

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der
Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Molekulare Charakterisierung der Effekte des transformierenden
Wachstumsfaktors TGF β -1 auf die Expression des vaskulären
endothelialen Wachstumsfaktors VEGF im humanen cholangiozellulären
Karzinom**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -

Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Benckert

aus Kiel

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. S. Jonas
2. Prof. Dr. med. F. von Weizäcker
3. Prof. Dr. med. C. A. Redaelli

Datum der Promotion: 17.03.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Das humane cholangiozelluläre Karzinom (CCC)	6
1.2	Angiogenese und “angiogenic switch“	6
1.3	Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF)	7
1.4	Transforming growth factor β -1 (TGF β -1)	8
1.5	Zielsetzung	9
2	Materialien	10
2.1	Humane Gewebeproben	10
2.2	Zelllinien	10
2.3	Antikörper	10
2.4	DNA Konstrukte und Reportergenplasmide	11
2.5	Plasmide und Herstellung der RNA-Sonden	12
2.6	Chemikalien und Materialien	13
3	Methoden	14
3.1	Immunhistochemie	14
3.2	in-situ Hybridisierung	15
3.3	Zellkulturen	16
3.4	ELISA	16
3.5	Polymerasekettenreaktion	17
3.5.1	PCR der VEGF Splice-Varianten	17
3.5.2	Quantitative kompetitive RT-PCR	17
3.6	Transiente Transfektionen	20
3.7	EMSA (electrophoretic mobility shift assay)	20
3.8	Statistische Auswertung	21
4	Ergebnisse	22
4.1	Expression von VEGF und seinen Rezeptoren im humanen CCC	22
4.2	Expression von TGF β -1 und seinen Rezeptoren im CCC	24
4.3	TGF β -1 stimuliert VEGF in humanen CCC Zelllinien	26
4.4	Molekulare Mechanismen der TGF β -1 induzierten VEGF Expression	30

4.5	TGFβ-1 responsive Elemente im VEGF Promotor	33
4.6	Sp1 Bindungssequenzen im VEGF Promotor sind essentiell für TGFβ-1 Responsivität	35
4.7	Sp1 und Sp3 binden im Bereich der -85 bis -50 Region des VEGF Promotors	37
4.8	TGFβ-1 stimuliert Sp1 abhängig die Transaktivierung des VEGF Promotors	42
5	Diskussion	44
6	Zusammenfassung	49
7	Abbildungsverzeichnis	50
8	Literaturverzeichnis	52
9	Danksagung	59
10	Lebenslauf	60
11	Publikationsverzeichnis	61
12	Eidesstattliche Erklärung	62

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

APAAP	Alkalische Phosphatase/Anti-alkalische Phosphatase-Komplex
bp	Basenpaare
CCC	Humanes cholangiozelluläres Karzinom
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium (Zellmedium)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor, epithelialer Wachstumsfaktor
Egr	Early growth response, Transskriptionsfaktor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
FGF	Fibroblast growth factor, Fibroblastenwachstumsfaktor
FKS	Fetales Kalbserum
flk-1	Fetal liver kinase 1
flt	Fms liketyrosine kinase
HGF	Hepatocyte growth factor, Hepatozytenwachstumsfaktor
MVD	Mikrovaskuläre Gefäßdichte
PBS	Phosphate buffered saline, Standard Phosphatpuffer
PDGF	Platelet derived growth factor
PF-4	Platelet factor 4
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellmedium)
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion
Smad	Similar-mothers against decapentaplegic, Transkriptionsfaktor,
Sp	Transkriptionsfaktor, zuerst isoliert in Sephacryl und Phosphocellulose Säulen
TGF α/β	Transforming growth factor α/β , transformierender Wachstumsfaktor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TSP-1	Thrombospondin-1
T β RI/II	Transforming growth factor receptor type I/II
VEGF	Vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor