

## 2 Materialien

### 2.1 Humane Gewebeproben

Die Gewebeproben intrahepatischer humaner CCCs stammen von 19 Patienten, die sich einer kurativen Leberteilresektion im Virchow Klinikum Berlin unterzogen. 15 Proben wiesen normales Lebergewebe an den Resektionrändern auf, welches als Kontrolle diente. Die Patienten hatten vor der Operation weder eine chemo-, noch eine strahlentherapeutische Behandlung erhalten.

### 2.2 Zelllinien

Name	Beschreibung	Herkunft	Kulturmedium
TFK-1	humane cholangiozelluläre Karzinomzelllinie	DSMZ GmbH, Braunschweig	DMEM+10% FKS
EGI-1	humane cholangiozelluläre Karzinomzelllinie	DSMZ GmbH, Braunschweig	RPMI+10% FKS

**Tabelle 1: Zelllinien**

### 2.3 Antikörper

Zur Endothelzellfärbung wurde ein monospezifischer (Maus Anti-Mensch) Antikörper, anti-CD31 Antikörper (Dianova, Hamburg), verwendet.

Folgende polyklonale Antikörper (Kaninchen Anti-Mensch) wurden zum immunhistochemischen Nachweis von VEGF, TGF $\beta$ -1 und der jeweiligen Rezeptoren verwendet: anti-VEGF-Antikörper, anti-VEGFR-1-Antikörper, anti-VEGFR-2-Antikörper, anti-TGF $\beta$ -1-Antikörper, anti-T $\beta$ RI- und anti-T $\beta$ RII-Antikörper (alle Santa Cruz, Kalifornien).

Folgende polyklonale Antikörper wurden für Transkriptionsfaktorbindungsstudien mittels EMSA verwendet: anti-Sp-1-Antikörper, anti-Sp-3-Antikörper, anti-AP-2-Antikörper und anti-EGR-1-Antikörper (alle SantaCruz, Kalifornien). Folgender polyklonaler, panspezifischer Antikörper wurde für die TGF $\beta$ -1 Immunneutralisationsexperimente verwendet: anti-TGF $\beta$ -1-Antikörper (R&D Systems, Minneapolis).

### 3.2 *in-situ* Hybridisierung

25 µl eines Hybridisierungsgemisches, das  $2 \times 10^5$  cpm /µl der  $^{35}\text{S}$ -markierten Sonde in einer Lösung aus 50 % Formamid, 12,5 % Dextransulfat, 10 mM Dithiothreitol, 10mM Tris HCl (pH 7,5), 10 mM  $\text{NaPO}_4$ , 0,3 M NaCl, 5mM EDTA pH 7,5, 0,002 % Ficoll 400, 0,002 % Polyvinylpyrrolidon, 0,002 % Rinderalbumin, 0,2 % w/v Hefe-tRNA enthielt, wurden auf den Gewebeschnitt aufgetragen und nach Abdeckung mit silikonisierten Deckgläschen 16 bis 18 Stunden in einer feuchten Kammer bei 50 °C hybridisiert. Es folgte ein Waschprozeß über 5 Stunden bei 52°C, zur Entfernung von Deckgläsern, Dextransulfat, tRNA und überschüssiger RNA Transkripte. Die Waschlösung wurde nach 1 Stunde gewechselt. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden die Objektträger mit 0,02 mg/ml RNase A in 10 mmol Tris HCl, 1mM EDTA, 0,5 M NaCl, pH 7,5 bei 37°C 30 Minuten gewaschen, gefolgt von einem weiteren Waschschritt bei gleicher Temperatur mit der gleichen Pufferlösung. Danach wurden die Schnitte jeweils 20 Minuten in  $2\times\text{SSC}$  und  $0,1\times\text{SSC}$  gewaschen. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte 2 Stunden luftgetrocknet. Die dehydrierten, luftgetrockneten Schnitte wurden in eine 1:1 mit Aqua dest. verdünnte, auf 42°C erwärmte, Amersham IL-5 Autoradiographielösung eingetaucht. Nach 30 Minuten Lufttrocknung wurden sie bis zur Entwicklung in mit Calciumcarbonat trockengehaltenen Kartellboxen gelagert. Die autoradiographierten Objektträger wurden bei Zimmertemperatur in Küvetten mit Kodak D 19 Entwicklerlösung 3 Minuten, 1%-iger Essigsäure 30 s und mit dem Kodakfixierbad für weitere 3 Minuten entwickelt. Danach wurden die Schnitte ausgiebig mit Leitungswasser gespült, ca. 1 Minute in Mayer-Hämalaun gegengefärbt und mit 50°C warmer Kaisers-Glycerin-Gelatine eingebettet. Zur Auswertung wurden die Körner pro Zellen gleichen Typs in jeweils 5 Gesichtsfeldern von  $0,625 \text{ mm}^2$  Größe ausgezählt. Als spezifisches positives Signal wurde definiert, wenn das Signal der Antisense-Probe über dem der Sense-Probe lag. Es wurden immer drei voneinander unabhängige Versuchsreihen durchgeführt.

### 3.3 Zellkulturen

Die humanen cholangiozellulären Zelllinien TFK-1 und EGI-1 wurden als subkonfluente Monolayerkulturen in ihren jeweiligen Kulturmedien (RPMI 1640 oder DMEM), versetzt mit 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, in Zellkulturflaschen oder Petrischalen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Mittels Trypanblaufärbung wurde eine Zellvitalität von 95% sichergestellt, bevor die Zellen für Experimente verwendet wurden. Die Experimente wurden in der logarithmischen Phase der Zellproliferation durchgeführt, in der Regel 24 Stunden nach Adhärenzzeit.

### 3.4 ELISA

Für die Bestimmung der VEGF Expression in den CCC Zelllinien wurden  $5 \times 10^4$  Zellen in 12-Loch-Platten über Nacht kultiviert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in serumfreies UltraCulture-Medium umgesetzt und für 24, 48, 72 und 96 Stunden mit 10 ng/ml TGFβ-1 inkubiert. Die so konditionierten Überstände wurden dann gesammelt, abzentrifugiert und bei -20°C bis zur Messung aufbewahrt. Die Zellen wurden in einem Lysepuffer (2 mM EDTA, 20 mM Tris, 150 mM NaCl<sub>2</sub>, 50 mM β-Glycerolphosphat, 0,5 NP40 1%, 1% Glycerin, 1 mM Natrium Orthovanate, 1mM DTT, 5 µg/ml Aprotinin, 10 mM Natriumfluorid, 2 µM Leupeptin, 2 mM Phenylmethylsulfonamid) aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 15000 g für 15 Minuten wurde die Proteinkonzentration kolorimetrisch mit Hilfe des Bradford-Protein-Assays bestimmt. Die Bestimmung der VEGF-Konzentration in Zellkulturüberständen und Zellysaten erfolgte mittels eines VEGF-spezifischen ELISA der Firma R&D Systems (Quantikine™), entsprechend den Angaben des Herstellers. Die VEGF Konzentration wurde anschließend auf den gesamten Proteingehalt normalisiert.

Für die Bestimmung der TGFβ-1 Expression wurde entsprechend der Verfahrensweise der VEGF Bestimmung mittels eines kommerziellen TGFβ-1 ELISA der Firma R&D Systems (Quantikine™) verfahren.

