1266?arch=hs_G4112A_1 (Stand: 19.12.2006)

Yamada M, Kim S, Egashira K, Takeya M, Ikeda T, Mimura O, Iwao H (2003): Molecular Mechanism and Role of Endothelial Monocyte Chemoattractant Protein-1 Induction by Vascular Endothelial Growth Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23:** 1996-2001

Yancopoulos GD, Davis S , Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000) : Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Natur* **407:** 242-248

Yoshimura T, Leonard EJ (1990): Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant Protein – 1 on human monocytes. *J Immunol* **145:** 292-297

Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Leonard EJ (1989): Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemgglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J Immunol* **142:** 1956-1962

Zhang H, Issekutz AC (2002): Down-Modulation of Monocyte Transendothelial Migration and Endothelial Adhesion Molecule Expression by Fibroblast Growth Factor. *Am J Pathol* **160/6:** 2219-2230

Zhang XQ, Takakura N, Oike Y, Inada T, Gale NW, Yancopoulus GD, Suda T (2001): Stromal cells expressing ephrin-B2 promote the growth and sprouting of ephrin-B2+ endothelial cells. *Blood* **98:** 1028-1037

Zhang YJ, Rutledge BJ, Rollins BJ (1994): Structure/Activity Analysis of Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) by Mutagenesis. *J Biol Chem* **269/3:** 15918-15924

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Alb.s.	Albumen sacculi
All	Allantois
All.S.	Stalk of Allantois
Am.	Amnion
Am.C.	Amnionhöhle
Ang	Angiopoetin
Art. Nr.	Artikelnummer
bFGF	Basis fibroblast growth factor
Bidest.	zweimalig destilliertes Wasser
Borax	Natriumtetraborat
BSA	Albumine Bovine Fraction
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c.a.	circa
CAM	Chorioallantoismembran
CCL	Chemokin (C-C motif) Ligand
CCR	Chemokine (C-C motif) receptor
cDNA	first strand DNA
Chor.	Chorion
CNS-1	Central Nervous System-1: Gliomzellreihe, die durch N-nitroso-N-methylurea im Zentralen Nervensystem induziert wurde
Co	Company
CO_2	Kohlendioxid
COPE	Cytokines & Cells Encyclopedia
CT	Cycle Threshold
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamino-2-phenylindole
DDSA	Dodecenyl Succinic Anhydride
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuclein acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
dsDNA	doppelstrang Desoxyribonukleinsäure
EBM	Endothelial Cell Basal Medium
Ect.	Ektoderm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ent.	Entoderm
Eph	Ephrin
Epon	Glycidether
et al.	und andere
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
g	Gramm
GAFA	Glutaraldehyd-Formaldehydgemisch
GFAP	Glial fibrillary acidic protein

GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
Hanks BSS	Hanks' Balanced Salt Solutions
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HPA-SMCs	Human pulmonal arterial smooth muscle cells
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IHOP	Information Hyperlinked over Proteins
IL-8	Interleukin-8
Kat. Nr.	Katalognummer
kD	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
KPP	Kalium-Phosphatpuffer
l	Liter
M	molar
MCAF	Monocyte chemotactic and activating factor
MCP	Monocyte chemotactic protein
Mes.	Mesoderm
min	Minute
MIP	Monocyte inflammatory protein
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MNA	Methyl Nadic Anhydride
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Na-Cacodylat	Cacodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OsO_4	Osmiumtetroxid
%	Prozent
PDGF	Platelet-derived growth factor
Pen.	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Pondus Hydrogenii, Maß der Stärke der sauren bzw. basischen Wirkung einer wässrigen Lösung
pmol	Picomol
QH1	Quail Hybridomcells-Endothelial cells surface
RNA	Ribonuclein acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
real-time RT-PCR	real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