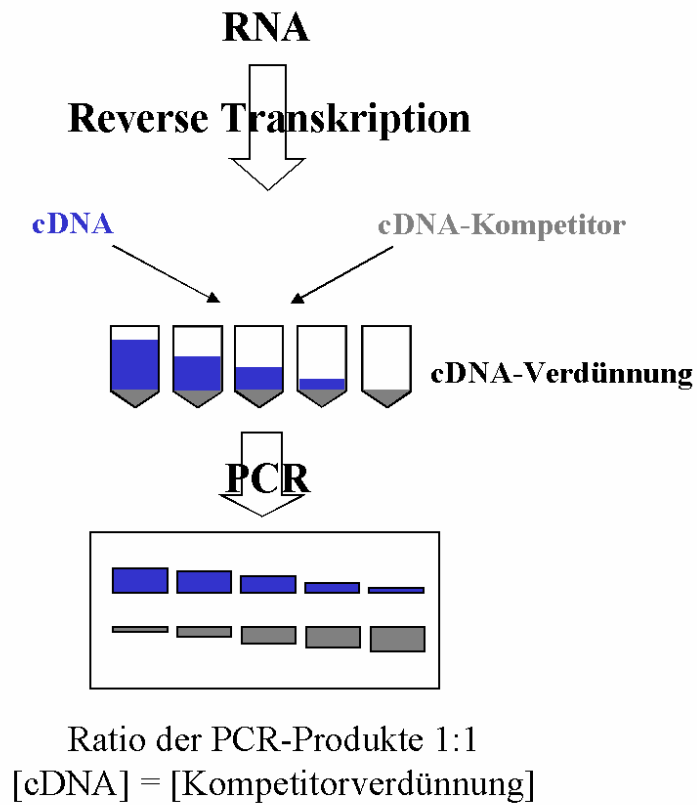
### 3.5 Polymerasekettenreaktion

#### 3.5.1 PCR der VEGF Splice-Varianten

Die RNA der beiden Zelllinien TFK-1 und EGI-1 wurde durch das kommerziell erhältliche RNAzol<sup>TM</sup>B Kit (Wak-Chemie Medical, Bad Soden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die reverse Transkription der isolierten RNA wurde in folgendem Ansatz durchgeführt: 2 µg totale RNA, 25 ng Oligo(dt)Primer, 1mM DTT, 6mM Mg<sup>2+</sup>, 500 µM der jeweiligen Desoxyribonukleinsäuren, 20 IE RNAsin und 5 IE muriner Leukämievirus reverser Transkriptase. Das jeweilige RT Produkt wurde dann durch PCR amplifiziert. Die VEGF Sense- (5'-CGAAGTGGTGAAGTTCATGGATG-3') und Antisense- (5'-TTCTGTATCAGTCTTTCCTGGT-3') VEGF-Primer wurden entsprechend bereits publizierter Sequenzen verwendet<sup>61</sup>. Diese Primer erkennen alle VEGF-Splice Varianten. cDNA's wurden mittels 1 IE *Taq*-DNA-Polymerase in folgendem Reaktionsansatz von 20µl amplifiziert: 10mM TrisHCL, 50mMKCL, 1,5mMMgCl<sub>2</sub>, 200 µM der jeweiligen Desoxyribonukleinsäuren und 40 pM des jeweiligen Primers (Reaktionsbedingungen: 40 Zyklen, Denaturierung bei 94°C für 1 Minute, Annealing bei 60°C für 1 Minute, Transkription bei 72°C für 1 Minute und zuletzt nochmalige Transkription bei 72°C für 10 Minuten). Jedes PCR Produkt (5µl ) wurde auf einem 1%-igem Agarosegel laufen gelassen und mit Ethidiumbromid visualisiert.

#### 3.5.2 Quantitative kompetitive RT-PCR

Um die Effekte von TGFβ-1 auf die VEGF-mRNA-Expression quantifizieren zu können, und somit zwischen transkriptioneller und posttranskriptioneller Induktion der VEGF Expression zu differenzieren, wurde mittels quantitativer-kompetitiver PCR die VEGF-mRNA-Expression zeit- und dosisabhängig nach Stimulation mit TGFβ-1 gemessen. Das Prinzip der quantitativen-kompetitiven RT-PCR beruht auf Ko-Amplifikation einer definierten Menge eines artifiziell hergestellten cDNA-Konstruktes (des sogenannten Kompetitors) mit seriellen Verdünnungen der zu untersuchenden cDNAs mittels eines spezifischen Primerpaares. Unter der Voraussetzung der identischen Amplifikationseffizienz der genspezifischen "wild-type" cDNA-Sequenz und des artifiziellen Kompetitor-konstruktes lässt sich durch densitometrischen Vergleich der beiden PCR-Produkte die Anzahl der genspezifischen Transkripte in dem ursprünglichen cDNA-Gemisch berechnen.



**Schema 1: quantitative-kompetitive RT-PCR**

Um eine möglichst gleiche Amplifikationseffizienz zu erreichen, wurden für die Amplifikation von VEGF<sub>165</sub> sowie des Kompetitor-Konstruktes jeweils gleiche Primerbindungsstellen verwendet und diese so ausgesucht, dass "wild-type"- sowie Kompetitor-Amplifikat in ihrer Länge maximal 20% Unterschied zeigen: Hierfür kamen folgende Primerpaare zur Anwendung:

	Primer (5'→3')	Lokalisation
β-Aktin	sense: TTCCTGGGCATGGAGTCCTGTGG	837 bis 859
	antisense: CGCCTAGAAGCATTGCGGTGG	1151 bis 1172
	mimic: TACCCTGGCATTGCCGACAGG	957 bis 977
VEGF <sub>165</sub>	sense: GCAAGACAAGAAAATCCCTGTGG	465 bis 488
	antisense: TTCTGTCGATGGTGTGGTGTGG	735 bis 757
	mimic: ATCCGCAGACGTGTAAATGTTCC	525 bis 548

**Tabelle 5: Primersequenzen für die quantitative kompetitive RT-PCR**

Die optimale Konzentration des Kompetitor-Konstruktes wurde experimentell in Vorversuchen festgelegt. Für das PCR-Produkt wurde das Primerpaar so gewählt, dass das PCR-Produkt mindestens eine Intron-Exon-Grenze überspannte, damit das Amplifikat der gewünschten Größe nur aus der in cDNA revers transkribierten mRNA, nicht aber aus genomischer DNA amplifiziert werden konnte. Bei der Verwendung eines cDNA-Kompetitors kann mittels kompetitiver PCR nur eine relative Bestimmung der mRNA-Expression im Verhältnis zu einem "house-keeping"-Gen erfolgen. Daher wurde zur Bestimmung der Menge der VEGF<sub>165</sub>-mRNA das β-Aktin-Gen als "house-keeping"-Gen parallel analysiert. Als Maß für die mRNA-Expression wurde schließlich das Verhältnis der VEGF spezifischen zu den β-Aktin spezifischen mRNA Transkripten angegeben. Nach reverser Transkription von 2 µg Gesamt-RNA aus den untersuchten Zellen wurden für die quantitative-kompetitive RT-PCR fünf serielle 1:3 Verdünnungen von den jeweiligen cDNAs und experimentell festgesetzte Mengen des jeweiligen Kompetitors mit dem ausgesuchten genspezifischen Primerpaar koamplifiziert. Die PCR-Reaktionen erfolgte für 30 Zyklen bei folgenden Amplifikationskonditionen: Denaturierung für 40 Sekunden bei 94°C, annealing für 60 Sekunden bei 63°C, Extension für 60 Sekunden bei 72°C und schließlich eine 7-minütige Extension bei 72°C. Je 15 µl pro PCR-Ansatz wurden in einem 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Hilfe von Ethidiumbromid visualisiert und densitometrisch ausgewertet. Bei einem densitometrischen Verhältnis von 1:1 der beiden Ko-Amplifikate ist die genspezifische cDNA-Konzentration gleich der zugesetzten Kompetitormenge. Mittels der so etablierten quantitativen-kompetitiven RT-PCR ließ sich nun in den cholangiozellulären Zelllinien die Zeit- und Dosisabhängigkeit der TGFβ-1 vermittelten Induktion auf die VEGF-mRNA-Expression untersuchen.