SCYA2	Small inducible cytokine A2
sec	Sekunde
SEM/STE	Standardfehler des Mittelwertes
SMA	Smooth muscle actin
SMC	Smooth muscle growth medium
Strep.	Streptomycin
TGFβ-1	Transforming growth factor β-1
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
TrisX	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Trpf.	Tropfen
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	W orld Health Organisation
Y.S.	Yolk Sac, Dottersack
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nerven System
z.T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Hühnerembryo am 9. Tag der Entwicklung. Die Allantois ist mit dem Chorion verschmolzen und die Chorio-Allantois-Membran hat sich bereits ausgebreitet und um den Embryo gelegt. Alb.S. = Albumen sac., All. = Allantois, All.C. = Höhle der Allantois, All. S. = Stalk of Allantois, Am. = Amnion, Am.C. = Amnionhöhle, Chor. = Chorion, Ect. = Ectoderm, Ent. = Entoderm, Mes. = Mesoderm, Y.S. = Dottersack. (aus: Hamilton, 1965, Seite 275) 15
Abb. 2: HUVECs in Zellkultur (10-fache Objektivvergrößerung links, 40-fache Objektivvergrößerung rechts).23
Abb. 3: HPA SMCs in Zellkultur (10-fache Objektivvergrößerung links, 40-fache Objektivvergrößerung rechts). 23
Abb. 4: Schmelzkurven/Fluoreszenzkurven für 4 Amplifikationen mit unterschiedlichen DNA-Mengen mit Anzeige des CT-Werts (aus: Mühlhardt, 2003, Seite 99). 39
Abb. 5: Zellkultur von CNS-1-pcDNA-Kontrollzellen (links) und CNS-1-rMCP-1-Gliomzellen (rechts). 49
Abb. 6: Darstellung der Proliferation der CNS-1-Gliomzellen anhand der Mittelwerte der Extinktionskoeffizienten (n=8) mit SEM über die Proliferationszeit bei einer Zellausgangskonzentration von 1x10³ Zellen pro Well p= 0,61603; Beachte kein Proliferationsunterschied zwischen den CNS-1-rMCP-1-Gliomzellen und CNS-1-pcDNA-Gliomzellen bis 96h Proliferationszeit. 50
Abb. 7: Darstellung der Proliferation der CNS-1-Gliomzellen anhand der Mittelwerte der Extinktionskoeffizienten (n=8) mit SEM über die Proliferationszeit bei einer Zellausgangskonzentration von 5x10³ Zellen pro Well p< 0,001; Beachte die deutlich stärkere Proliferation der CNS-1-pcDNA-Kontrollzellen ab 72h Proliferationszeit. 50
Abb. 8: Darstellung der Proliferation der CNS-1-Gliomzellen anhand der Mittelwerte der Extinktionskoeffizienten (n=8) mit SEM über die Proliferationszeit bei einer Zellausgangskonzentration von $1x10^4$ Zellen pro Well p< 0,001; Beachte den schwächeren Proliferationsunterschied der CNS-1-Gliomzellen bei 72h Proliferationszeit im Vergleich zu Abb.7. 51
Abb. 9: Vergleich des Wachstums von CNS-1-Gliomzellen anhand des mittleren Steigerungsfaktors bezogen auf den ersten Messwert bei 24h und der Ausgangszellkonzentration von 5x10³ Zellen pro Well; Beachte die Steigerung des Wachstums der CNS-1-pcDNA-Gliomzellen um das Doppelte gegenüber den CNS-1-rMCP-1-transfizierten Gliomzellen nach 96h Proliferationszeit. 52
Abb. 10: Beispiel zur Darstellung der Wachstumskurve von CNS-1-Gliomzellen mit Statistica mit Box Plot (Ausgangszellkonzentration 5x10³ Zellen/Well; n=8). Beachte vergleichende Darstellung mit Excel in Abb.7. 53
Abb. 11: CNS-1-Gliome auf der CAM von *Gallus gallus domesticus* an Tag 13 (mit Glutaraldehyd fixiert), Vergrößerung 0,8 x, Balken = 5mm; A, B und C) CNS-1-pcDNA-Kontrolltumoren; D, E und F) CNS-1-rMCP-1-transfizierte Gliome; Pfeile = Einblutungen; Beachte das deutlich stärkere Wachstum der rMCP-1-Gliome. 54
Abb. 12: CNS-1-rMCP-1-Tumor auf CAM von *Gallus gallus domesticus* an Tag 13 (mit Glutaraldehyd fixiert), A) Übersicht, Balken = 5mm, B) Vergrößerung, Balken = 1mm; Beachte das Gefäßsystem im Tumor bestehend aus Kapillaren und Venolen. 55
Abb. 13: Vergleich des mittleren Tumorvolumens (CNS-1 pcDNA n=4; rMCP-1 n=6) mit SEM, p = 0,031.... 56
Abb. 14: Makroskopische Präparate der CAM mit Thermanoxscheibe als Substanzträger, aufgebracht an Tag 13 mit Aqua dest. (Negativkontrolle); Aufnahme von Präparat nach 3 Tagen mit Trägerauflage (mit Glutaraldehyd fixiert), A) Hellfeldaufnahme, B) Dunkelfeld, Balken = 2 mm; Beachte, dass keine Reaktion der CAM auf die 3 Tage aufliegende Trägerscheibe mit Aqua dest. (Negativkontrolle) stattgefunden hat. 57
Abb. 15: Makroskopische Präparate der CAM mit Thermanoxscheibe als Substanzträger, aufgebracht an Tag 13 als Positivkontrolle mit VEGF-A_{165}; Aufnahme des Präparates nach 3 Tagen Trägerauflage (mit Glutaraldehyd fixiert), A) Hellfeldaufnahme, B) Dunkelfeld, Balken = 2mm; Beachte die starke Kapillarisierung der CAM im Applikationsbereich von VEGF-A_{165} (Positivkontrolle). 57
Abb. 16: Makroskopische Präparate der CAM mit Thermanoxscheibe als Substanzträger, aufgebracht an Tag 13 mit VEGF-A (linke Scheibe) und MCP-1 (rechte Scheibe), Aufnahme nach 3 Tagen Trägerauflage (mit Glutaraldehyd fixiert), A) Hellfeldaufnahme, B) Dunkelfeld, Balken = 5 mm; Beachte die Vaskularisierung unter VEGF-A (links im Bild, in A) und B)) und fehlende Reaktion (Hellfeld) bzw. weißliche Eintrübung (Dunkelfeld) unter MCP-1 (rechts im Bild). 58
Abb. 17: Makroskopische Präparate der CAM mit Thermanoxscheibe als Substanzträger aufgebracht an Tag 13 mit MCP-1; Aufnahme nach 3 Tagen Trägerauflage (mit Glutaraldehyd fixiert); Vergrößerung aus Abb.16 A) Hellfeldaufnahme, B) Dunkelfeld, Pfeil = weißliche Eintrübung, Balken = 2,5mm; Beachte in dieser

Vergrößerung die Reaktionen der CAM auf MCP-1: Im Hellfeld ist keine Reaktion sichtbar, während im Dunkelfeld weißliche Eintrübungen zu sehen sind. 58
Abb. 18: Paraffinschnitte von CNS-1-Tumoren auf der CAM, HE-Färbung, A-C) CNS-1-pcDNA-Kontrolltumoren, D-F) CNS-1-rMCP-1-Tumoren; A) Übersicht, oben Chorion, unten Alantois, Vh = Verhornung des Chorionepithels an der Auflagestelle des Trägers, Ch = abgesunkenes Chorionepithel, Pfeil = Tumorgewebe; B) Vergrößerung mit 40-facher Objektivgröße aus A; C) Vergrößerung mit 100-facher Objektivgröße aus A, Pfeil = Mitosefigur von Gliomzellen; D) Übersicht, Bl = Einblutung, Pfeil = Tumorgewebe; E) Vergrößerung mit 40-facher Vergrößerung aus D, Pfeile = Gefäße mit Vogelerythrozyten (Zellkern sichtbar); F) Vergrößerung mit 100-facher Objektivvergrößerung, Kp = Kapillaren mit Erythrozyten, Pfeile = Mitosefiguren von Gliomzellen; Beachte die gut von der CAM abgrenzbaren Kontrolltumoren (links) mit eng beieinander liegenden Gliomzellen und die schlecht abgrenzbaren MCP-1-produzierenden Gliome (rechts) mit vielen Kapillaren. In beiden Tumoren sind viele Mitosefiguren zu sehen. 60
Abb.19: Paraffinschnitte: CNS-1-Tumoren mit Peroxidase-Färbung des anti-α-SMA-Antikörpers und Kernechtrot-Gegenfärbung Übersichten: 61
Abb. 20: Paraffinschnitte von CNS-1 Gliomen nach Peroxidase-Färbung mit anti-α-SMA-Antikörpern und Kernechtrot-Gegenfärbung, A-B) CNS-1 pcDNA Kontrolltumor, A) Übersicht, Tu = Tumor, B) 40-fache Objektivvergrößerung aus A zeigt eine periphere Arterie, Al = Allantois, Pfeil = glatte Muskelzellen der Media; C-D) CNS-1 rMCP-1 transfizierter Tumor, C) Übersicht, Tu = Tumor, Pfeil = viele Myofibroblasten, D) 40-fache Objektivvergrößerung einer peripheren Arterie, Pfeile = Tumorzellen an und in der Media; Beachte die unruhige Struktur der dem Tumor zugewandten Seite der Media als Hinweis auf Migration der glatten Muskelzellen bei Kontrolltumoren und rMCP-1-transfizierten Gliomen. Zusätzlich ist bei rMCP-1-transfizierten Gliomen eine Einwanderung von Tumorzellen in die Media zu beobachten. 62
Abb. 21: Quantitativer Vergleich der anti-α-SMA-Fluoreszenz von CNS-1-Gliomen (Paraffinschnitte): Prozentualer Anteil des Fluoreszenzvolumens am untersuchten Gesamtvolumen des Tumors. Das Fluoreszenzvolumen war in den MCP-1-transfizierten Gliomen signifikant höher als in den Kontrolltumoren (p=0,013). 63
Abb. 22: CNS-1-pcDNA-Kontrolltumor, Immunfluoreszenz Färbung: QH1 - Antikörper = rot, anti-α-SMA-Antikörper = grün; A) Übersicht des Kombinationsbildes in 10-facher Objektivvergrößerung; B und C) Vergrößerungen der Einzelfärbungen mit 20-facher Objektivvergrößerung, D) Kombinationsbild (von B und C) als Ausschnitt von A); Größere Gefäße sind in den Kontrolltumoren nur in der Tumorperipherie zu finden. 66
Abb. 23: CNS-1-pcDNA-Kontrolltumor, Immunfluoreszenz Färbung: QH1-Antikörper = rot, anti-α-SMA-Antikörper = grün; A) Übersicht des Kombinationsbildes in 20-facher Objektivvergrößerung; B und C) Vergrößerung der Einzelfärbungen mit 40-facher Objektivvergrößerung, D) Kombinationsbild (von B und C) als Ausschnitt von A); Färbung vieler Zellen mit QH-1 zeigte die Einwanderung von Wachtelleukozyten in die Kontrolltumoren. Färbung mit anti-α-SMA-Antikörper zeigt das Vorkommen von Myofibroblasten im Kontrolltumor an. In der CAM war eine Schichtung der großen Gefäße in Endothel (QH1 – rot) und Media (anti-α-SMA – grün) erkennbar. 67
Abb. 24: Paraffinschnitt von CNS-1-rMCP1-transfizierten Gliomen; Immunfluoreszenzfärbung: QH1-Antikörper = rot, anti-α-SMA-Antikörper = grün, DAPI = blau, A) Übersicht des Kombinationsbildes aus B und C mit 20-facher Objektivvergrößerung; B & C) Einzelfärbungen bei 20-facher Objektivvergrößerung, D) Kombinationsbildes mit zusätzlicher DAPI-Färbung in 40-facher Objektivvergrößerung; Im Vergleich mit den Kontrolltumoren sieht man bei den rMCP-1-transfizierten Gliomen eine höhere Anzahl der durch QH1- und anti-α-SMA-Antikörper gefärbten Zellen. Ebenfalls sind mehr Gefäße mit einer Media zu sehen. Die DAPI-Färbung in D zeigt mehr Vogelerythrozyten in den Gefäßen. 68
Abb. 25: Vergleich von CNS-1-Gliomen; Immunfluoreszenzfärbung: QH1-Antikörper = rot; anti-α-SMA-Antikörper = grün; Kombinationsbilder in 20-facher Objektivvergrößerung A) CNS-1-pcDNA-Kontrolltumor (siehe Abb. 22 D); B) CNS-1-rMCP-1-transfiziertes Gliom (siehe Abb. 24 A). Beachte die größere Anzahl an Glattmuskelaktin-positiven Leitungsbahnen in rMCP-1 Gliomen. 68
Abb. 26: Paraffinschnitt von CNS-1-rMCP1-transfizierten Gliomen in 40-facher Objektivvergrößerung; Immunfluoreszenz Färbung: QH1-Antikörper = rot, anti-α-SMA-Antikörper = grün, DAPI = blau; A-C) Einzelfärbungen, D) Kombinationsbild; Im Kombinationsbild kann man die Schichtung der Gefäßwände gut erkennen. Die QH1-positiven Rundzellen sind Leukozyten. 69
Abb. 27: Paraffinschnitt von CNS-1-Tumorgewebe aus dem Wachtel-CAM-Assay: CNS-1-rMCP1-transfizierter Tumor; Immunfluoreszenz Färbung: QH1-Antikörper = rot, DAPI = blau; A) Kombinationsbild in 40-facher Objektivvergrößerung, B) Kombinationsbild in 100-facher Objektivvergrößerung. In der hohen

Vergrößerung von rMCP-1-transfizierten Gliomen zeigt sich, dass die QH1-gefärbten Rundzellen einen Zellkern besitzen. 69
Abb. 28: CNS-1-rMCP1-transfizierter Tumor. Immunfluoreszenz: GFAP-Antikörper = rot, a-SMA-Antikörper = grün, 40-fache Objektivvergrößerung, Pfeil = unechte Rosette 70
Abb. 29: Gewebeschnitte der CAM nach 3 Tagen MCP-1-Stimulation, Pfeile = Leukozyten; A & B Immunfluoreszenz-Färbung: A) QH1-Antikörper in 40-facher Objektivvergrößerung, B) Kombinationsbild (QH1, DAPI) in 100-facher Objektivvergrößerung; C & D) Semidünnschnitte mit Methylenblaufärbung in 40-facher Objektivvergrößerung. Sowohl die Immunfluoreszenz, als auch histologische Färbungen mit Methylenblau zeigten Leukozyteneinwanderungen in die Wachtel-CAM nach MCP-1-Stimulation, jedoch ergab sich kein deutlicher Unterschied zu den Positiv- (VEGF-A) und Negativkontrollen. 71
Abb. 30: Exemplarische Darstellung der Proliferation von HUVECs unter MCP-1-Stimulation durch graphische Darstellung der Mittelwerte der gemessenen Extinktionskoeffizienten mit SEM über 72h; p = 0,833. Beachte, dass kein Unterschied in der Proliferation der HUVECs durch MCP-1-Stimulation mit 50ng/ml über 72h zu beobachten ist. 73
Abb. 31: Exemplarische Darstellung der Proliferation von HPA-SMCs unter MCP-1-Stimulation durch graphische Darstellung der Mittelwerte der gemessenen Extinktionskoeffizienten über 96h. Beachte die statistisch signifikante aber geringe Steigerung der Proliferation von HPA-SMCs ab einer Konzentration von 50ng/ml MCP-1; p < 0,001. 74
Abb. 32: 1%iges Agarosegel mit circa 0,5 mg RNA pro Template. Isolierte RNA-Proben von: (1 + 2) 2x Positivkontrolle von Monozyten, (3) HUVECs, (4) HPA-SMCs, (5) CNS-1 pcDNA, (6) CNS-1 rMCP-1. Man sieht die typischen Banden für 18s und 28s rRNA. Somit hat kein Abbau durch RNase stattgefunden. 75
Abb. 33: Relative Expression von Rezeptoren-cDNA humaner Zellen: Leukozyten, Monozyten, HUVECs und HPA-SMCs. Im Vergleich zu den Monozyten und Leukozyten fand sich praktisch keine Expression von CCR1 und CCR2 in den HUVECs und HPA-SMCs. 76
Abb. 34: Relative Expression von Rezeptoren-cDNA im Vergleich von HUVECs und HPA-SMCs. Man sieht, dass beide Zelllinien CCR2 in etwa gleichen Mengen exprimieren. HUVECs scheinen jedoch im Vergleich zu HPA-SMCs kaum CCR1 zu exprimieren. 77
Abb. 35: Real-time RT-PCR- Ergebnis von unstimulierten, 1x und 2x mit 50ng/ml MCP-1-stimulierten HUVECs: Dargestellt wurde die relative Expression der MCP-1-Rezeptoren CCR1 & CCR2 in den HUVECs als Potenz des negativen ΔΔ-CT-Wertes von 2 (Abschnitt 2.11 - Formeln). Beachte den Anstieg der Expression von CCR2 unter MCP-1-Stimulation. 78
Abb. 36: Real-time RT-PCR- Ergebnis von unstimulierten, 1x und 2x mit 50ng/ml MCP-1-stimulierten HPA-SMCs: Dargestellt wurde die relative Expression der MCP-1-Rezeptoren CCR1 & CCR2 als Potenz des negativen ΔΔ-CT-Wertes von 2 (Abschnitt 2.11). Beachte den Anstieg der Expression von CCR2 unter MCP-1-Stimulation. 78
Abb. 37: Relative Expression von Rezeptoren-mRNA in Ratten-Monozyten und CNS-1-Gliomzellen (mit und ohne MCP-1-Produktion); Es ist praktisch keine Expression von mRNA der MCP-1-Rezeptoren CCR2 & CCR4 in den CNS-1-Gliomzellen im Vergleich mit Monozyten nachweisbar. 79
Abb. 38: Vergleich der relativen Expression von MCP-1-Rezeptoren-mRNA bei Ratten-CNS-1-Gliomzellen mit und ohne MCP-1-Produktion. Die MCP-1-produzierenden (rMCP-1) CNS-1-Gliomzellen produzieren wesentlich weniger mRNA der MCP-1 Rezeptoren CCR2 und CCR4 als die Kontrollzellen. 80

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wilting für die Überlassung des Themas der Dissertation sowie für die immer freundliche Unterstützung und Betreuung bei der Erarbeitung dieses Themas. Ich danke Ihm für die Möglichkeit zur selbstständigen wissenschaftlichen Arbeit und für die vielen gemeinsamen Diskussionen.

Besonderen Dank schulde ich Dr. rer. nat. Kerstin Butler und Dr. rer. nat. Jürgen Becker für die Einführung in die wissentschaftlichen Arbeitstechnicken, alle wertvollen Auskünfte und professionellen Kritiken, die zur Entstehung dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Weiterhin danke ich Melanie Böning und Monica Hoch für die zuvorkommende Unterstützung im Labor.

Des Weiteren gilt mein Dank für die statistische Beratung und Hilfe bei der statistischen Auswertung den Mitarbeitern der Abteilung Medizinische Statistik der Universität Göttingen. Insbesondere möchte ich mich hier bei Antonia Zapf, Frank Konietschke und Tobias Lohse sowie dem Institusleiter Prof. Dr. Brunner bedanken.

Auch bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich an dieser Stelle ganz besonders für die unzähligen Korrekturarbeiten bedanken.

Viele Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, sind ungenannt geblieben. Auch Ihnen sei an dieser Stelle Dank gesagt. Ich freue mich sehr, dass mich eine so große Anzahl an Menschen unterstützt und ermutigt hat.

Lebenslauf

Ich, Franziska Sattler wurde am 01.09.1980 in Wernigerode als Tochter der Eheleute Joachim und Adelheid Sattler, geb. Bäthge, geboren.

Ich wuchs in Wernigerode auf und besuchte dort die August-Hermann-Francke-Grundschule von 1987 bis 1991. Ab 1991 besuchte ich das Gerhart-Hauptmann-Gymnasium. Im Jahre 1996 - 1997 entschied ich mich für ein Auslandsjahr in Australien. Dort verbrachte ich ein Jahr unter der Obhut des Rotary Clubs von Cooroy und besuchte für dieses Jahr die lokale Schule. Nach meiner Rückkehr nach Deutschland setzte ich meine Schulzeit an meiner alten Schule fort und schloss das Gymnasium im Sommer 2000 erfolgreich ab.

Im Wintersemester 2000 begann ich das Studium der Rechtswissenschaften an der Universität Göttingen. Im Wintersemester 2001 wechselte ich das Studienhauptfach und studierte fortan Humanmedizin an der Universität Göttingen Die Ärztliche Vorprüfung absolvierte ich im September 2003. Die Ärztliche Prüfung legte ich im Dezember 2008 erfolgreich mit der Note 1,5 ab. Meine Approbation als Ärztin erhielt ich am 02.01.2009.
Während meines Studiums begann ich unter Prof. Dr. J. Wilting in der Abteilung für Anatomie und Zellbiologie der Universität Göttingen meine medizinische Doktorarbeit, die ich im Februar 2010 beendete.

Seit Juni 2009 bin ich als Assistenzärztin in der Inneren Abteilung des Klinikums Dorothea Christiane Erxleben Quedlinburg beschäftigt.