### 3.6 Transiente Transfektionen

24 Stunden vor Transfektion wurden jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät. Anschließend wurden mit dem Effectene Transfection Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers, je 2  $\mu\text{g}$  des jeweiligen VEGF-Deletionskonstruktes (siehe Kapitel Materialien) und 100 ng eines Renilla-Luziferase Plasmids kotransfiziert. Nach 24-stündiger Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 24 Stunden mit UltraCulture-Medium zur Regenerierung kultiviert. Danach folgte eine 24-stündige Inkubation mit TGF $\beta$ -1 und anschließend die Bestimmung der Luziferase Aktivität unter Verwendung des Luziferase Assay Systems der Firma Promega. Die Luziferase-Aktivität wurde durch Starten der Reaktion mit 100  $\mu\text{l}$  Luziferase-Assay-Substrat und Messung der Lumineszenz für 15 Sekunden mit Hilfe eines Luminometers (EG & G Berthold) quantifiziert. Dies diente der Normalisierung der Transfektionseffizienz. Die relative Luziferase-Aktivität errechnet sich aus dem Quotienten Reporter-gen-Luc-Aktivität/ Renilla-Luc-Aktivität (RLU).

### 3.7 EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

Diese Methode ermöglicht das Auffinden und die Quantifizierung DNA-bindender Moleküle mittels Bindung an eine radioaktiv markierte Sonde, da Protein-DNA-Komplexe im elektrischen Feld langsamer als reine DNA wandern. Zur Bestimmung der DNA Bindungsaktivität wurden nukleäre Proteinextrakte mit VEGF Oligonukleotiden, die die potentiellen Transkriptionsfaktorbindungssequenzen repräsentieren (hVEGF -88/-50), inkubiert. Folgende Oligonukleotide wurden mit [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig, Germany) durch eine T4 Polynukleotid Kinase Reaktion endständig markiert (5' ---> 3'): Sp1 consensus, attcgatcggggcggggc gagc; Sp1 mutant, attcgatcgggttcggggcgagc; AP2 consensus, gatcgaactgaccgcccg cggcccg; AP2 mutant, gatcgaactgaccgcttcggggc gt; Egr-1 consensus, ggatccagc gggggcgagcggggcgca; Egr-1 mutant, ggatccagctag ggcgagcggggcgca. Die DNA Bindungsreaktion mit den Kernextrakten wurde durchgeführt, indem 3  $\mu\text{g}$  Kernprotein mit 0,4 ng radioaktiv markierten Oligonukleotidproben und BSA, 60 mM KCl, 5 mM DTT, 1 mM ZnCl $_2$  und 10% Glycerol über 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Für die Konkurrenzexperimente wurden nicht markierte Oligonukleotide gleicher oder mutierter Sequenz (100-facher molarer Überschuss) 30 Minuten vor Zugabe der Probe zu der Reaktion hinzugefügt. Die Supershiftexperimente wurden durchgeführt indem jeweils 1  $\mu\text{l}$  anti-Sp1-, anti-Sp3-, anti-AP2- oder Egr-1-Antikörper 10 Minuten vor Zugabe der radioaktiv markierten

Proben mit den Kernproteinen inkubiert wurden. Der Protein-DNA-Komplex wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf 5% Polyacrylamid Gelen bei 200 V in 0,5x TBE elektrophoretisch getrennt. Die Gele wurden unter Vakuum getrocknet und bei -80°C unter Verwendung einer Verstärkerfolie (Kodak BioMax intensifying screen) entwickelt (Kodak BioMax MR-Film).

### **3.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte durch den “one-way analysis of variance“ Test (ANOVA) mittels GraphPad Statistical Software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Angegeben ist jeweils - soweit nicht gesondert erwähnt - der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM).