

Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der Einfluss des Angiotensin II Rezeptor Typ I auf die Tumorzellproliferation  
und -invasion der Magenkarzinomzelllinie MKN28**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maxi Wass

aus Berlin

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. med. C. Röcken  
                         2. Prof. Dr. med. H. Höfler  
                         3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. Sers

Datum der Promotion: 29.01.2010

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Magenkarzinom.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie des Magenkarzinoms.....	1
1.1.2	Pathogenese und Ätiologie des Magenkarzinoms.....	2
1.1.2.1	Risikofaktoren.....	2
1.1.2.2	Genetische Faktoren.....	3
1.1.2.3	Präkanzerosen.....	3
1.1.3	Pathologie des Magenkarzinoms.....	4
1.1.3.1	Histologische Klassifikation.....	6
1.1.4	Prognose des Magenkarzinoms.....	6
<b>1.2</b>	<b>Das Lokale Angiotensin II System.....</b>	<b>8</b>
1.2.1	Die Angiotensinrezeptoren.....	8
1.2.2	Das Konzept des lokalen Angiotensin II Systems.....	9
1.2.2.1	Die Funktion lokaler Angiotensin II Systeme.....	11
1.2.3	Die Bedeutung des lokalen Angiotensin II Systems in Tumoren.....	12
1.2.4	Lokale Angiotensin II Systeme und spezielle Aspekte der Tumorbilogie.....	14
1.2.5	Das lokale Angiotensin II System im Magenkarzinom.....	16
<b>1.3</b>	<b>Aufgabenstellung.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>18</b>
2.1.1	Geräte und Software.....	18
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.3	Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	19
2.1.4	Medien und Reagenzien für die Zellkultur.....	19
2.1.5	Kit-Systeme, Primer und Restriktionsenzyme.....	20
2.1.6	Bakterienstämme und Zelllinien.....	20
2.1.7	Plasmide .....	20

---

<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.2.1	Plasmidherstellung.....	21
2.2.1.1	pEGFP-N1.....	21
2.2.1.2	pEF-Dest51/agtr1.....	21
2.2.1.3	pEF/GW-51/lacZ.....	21
2.2.2	Plasmidvervielfältigung und -aufreinigung.....	23
2.2.2.1	Kultivierung und Gefrierlagerung von Bakterien.....	23
2.2.2.2	Transformation kompetenter Zellen.....	23
2.2.2.3	Herstellung von LB-Flüssigmedium .....	23
2.2.2.4	Herstellung von Ampicillin-LB-Agarplatten.....	23
2.2.2.5	Mini-Plasmidpräparation.....	24
2.2.3	Plasmidlinearisierung.....	24
2.2.3.1	Testrestriktion.....	24
2.2.3.2	Präparative Restriktion.....	25
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	25
2.2.5	Aufreinigung von DNA.....	25
2.2.6	Agarosegel-Elektrophorese.....	26
2.2.7	RNA-Isolation.....	26
2.2.8	DNase-Verdau und cDNA-Synthese.....	27
2.2.9	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
2.2.9.1	Semiquantitative RT-PCR.....	27
2.2.9.2	Nested PCR.....	28
2.2.9.3	<i>Real-time</i> quantitative RT-PCR-Analysen.....	28
<b>2.3</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>31</b>
2.3.1	Kultivierung adhärent wachsender Zellen.....	31
2.3.2	Herstellung von Zellkonserven.....	31
2.3.3	Transfektion von Zellen.....	32
2.3.3.1	Transiente Transfektion.....	32
2.3.3.2	Optimierung des Plasmid-Transfektionsreagenz-Verhältnisses.....	32
2.3.3.3	Bestimmung der Blastocidinanzdosis.....	33
2.3.3.4	Stabile Transfektion.....	33
2.3.4	Proliferationsassays.....	34
2.3.4.1	Zellzählung.....	34
2.3.4.2	MTT-Assay.....	34
2.3.4.3	<sup>3</sup> H-Thymidinassay / <sup>3</sup> H-Leucinassay.....	34
2.3.5	Matrigel-Invasionsassay.....	35
<b>2.4</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>35</b>

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion I: Stabiler Gentransfer</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1.1	Plasmidherstellung	36
3.1.1.1	Plasmidaufreinigung	37
3.1.1.2	Plasmidlinearisierung	37
3.1.2	Optimierung der Transfektionsparameter	39
3.1.3	Transiente Expression des AT1R in MKN28 Zellen	40
3.1.3.1	AT1R mRNA Expression in untransfizierten MKN28 Zellen	41
3.1.4	Stabile Expression des AT1R in MKN28 Zellen	42
3.1.4.1	Erstellen einer Dosis-Wirkungskurve für die Zelllinie MKN28	42
3.1.4.2	Stabile Transfektion und Klonierung von Einzelzellen	43
3.1.4.3	AT1R mRNA Expression der Zellklone	43
3.1.5	Stabile Expression des Mockvektors in MKN28 Zellen	46
<b>3.2</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
3.2.1	Optimierung der Transfektion	47
3.2.1.1	DNA-Lipid-Verhältnis	47
3.2.1.2	Plasmidkonformation	49
3.2.2	Plasmidlinearisierung	49
3.2.3	Transiente und stabile Transfektion der MKN28 Zellen	51
3.2.4	Nachweis der AT1R mRNA Expression in MKN28 Zellen	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion II: Proliferation und Invasion transfizierter Zellen</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
4.1.1	Datenanalyse	55
4.1.2	Die AT1R Überexpression steigert die Proliferation	57
4.1.3	Die AT1R Überexpression steigert die Invasion	61
<b>4.2</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
4.2.1	Methodische Diskussion	65
4.2.1.1	Zellkulturassays	65
4.2.1.2	Zellkulturbedingungen (Mockvektor und Selektionsmedium)	66
4.2.1.3	Statistische Auswertung der Zellkulturassays	66

4.2.2	Die AT1R Überexpression und spezielle Aspekte der Tumorbilogie.....	67
4.2.2.1	Die AT1R Expression erhöht die Tumorzellproliferation.....	68
4.2.2.2	Der Einfluss des AT1R auf die Tumorangiogenese.....	69
4.2.2.3	Die AT1R Expression erhöht die Invasivität.....	70
4.2.3	AT1R-AT2R-Wechselwirkungen.....	74
4.2.3.1	Modulation der AT1R Funktion durch Hochregulation des AT2R.....	75
4.2.3.2	Modulation der AT1R Funktion durch Dimerisierung.....	76
4.3	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>77</b>
5	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>78</b>
6	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
7	<b>Anhang.....</b>	<b>XIV</b>
7.1	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XIV</b>
7.2	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>XVII</b>
7.3	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XVII</b>
7.4	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>XVIII</b>
7.5	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>XIX</b>
7.6	<b>Danksagung.....</b>	<b>XX</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Magenkarzinom

Das Magenkarzinom macht mehr als 90% aller malignen Magentumore aus. Es handelt sich um einen malignen epithelialen Tumor, der sich am häufigsten vom Foveolarepithel der Magenschleimhaut ableitet. Außer Adenokarzinomen finden sich vereinzelt auch Plattenepithelkarzinome, adenosquamöse Karzinome und undifferenzierte Karzinome. Seltener Magentumoren sind MALT-Lymphome oder Gastrointestinale Stromatumore (GIST), die anders als das Magenkarzinom behandelt werden.

### 1.1.1 Epidemiologie des Magenkarzinoms

Etwa 1 Million Menschen sind im Jahr 2007 neu an einem Magenkarzinom erkrankt. Damit gehört das Magenkarzinom zu einer der häufigsten malignen Erkrankungen und stellt weltweit betrachtet den vierthäufigsten Tumor des Menschen dar (Garcia et al., 2007). Die Inzidenz des Magenkarzinoms zeigt große geographische Unterschiede. In Japan, Korea, China und einigen Ländern Osteuropas und Lateinamerikas ist das Risiko, an einem Magenkarzinom zu erkranken, um das sechs- bis zehnfache erhöht im Vergleich zu Regionen mit niedriger Inzidenz, u.a. Westeuropa, Nordamerika, Nord- und Ostafrika, Südasien, Australien und Neuseeland (Parkin et al., 2005). Dabei treten in Gebieten mit hohem Erkrankungsrisiko Adenokarzinome vom intestinalen Typ häufiger auf, während in Gebieten mit einem niedrigen Erkrankungsrisiko eher die gering differenzierten, diffus wachsenden Adenokarzinome dominieren.

Weltweit erkranken Männer etwa doppelt so häufig wie Frauen an einem Magenkarzinom (Crew und Neugut, 2006). Etwa 80% aller Tumore werden im Alter zwischen 60 und 80 Jahren diagnostiziert, wobei gut differenzierte Adenokarzinome etwas häufiger bei Männern im höheren Alter vorkommen, während diffuse Adenokarzinome meist bei jüngeren, bevorzugt weiblichen Patientinnen auftreten.

Durch eine rückläufige Neuerkrankungsrate von *Helicobacter pylori*- (*H.p.*-) Infektionen und durch verbesserte Früherkennungsmaßnahmen sind in den letzten Jahrzehnten Inzidenz und Mortalität des Magenkarzinoms weltweit stetig gesunken (Crew und Neugut, 2006). Dennoch bleibt das Magenkarzinom eine Erkrankung mit einer schlechten Prognose und einer hohen Sterblichkeitsrate. So stellt es nach dem

Bronchialkarzinom die zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache dar, bedingt durch eine durchschnittliche Überlebensrate von lediglich 25% (Parkin et al., 2005).

### **1.1.2 Pathogenese und Ätiologie des Magenkarzinoms**

Magenkarzinome haben eine multifaktorielle Genese. Sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse spielen bei der Entstehung des Magenkarzinoms eine entscheidende Rolle. Basierend auf epidemiologischen und pathologischen Studien postulierten Correa und Kollegen erstmalig 1975 einen prolongierten präkanzerösen Prozess sequentiell ablaufender histomorphologischer Veränderungen der Magenschleimhaut, die letztendlich zur Entstehung eines Magenkarzinoms führen. Nach diesem Modell entwickelt sich aus einer chronischen Gastritis eine multifokale Atrophie, die dann über eine intestinale Metaplasie in eine Dysplasie übergeht und schließlich in einem invasiven Karzinom mündet (Correa, 1992). Die Entwicklung früher Läsionen der Magenschleimhaut (Gastritis, Atrophie) ist mit dem chronischen Einwirken exogener Noxen, u.a. hoher Salzgehalt der Nahrung und interner Noxen, vor allem der *H.p.*-Infektion, assoziiert (Tsugane, 2005, Correa, 1992).

#### *1.1.2.1 Risikofaktoren*

Für das Magenkarzinom, insbesondere für den intestinalen Typ, sind zahlreiche Risikofaktoren etabliert. Einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung eines Magenkarzinoms stellt die *H.p.*-Infektion dar. Verschiedene epidemiologische Studien zeigen eine Assoziation zwischen *H.p.*-Infektion und der Karzinogenese des Magens (Danesh, 1999). So wurde abhängig von der Virulenz des Erregers ein 3- bis 30-fach erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines Karzinoms bei Infektion mit diesem Erreger beobachtet (Brenner et al., 2004, Ernst und Gold, 2000). Dies führte dazu, dass 1994 die Weltgesundheitsorganisation (WHO) *H.p.* als Typ-I-Karzinogen klassifizierte (IARC, 1994). *H.p.*-Infektionen führen in den meisten Fällen zu einer chronischen Gastritis und werden mit pathologischen Frühveränderungen der Magenschleimhaut – Atrophie, intestinale Metaplasie, Dysplasie – in Verbindung gebracht (Carl-McGrath et al., 2007<sub>a</sub>), die die Umbauprozesse in der Pathogenese des Magenkarzinoms vom intestinalen Typ charakterisieren (Correa, 1992). Die *H.p.*-Infektion ist für die Entstehung des Magenkarzinoms nicht allein verantwortlich. Vielmehr schafft dieser Erreger Bedingungen, die eine Krebsentwicklung begünstigen und interagiert mit zusätzlichen Wirtsfaktoren und exogenen Umweltfaktoren.

Die geographischen Unterschiede in der Inzidenz des Magenkarzinoms sowie Migrationsstudien deuten darauf hin, dass Umwelteinflüsse und die individuelle Lebensweise eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese des Magens spielen. So haben Japaner, die in die USA ausgewandert sind, in der Folgegeneration kein erhöhtes Risiko für ein Magenkarzinom (Kamineni et al., 1999). An auslösenden Umweltfaktoren werden eine Ernährung mit übermäßigem Verzehr von Salz, Kohlenhydraten und Nitraten, Mangel an frischem Obst und Gemüse sowie der Genuss von Nikotin und Alkohol diskutiert (Carl-McGrath et al., 2007<sub>a</sub>). Seltener Risikofaktoren sind die Epstein-Barr-Virus-Infektion, Bestrahlung, Gallereflux und die perniziöse Anämie (Crew und Neugut, 2006).

#### 1.1.2.2 *Genetische Faktoren*

Bei der Entwicklung des diffusen Subtyps des Magenkarzinoms spielt neben Umweltfaktoren vor allem eine genetische Prädisposition eine Rolle (Taal et al., 1999). Für die Bedeutung erblicher Faktoren spricht ein gehäuftes familiäres Vorkommen des Magenkarzinoms sowie die erhöhte Inzidenz bei Trägern der Blutgruppe A. Des Weiteren kommt es im Rahmen hereditärer Tumorsyndrome, u.a. familiäre adenomatöse Polypose (FAP), hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC), und Peutz-Jeghers-Syndrom, vermehrt zu Magenkarzinomfällen. Ferner existiert ein familiäres Magenkarzinomsyndrom, das auf einer Mutation des E-Cadherin-Gens beruht und mit einem gehäuften Auftreten von Adenokarzinomen des diffusen Typs assoziiert ist (Caldas et al., 1999).

#### 1.1.2.3 *Präkanzerosen*

Tubuläre und villöse Adenome der Magenschleimhaut sowie die hochgradige intraepitheliale Neoplasie zählen zu den obligaten Präkanzerosen des Magenkarzinoms. Bei der Gastritis vom Typ B, die in den meisten Fällen durch eine Infektion mit *H.p.* verursacht ist, ist das relative Karzinomrisiko um das zwei- bis sechsfache erhöht (Vieth und Stolte, 2006). Aber auch andere Formen der Gastritis können aufgrund der verstärkten Epithelregeneration die Entstehung des Magenkarzinoms begünstigen. Dazu zählen die chronische atrophische Autoimmungastritis vom Typ A und die Stumpfgastritis im Anastomosenbereich nach Magenteilresektion (Shang und Peña, 2005).

### 1.1.3 Pathologie des Magenkarzinoms

Magenkarzinome treten in zwei Dritteln der Fälle im Bereich der kleinen Kurvatur im Antrum auf, wobei die Zahl der in der Kardia und im Besonderen im gastroösophagealen Übergang lokalisierten Adenokarzinome in den letzten Jahrzehnten erheblich zugenommen hat (Shang und Peña, 2005). Aus prognostischen Gesichtspunkten unterscheidet man die Magenfrühkarzinome mit begrenztem Tiefenwachstum und günstiger Prognose von den fortgeschrittenen Adenokarzinomen des Magens mit schlechter Prognose. Die auf die Mukosa und Submukosa der Magenwand beschränkten Magenfrühkarzinome schließen eine lymphogene Metastasierung grundsätzlich nicht aus, haben aber nach Magenresektion mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 90% eine gute Prognose (Aurello et al., 2007). Von besonderer Bedeutung ist hier daher die Früherkennung. Aus endoskopisch-makroskopischen Aspekten unterscheidet man unterschiedliche Wachstumsformen der Frühkarzinome: Typ I mit exophytischem Wachstum, Typ IIa mit oberflächlicher leicht erhabener Ausbreitung, Typ IIb mit komplett flachem Wachstum, Typ IIc mit leichter Ulzeration und Typ III mit ulzerösem Wachstum (Hamilton und Aaltonen, 2000). Beim fortgeschrittenen Adenokarzinom werden nach Borrmann vier makroskopische Wachstumsformen unterschieden: Typ I mit polypösem Wachstum, Typ II mit Ulzeration und scharf begrenztem Wachstum, Typ III mit Ulzeration und diffuser Ausbreitung und Typ IV mit endophytisch diffus infiltrierendem Wachstum (Hamilton und Aaltonen, 2000). Die Tumorausbreitung erfolgt *per continuitatem* in benachbarte Organe, u.a. Ösophagus, Duodenum, Kolon, Pankreas und lymphogen in regionäre sowie abdominale und supraclaviculäre Lymphknoten. Während die Adenokarzinome vom diffusen Typ bevorzugt mit einer Peritonealkarzinose einhergehen, metastasieren gut differenzierte Adenokarzinome vor allem hämatogen über die Pfortader in die Leber und anschließend in Lunge, Knochen und Gehirn (Mori et al., 1995). Die aktuelle TNM-Klassifikation und die UICC Stadieneinteilung des Magenkarzinoms sind in Tabelle 1.1 und 1.2 dargestellt (Wittekind et al., 2005).

**Tabelle 1.1: Klinische TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms (Wittekind et al., 2005)**

<b>T-Primärtumor (T)</b>	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Karzinoma in situ: intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der Lamina propria
T1	Tumor infiltriert Lamina propria oder Submukosa
T2a	Tumor infiltriert Muscularis propria
T2b	Tumor infiltriert Subserosa
T3	Tumor penetriert Serosa (viszerales Peritoneum) ohne Infiltration benachbarter Strukturen (Milz, Querkolon, Leber, Zwerchfell, Pankreas, Bauchwand, Nebenniere, Niere, Dünndarm, Retroperitoneum)
T4	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen
<b>N-Regionäre Lymphknoten (N)</b>	
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-6 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 7-15 regionären Lymphknoten
N3	Metastasen in mehr als 15 regionären Lymphknoten
<b>M-Fernmetastasen (M)</b>	
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

**Tabelle 1.2: UICC Stadiengruppierung basierend auf der TNM-Klassifikation**

<b>Stadium</b>	<b>Tumor (T)</b>	<b>Regionäre Lymphknoten (N)</b>	<b>Fernmetastasen (M)</b>
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T1	N1	M0
Stadium II	T2a/b	N0	M0
	T1	N2	M0
	T2a/b	N1	M0
Stadium IIIA	T3	N0	M0
	T2a/b	N2	M0
	T3	N1	M0
Stadium IIIB	T4	N0	M0
	T3	N2	M0
Stadium IV	T1, T2, T3	N3	M0
	T4	N1, N2, N3	M0
	jedes T	jedes N	M1

### *1.1.3.1 Histologische Klassifikation*

Neben der Unterscheidung des Magenkarzinoms nach Invasionstiefe und makroskopischem Wachstumsverhalten kann eine Einteilung nach dem histologischen Typ vorgenommen werden, wobei die Klassifikation der WHO und die nach Laurén die gebräuchlichsten sind (Hamilton und Aaltonen, 2000). Die WHO unterscheidet vier histologische Typen des Adenokarzinoms: papillär, muzinös und tubulär wachsende Karzinome sowie das Siegelringkarzinom. Entsprechend der Ausreifung der Drüsen und Epithelien erfolgt weiterhin eine Abstufung in hohe, mittlere, geringe und fehlende Differenzierung der Adenokarzinome. Die Klassifikation nach Laurén unterteilt das Magenkarzinom nach dem histomorphologischen Wachstumsmuster und der Ausbreitungstendenz in den intestinalen Typ und den diffusen Typ, die zusammen 90% aller Adenokarzinome ausmachen. Mischformen aus beiden Typen, der sog. Mischtyp, sind möglich. Der intestinale Typ ist gut differenziert, bildet Drüsenstrukturen und wird durch ein expansives, polypöses Wachstum charakterisiert. Der diffuse Typ wächst infiltrativ und besteht aus entdifferenzierten Adenokarzinomzellen oder Siegelringzellen. Er ist prognostisch ungünstiger und zeigt eine frühzeitige lymphogene Metastasierung.

### **1.1.4 Prognose des Magenkarzinoms**

Die Prognose des Magenkarzinoms ist von unterschiedlichen pathologisch-anatomischen Faktoren abhängig, u. a. vom makroskopischen Wachstumsmuster, histologischem Typ, der Invasionstiefe des Tumors, der Invasion von Lymph- und Blutgefäßen sowie der Lymphknotenbeteiligung (Yokota et al., 2004). Von hoher prognostischer Relevanz ist das Tumorstadium nach der TNM-Klassifikation unter besonderer Abgrenzung der Frühkarzinome (T1) gegenüber anderen Invasionsstadien T2-T4 (fortgeschrittenes Karzinom) sowie das postoperative Ergebnis nach Primäroperation. Daher variieren die 5-Jahres-Überlebensraten stark. So hat das Magenfrühkarzinom ohne Beteiligung regionärer Lymphknoten mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 90% eine sehr gute Prognose. Hat der Tumor bereits regionäre Lymphknoten infiltriert, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nur noch bei 70% und beträgt für fortgeschrittene Adenokarzinome je nach Resektionsergebnis 45% und weniger (Aurello et al., 2007). Als bedeutendster unabhängiger Prognosefaktor des Magenkarzinoms ist die lymphogene Metastasierung anzusehen (Gretschel et al., 2001). Aufgrund des häufig symptomarmen Krankheitsverlaufes in den Frühstadien

erfolgt die Diagnosestellung in der Mehrzahl der Fälle jedoch erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium, in dem schon Lymphknotenmetastasen vorliegen. Hierdurch lässt sich die niedrige Gesamt-5-Jahres-Überlebensrate von 25% erklären. Die Früherkennung des Magenkarzinoms und eine frühzeitige individualisierte Therapie sind somit entscheidend, um die Gesamtprognose erheblich zu verbessern. Besonders Risikogruppen würden von Früherkennungsmaßnahmen profitieren. Einen neuen Ansatz stellen die Abschätzung der Prognose sowie das Ansprechen auf adjuvante und neoadjuvante Therapien mit Hilfe von molekularen Markern dar, mit denen die Prognosebewertung mittels klassischer, pathologisch-anatomisch definierter Tumorstadien erweitert werden kann. Für das Magenkarzinom sind zahlreiche genetische Alterationen und deren Einfluss auf die Prognose des Magenkarzinoms beschrieben (Yasui et al., 2005). Tumorsuppressorgene (p53) und Gene für epitheliale und endotheliale Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR, HER-2-Rezeptor, VEGFR) werden im Zusammenhang mit dem Magenkarzinom diskutiert (Scartozzi et al., 2004). Weiterhin ist die reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen, wie E-Cadherin und CD44, mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Chu et al., 2008, Liu et al., 2005). Diese potentiell prognostischen Faktoren werden vereinzelt bereits in der Behandlung von Krebspatienten als Ziel für eine spezifische Chemotherapie bzw. Antikörpertherapie genutzt, z.B. Trastuzumab bei HER-2-Rezeptor positivem Mammakarzinom, und können somit auch als prädiktive Marker, die eine Aussage über das Ansprechen auf die Therapie ermöglichen, herangezogen werden.

Um die Möglichkeiten der Früherkennung und die schlechte Prognose von Magenkrebspatienten zu verbessern, ist die Identifikation neuer Therapieziele und deren Bedeutung in der Tumorbilogie für eine individualisierte Therapie entscheidend. Die Identifizierung neuer prognostischer und prädiktiver Marker für eine zielgerichtete Therapie des Magenkarzinoms und deren Einfluss auf tumorbiologische Prozesse ist zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung (Gravalos und Jimeno, 2008, Lordick und Schulze, 2008). Diesbezüglich gewinnt das lokale Angiotensin II System als prognostisch-relevanter Faktor zunehmend an Bedeutung. Mehrere Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus einzelner Gene des lokalen Angiotensin II Systems und dem Krebsrisiko bzw. der Tumorprogression (Medeiros et al., 2004, Koh et al., 2003, Hajek et al., 2003). So ist beispielsweise der Angiotensin-Converting-Enzyme- (ACE-) Genpolymorphismus sowohl mit der Entstehung als auch

der Progression des Magenkarzinoms assoziiert (Ebert et al., 2005, Röcken et al., 2005). Des Weiteren lässt sich aus der Kombination von Angiotensin II Rezeptor Typ 1 Status im Magenkarzinom und dem ACE-Genpolymorphismus eine Vorhersage über das Risiko einer zusätzlichen Lymphknotenbeteiligung bei Magenkarzinompatienten ableiten (Röcken et al., 2007).

## **1.2 Das Lokale Angiotensin II System**

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) wurde ursprünglich als ein zirkulierendes, endokrines Hormonsystem beschrieben (Hall, 2003). In dieser klassischen Ansicht vom RAS stellte Angiotensin II (ANG II), welches in der Zirkulation in einer Kaskade enzymatischer Reaktionen gebildet wird (Abb. 1.1), das einzig biologisch wirksame Hormon dar, das hauptsächlich über Vasokonstriktion und Aldosteronproduktion die Blutdruck- und Volumenregulation steuert. Die Protease Renin und das ACE wurden als die entscheidenden Enzyme in der Angiotensinsynthese angesehen. Die enzymatische Kaskade des klassischen RAS beginnt mit der Biosynthese von Renin in den juxtaglomerulären Zellen der Niere. Renin spaltet im ersten Reaktionsschritt das im Blutplasma zirkulierende und in der Leber synthetisierte Vorläuferpeptid Angiotensinogen zum Decapeptid Angiotensin I (ANG I). ANG I ist biologisch inaktiv und wird anschließend durch das ACE, einer membranständigen Carboxydipeptidase, die von Endothelzellen der Lunge exprimiert wird, zum biologisch aktiven Oktapeptid ANG II umgebaut. ANG II wird über die systemische Zirkulation zum peripheren Gewebe transportiert und wirkt hauptsächlich an zwei verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren, Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT1R) und Angiotensin II Rezeptor Typ 2 (AT2R), wobei die meisten physiologischen Funktionen des RAS über den AT1R vermittelt werden (de Gasparo et al., 2000).

### **1.2.1 Die Angiotensinrezeptoren**

Die Wirkungen von ANG II werden durch spezifische, hoch komplexe Signaltransduktionswege vermittelt, die nach der Bindung von ANG II an seine spezifischen Rezeptoren stimuliert werden. Zu den bedeutendsten Rezeptoren zählen der AT1R und der AT2R, die beide kloniert und pharmakologisch charakterisiert sind (de Gasparo et al., 2000). Beide Rezeptoren zählen zu der Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) mit sieben transmembranären Domänen. Der

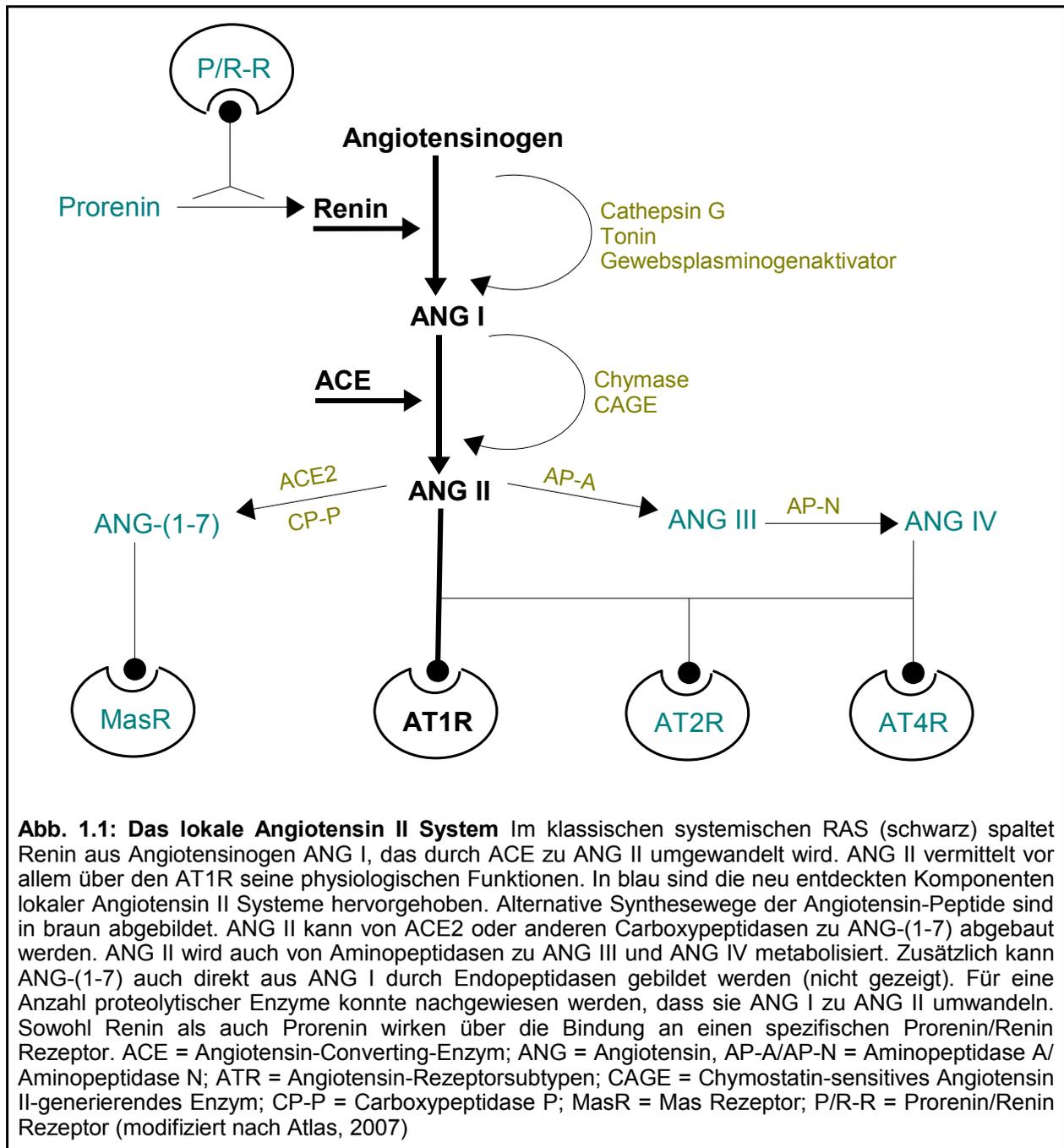
humane AT1R besteht aus 359 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 41 kDa. Sein Gen (*agtr1*) befindet sich auf Chromosom 3q22. Der AT2R, dessen Sequenz nur zu 34% homolog zu der des AT1R ist, besteht aus 363 Aminosäuren und wird von einem Gen auf Chromosom X codiert. Pharmakologisch können die Rezeptoren durch ihre unterschiedliche spezifische Antagonisierung unterschieden werden. Der AT1R wird selektiv durch Biphenylimidazole wie Olmesartan oder Losartan geblockt, wohingegen Tetrahydroimidazolpyridine wie PD123319 spezifisch den AT2R blockieren. Die Mehrzahl der physiologischen und pathophysiologischen Effekte von ANG II werden über den AT1R vermittelt. Der AT1R wird im adulten Organismus von zahlreichen Geweben exprimiert, u.a. Herz, Gefäßen, Niere, Lunge, Leber, Plazenta, Blase, Gastrointestinaltrakt und im Gehirn (de Gasparo et al., 2000). Abgesehen von Vasokonstriktion und Aldosteronsekretion zur Blutdruckregulation stimuliert ANG II über den AT1R das Wachstum und die Hypertrophie von Zellen (Touyz et al., 1999, Wolf und Wenzel, 2004). Der AT2R, der während der fetalen Entwicklung der dominierende Angiotensin-Rezeptorsubtyp ist, wird im adulten Organismus nur noch vereinzelt in niedrigen Konzentrationen gefunden, u.a. in Niere, Nebenniere, Herz, Geschlechtsorganen und in spezifischen Hirnregionen (de Gasparo et al., 2000). In pathologischen Situationen jedoch, vor allem nach Gewebeerstörung infolge Apoplex, Myokardinfarkt, Nervenläsion oder Hautverletzung, wird der AT2R vermehrt exprimiert (Dinh et al., 2001), was eine wichtige Rolle für das Remodeling von Geweben, Differenzierung und Entwicklung nahelegt. Die exakte funktionelle Bedeutung des AT2R ist nicht eindeutig geklärt. Er scheint aber viele Funktionen des AT1R zu antagonisieren, indem er auf zellulärer Ebene proliferationshemmend und apoptoseinduzierend wirkt (Nouet und Nahmias, 2000, Wolf und Wenzel, 2004).

### **1.2.2 Das Konzept des lokalen Angiotensin II Systems**

Zahlreiche physiologische und pathophysiologische Effekte von ANG II lassen sich durch das Konzept eines systemischen RAS, das ausschließlich über die Blutbahn fungiert, nicht hinreichend erklären. Des Weiteren werden Komponenten des RAS, wie Renin und Angiotensinogen, von anderen Geweben außer der Niere und Leber synthetisiert bzw. aufgenommen. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass ANG II nicht nur in der Zirkulation, sondern auch lokal in Organen gebildet wird. Neben dem klassischen systemischen RAS zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks und zur

Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes hat sich daher in den letzten Jahren die Erkenntnis durchgesetzt, dass zusätzlich in zahlreichen Organen lokale Angiotensin II Systeme existieren (Re, 2004). Diese gewebeständigen Angiotensin-Systeme enthalten alle zur *de novo* Synthese von ANG II notwendigen Komponenten in eng benachbarter Lokalisation, wobei die ANG II Synthese unabhängig von der Regulation des zirkulierenden ANG II erfolgt und ANG II mit Angiotensin Rezeptoren derselben Zelle (autokrin) oder benachbarter Zellen (parakrin) interagiert (Carey und Siragy, 2003). Da nicht alle Gewebe über ein komplettes RAS verfügen und in diesen die ANG II Synthese entweder über die Aufnahme zirkulierenden Renins oder über alternative Wege ohne Reninbeteiligung erfolgt und in den gewebeständigen RAS nicht Renin, sondern ACE bzw. Chymase die ANG II Produktion regulieren, wurde der Term „lokales RAS“ durch „lokales Angiotensin II System“ ersetzt (Danser, 2003, Miyazaki und Takai, 2006). Solche lokalen Angiotensin II Systeme wurden für zahlreiche Organsysteme, u.a. Herz, Pankreas, Niere, Gefäßsystem, Fettgewebe und ZNS beschrieben (Lavoie und Sigmund, 2003, Fleming et al., 2006, Paul et al., 2006).

Durch die Entdeckung neuer biologisch aktiver Angiotensin-Peptide und entsprechender Rezeptoren sowie die Identifizierung alternativer ANG II generierender Wege gestalten sich diese lokalen Angiotensin II Systeme zunehmend komplexer (Abb. 1.1). So ist beispielsweise ANG II nicht das einzige aktive Effektorpeptid. Andere Angiotensin-Peptide, wie Angiotensin III (ANG III), Angiotensin IV (ANG IV) und Angiotensin 1-7 (ANG-(1-7)) zeigen ebenfalls biologische Aktivität und haben eine physiologische Bedeutung (Kramkowski et al., 2006, Haulica et al., 2005, Ferrario und Chappell, 2004). Diese biologisch aktiven Metaboliten des ANG II, die u.a. durch die Carboxypeptidase ACE2 und verschiedene Aminopeptidasen synthetisiert werden, wirken an eigenen Rezeptoren. Neueste Forschungen haben spezifische funktionelle Rezeptoren für ANG IV (Chai et al., 2004), ANG-(1-7) (Santos et al., 2003, Santos und Ferreira 2007) und sogar für Renin/Prorenin (Nguyen et al., 2002, Batenburg und Danser 2008, Campbell, 2008) aufgedeckt. Des Weiteren ist Renin für die Generierung von ANG II aus Angiotensinogen nicht obligat. Zusätzlich zu Renin und ACE existieren alternative Wege für die direkte Bildung von ANG II. Solche Angiotensin II bildenden Enzyme sind u.a. Chymase, Tonin, Gewebsplasminogenaktivator und Cathepsin G (Belova, 2000).



### 1.2.2.1 Die Funktion lokaler Angiotensin II Systeme

Solche lokalen Angiotensin II Systeme fungieren in einer autokrinen bzw. parakrinen Weise und üben zahlreiche physiologische Effekte auf zellulärer Ebene aus, die nicht nur synergistisch zum systemischen RAS wirken, sondern die sich auch von den Funktionen des systemischen RAS unterscheiden. So sind die lokalen Systeme zusätzlich zur Erhaltung der Homöostase innerhalb eines Gewebes an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen beteiligt, u.a. Induktion von Zellwachstum und

-differenzierung bzw. Apoptose, Regulation von Angiogenese, Stimulation der Kollagensynthese sowie Inflammation (Re, 2004, Leung, 2004). Die lokale Bildung von ANG II reguliert die Expression von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, die wiederum Hypertrophie, Proliferation und Migration sowie die Produktion extrazellulärer Matrix induzieren und inflammatorische Prozesse unterhalten (Ruiz-Ortega et al., 2001, Suzuki et al., 2003). Lokale Angiotensin II Systeme spielen demnach eine entscheidende Rolle für das Remodeling von Geweben und werden als pathogener Faktor in der Entstehung verschiedener kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen angesehen, u.a. Hypertonie, Hypertrophie von Herz und Gefäßen, kardiale Umbauvorgänge des Herzmuskels nach Myokardinfarkt, endotheliale Dysfunktion und Nephrosklerose (Bader und Ganten, 2008, Xu et al., 2007). Die Rolle von ANG II als Regulator für Zellproliferation, Migration, Angiogenese sowie Inflammation und Geweberemodeling legt es nahe, dass dieses Peptid bzw. lokale Angiotensin II Systeme auch an der Tumorbilogie beteiligt sind.

### **1.2.3 Die Bedeutung des lokalen Angiotensin II Systems in Tumoren**

Nicht nur im gesunden Gewebe existieren lokale Angiotensin II Systeme, auch von humanen Tumorzelllinien und malignen Tumoren werden die Komponenten dieses Systems, vor allem ACE, ANG II, AT1R, AT2R, exprimiert. Dabei ist hervorzuheben, dass das Angiotensin II System, insbesondere der AT1R, während der Entwicklung eines malignen Tumors oft hochreguliert wird, was auf einen Zusammenhang zwischen der Expression lokaler Angiotensin II Systeme in Geweben und deren Karzinogenese hindeutet.

Die Expression der einzelnen Komponenten des Angiotensin II Systems in den verschiedenen Tumoren, u.a. von Gehirn, Lunge, Pankreas, Brust, Prostata, Haut, Zervix, Ovar und Magen, unterscheidet sich häufig von der korrespondierender gesunder Gewebe (Deshayes und Nahmias, 2005). Dabei findet sich im Gegensatz zu normalem Gewebe in Tumoren oftmals eine Überexpression des AT1R. Des Weiteren scheinen die Veränderungen im Expressionsmuster der Komponenten mit dem Tumorgrad zu korrelieren (Arrieta et al., 2008, Louis et al., 2007) – eine Beobachtung, die jedoch nicht verallgemeinert werden kann und vom jeweiligen individuellen Tumortyp abhängt. So wird beispielsweise im hyperplastisch veränderten Mammagewebe eine verstärkte AT1R Expression gefunden, während im invasiven

Mammakarzinom eine Herabregulation des AT1R erfolgt (de Paepe et al., 2001). Im Ovarialkarzinom und Zervixkarzinom indessen korreliert die AT1R Überexpression mit der Invasivität des Tumors (Suganuma et al., 2005, Kikkawa et al., 2004).

Epidemiologische Studien weisen ebenfalls auf den Einfluss lokaler Angiotensin II Systeme auf die Tumorprogression hin. ACE-Hemmer und AT1R-Blocker, Medikamente, die in das RAS eingreifen, werden gewöhnlich in der Behandlung der Hypertonie eingesetzt. Eine retrospektive Kohortenstudie an 5207 Patienten fand heraus, dass die Patienten, die länger als 3 Jahre mit einem ACE-Hemmer (Captopril, Enalapril oder Lisinopril) behandelt wurden, ein geringeres Risiko an Brust- oder Lungenkrebs zu erkranken, aufwiesen (Lever et al., 1998). In einer Nested-Fall-Kontroll-Studie konnte gezeigt werden, dass die Einnahme des ACE-Hemmers Captopril, jedoch nicht die Einnahme anderer klassischer Antihypertensiva mit einem geringeren Risiko für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms assoziiert war (Ronquist et al., 2004). Ein reduziertes Risiko, ein Ösophagus- (55%), Pankreas- (48%) oder Kolonkarzinom (47%) zu entwickeln, konnte in einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie von 483733 Patienten beobachtet werden (Lang, 2006). 38% dieser Patienten hatten einen ACE-Hemmer eingenommen. Im Gegensatz dazu konnten andere epidemiologische Studien keine Korrelation zwischen der Einnahme eines ACE-Hemmers bzw. AT1R-Blockers und einem verminderten Krebsrisiko nachweisen (Friis et al., 2001, Lindholm et al., 2001, Li et al., 2003). Die Diskrepanz in den Ergebnissen der einzelnen Studien bleibt unklar, könnte aber darauf beruhen, dass andere ACE-Hemmer bzw. AT1R-Blocker in unterschiedlichen Populationen untersucht, verschiedene Tumorentitäten analysiert sowie die Medikamente in unterschiedlichen Dosierungen und über verschiedene Zeiträume hinweg gegeben wurden.

Obwohl in den epidemiologischen Studien die protektive Wirkung der pharmakologischen Blockade des Angiotensin II Systems auf die Tumorgenese nicht schlüssig nachgewiesen werden konnte, hemmen ACE-Inhibitoren und AT1R-Blocker eindeutig die Tumorprogression vieler solider Tumoren *in vitro* und im Tiermodell (Lindberg et al., 2004, Ino et al., 2006<sub>a</sub>). Der ACE-Hemmer Perindopril reduzierte in Mausmodellen des hepatozellulären Karzinoms und des Plattenepithelkarzinoms der Kopf-Hals-Region signifikant das Tumorwachstum und die Tumolvaskularisierung (Yoshiji et al., 2001, Yasumatsu et al., 2004). Die Verabreichung von Candesartan, einem AT1R-Antagonisten, verminderte das Tumorwachstum und die tumorassoziierte

Angiogenese im murinen Sarkommodell (Fujita et al., 2002) und reduzierte die Anzahl an Lungenmetastasen in Mausmodellen des Nieren- und Bronchialkarzinoms (Fujita et al., 2002, Miyajima et al., 2002). Sowohl Captopril als auch Irbesartan (AT1R-Antagonist) verringerten in einem Mausmodell kolorektaler Lebermetastasen die Anzahl der Metastasen, deren Wachstum und Vaskularisierung (Neo et al., 2007). Eine signifikante Minderung des Tumorwachstums und der Tumorangiogenese durch den Einsatz von Candesartan konnten auch für ein murines Melanom-Modell (Egami et al., 2003) und in Xenograft-Mausmodellen humaner Prostatakrebszellen (Kosaka et al., 2007, Uemura et al., 2003), Ovarialkrebszellen (Suganuma et al., 2005), Blasenkrebszellen (Kosugi et al., 2006) und Magenkrebszellen (Huang et al., 2008<sub>b</sub>) nachgewiesen werden.

Diese experimentellen Untersuchungen zeigen, dass lokale Angiotensin II Systeme das Tumorwachstum, die Tumorangiogenese und die Metastasierung beeinflussen, nicht aber in Prozesse der Tumorinitialisierung eingreifen. ACE-Hemmer bzw. AT1R-Blocker scheinen somit eher einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf bzw. die Mortalität als auf die Inzidenz von Tumorerkrankungen zu haben, was die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den epidemiologischen und experimentellen Studien erklären könnte. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Blockade des lokalen Angiotensin II Systems ein effektives therapeutisches „Target“ zur Behandlung von Tumoren darstellt. Lokale Angiotensin II Systeme haben einen aktivierenden Effekt auf zahlreiche Aspekte der Tumorbilogie: sie fördern das Tumorwachstum, die Tumordinvasion sowie die Metastasierung und Angiogenese. Durch welche molekularbiologischen Wirkmechanismen sie in die Regulation der Tumorentwicklung und -progression eingreifen, konnte durch *in vitro* und *in vivo* Experimente ansatzweise beschrieben werden.

#### **1.2.4 Lokale Angiotensin II Systeme und spezielle Aspekte der Tumorbilogie**

Im Verlauf der Karzinogenese eignen sich die Tumorzellen durch eine Reihe von Genveränderungen bestimmte Eigenschaften an, mit denen sie nacheinander zahlreiche zellphysiologische Kontrollmechanismen, die im gesunden Organismus Zellproliferation, Differenzierung und Gewebemöostase regulieren, unterlaufen. Diese Genveränderungen betreffen vor allem Protoonkogene, Tumorsuppressorgene und andere Gene, die direkt oder indirekt das Zellwachstum steuern. Die Akkumulation

dieser molekularen Veränderungen während der Tumorbildung führt zu sechs essentiellen zellphysiologischen Alterationen, die zusammen die maligne Krebszelle charakterisieren: Unabhängigkeit von wachstumsfördernden Signalen, Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, unbegrenzte Replikationsfähigkeit, Apoptoseresistenz, Induktion von Angiogenese und Fähigkeit zur Invasivität und Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000). Die veränderten Eigenschaften, die für die Karzinombildung eine bedeutende Rolle spielen, betreffen häufig nicht nur die eigentliche Tumorzelle, sondern auch ihre Interaktionen mit der Umgebung und mit anderen Zelltypen im Tumorgewebe, u.a. Fibroblasten, Endothelzellen, Immunzellen, und Entzündungszellen (Bissel und Radisky, 2001, Liotta und Kohn, 2001).

Zahlreiche experimentelle Untersuchungen belegen, dass lokale Angiotensin II Systeme eine wichtige Rolle in der Tumorbilogie spielen (Ager et al., 2008, Ino et al., 2006<sub>a</sub>, Deshayes und Nahmias, 2005). Diese experimentellen Studien haben gezeigt, dass lokale Angiotensin II Systeme das Tumorwachstum begünstigen, indem sie unterschiedliche Prozesse der Tumorbilogie beeinflussen. So fördern lokale Angiotensin II Systeme die Tumorprogression und -metastasierung, u.a. durch die Neubildung von Gefäßen und die Steigerung der Mikrogefäßdichte in soliden Tumoren (Fujita et al., 2002, Miyajima et al., 2002, Neo et al., 2007), was für ein erfolgreiches Tumorwachstum essentiell ist (Folkman, 1990). Zum Teil erfolgt dies durch die Induktion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) (Arrieta et al., 2005, Miyajima et al., 2002, Yoshiji et al., 2001). Des Weiteren fördern lokale Angiotensin II Systeme die Tumorprogression, indem sie die Proliferation (Fujimoto et al., 2001, Greco et al., 2003) und Invasion (Suganuma et al., 2005, Kikkawa et al., 2004, Carl-McGrath et al., 2007<sub>b</sub>) von Tumorzellen stimulieren. Ferner beeinflussen sie den Umbau der interstitiellen Matrix, die für das lokale Tumorwachstum von großer Bedeutung ist (Suzuki et al., 2003). Darüber hinaus modulieren lokale Angiotensin II Systeme inflammatorische Prozesse in der Mikroumgebung des Tumors (Smith und Missailidis, 2004) und schaffen so ein ideales Milieu für die Tumorprogression und -metastasierung.

### 1.2.5 Das lokale Angiotensin II System im Magenkarzinom

Einige Studien lassen die funktionelle Bedeutung des lokalen Angiotensin II Systems für die Tumorbilogie des Magenkarzinoms bereits erkennen. So korreliert der ACE-Insertations (I)-Deletions (D)-Genpolymorphismus beim Magenkarzinom mit der lokalen und lymphogenen Tumorausbreitung (Ebert et al., 2005, Röcken et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass der DD-Genotyp, welcher mit einer höheren Transkriptionsrate des ACE-Gens einhergeht (Carl McGrath et al., 2006b), verglichen mit dem ID- oder II-Genotyp mit einer vermehrten Anzahl an Lymphknotenmetastasen und einem fortgeschrittenem UICC Tumorstadium assoziiert ist (Röcken et al., 2005). Weiterhin korreliert auch der AT1R-Status signifikant mit der Anzahl der Lymphknotenmetastasen bei Magenkarzinompatienten, die bei immunhistochemisch nachweisbarer AT1R Expression eine deutlich reduzierte Überlebenszeit aufweisen (Röcken et al., 2007). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Analysen zum ACE-Genpolymorphismus und zur AT1R Expression im Magenkarzinom eine Abschätzung der Prognose erlauben und das individuelle Ansprechen auf eine therapeutische Blockade des Angiotensinsystems vorhersagen lassen (Röcken et al., 2007). Des Weiteren konnte mit diesen und anderen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Komponenten des lokalen Angiotensin Systems, u.a. ACE, AT1R und AT2R, im Magenkarzinom hochreguliert sind (Carl-McGrath et al., 2007<sub>b</sub>, Röcken et al., 2005, Röcken et al., 2007). Die tumorbiologische Relevanz des lokalen Angiotensin II Systems scheint demnach unbestritten. Über welche Mechanismen dieses System das Tumorwachstum, die Invasion und Metastasierung fördert, konnte jedoch noch nicht hinreichend geklärt werden. Es gibt nur wenige experimentelle Untersuchungen, die die Wirkungsweise des lokale Angiotensin II Systems auf pathologische Funktionen im Magenkarzinom beleuchten. In einem Xenograft-Mausmodell von humanen Magenkarzinomzellen konnte das Tumorwachstum, die tumorassozierte Bildung neuer Blutgefäße als auch die VEGF-Expression durch den AT1R-Blocker Candesartan signifikant gehemmt werden (Huang et al., 2008<sub>b</sub>). Diese Studie verweist darauf, dass AT1R-Blocker das Tumorwachstum, möglicherweise über die Hemmung der Tumorangiogenese, unterdrücken. In *in vitro* Zellkulturexperimenten bewirkte die Blockade des Angiotensin II Systems eine signifikant reduzierte Invasion von humanen Magenkarzinomzellen (Carl-McGrath et al., 2007<sub>b</sub>). Es ist daher anzunehmen, dass AT1R-Blocker sowohl durch ihre angiogenesehemmende Wirkung als auch durch

---

direkte toxische bzw. antiproliferative Effekte das Tumorwachstum hemmen und die Beteiligung des lokalen Angiotensin II Systems an Invasion und Metastasierung nicht nur auf die Induktion der Angiogenese zurückzuführen ist, sondern dass die von den Tumorzellen exprimierten Komponenten des Angiotensin II Systems direkt die Invasion und damit die lymphogene Metastasierung erleichtern. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Rolle des lokalen Angiotensin II Systems in der Tumorbilogie des Magenkarzinoms, insbesondere in der Regulation von Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung, besser zu verstehen.

### **1.3 Aufgabenstellung**

Die Studienergebnisse belegen eine biologische Relevanz des ANG II-AT1R-Systems für die Tumorbilogie des Magenkarzinoms und haben das lokale Angiotensin II System als potentiell prognostisches und therapeutisches „Target“ zur Behandlung des Magenkarzinoms identifiziert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten nun die Mechanismen, mit denen das lokale Angiotensin II System in die Biologie des Magenkarzinoms eingreift, genauer identifiziert und charakterisiert werden. Dabei wurde die These untersucht, dass die Hochregulierung des lokalen Angiotensin II Systems die Tumorzellprogression und -invasion stimuliert. Dazu wurde im ersten Teil der Arbeit durch stabilen Gentransfer eine humane Magenkarzinomzelllinie etabliert, die den AT1R verschieden stark überexprimiert. Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Effekt der unterschiedlich starken Überexpression auf die Proliferation und Invasion dieser Zellen untersucht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Geräte und Software**

Unter Verwendung folgender Geräte wurde gearbeitet: Analysewaage MC1 (Sartorius, Göttingen), Autoklav (H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim), CO<sub>2</sub>-Inkubator (Sanyo Biomedical, Bad Nenndorf), Excel (Microsoft, Berlin), Fluoreszenzmikroskop (Leica, Solms), GeneSnap-Software, GeneTools-Software und Geldokumentationsgerät G-Box (Syngene, Langenfeld), Gelelektrophoresekammer und Heizblock Digital Heatblock (VWR International GmbH, Darmstadt), Inkubationsschüttler GFL® 3031 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel), LightCycler und LightCycler-Software 3.5 (Roche Diagnostics, Mannheim), Magnetrührer (VWR International, Darmstadt), Mikroskop Eclipse ST100 (Nikon, Düsseldorf), Mikroplattenphotometer Multiscan Ascent® (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold), Mikrowelle GRILL (Panasonic, Hamburg), pH-Meter HI221 Calibration Check Microprocessor (HANNA Instruments, Kehl am Rhein), Pipetten (Eppendorf, Hamburg), Spektralphotometer Genesys 10 UV, PCR SPRINT Thermal Cycler und Thermal Cycler Thermo Hybaid Px2 (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold), Rüttler Pms-1000 und Schwenker PMR-30 (Grant Instruments, Cambridge, Großbritannien), SPSS 4.0 (Microsoft, Berlin), Sterilbank Microflow Biological Safety Cabinet für die Zellkultur (PEA GmbH, Koblenz), Sterilbank für die RNA-Isolation (Clean Air Deutschland GmbH, Hilden), Sterilbank Hera Safe Type HS9 für die PCR (Haraeus Instruments, Hanau), Tischzentrifuge (Roth, Karlsruhe), Ultrazentrifuge Universal 320R (Andreas Hettich, Tuttlingen), Vortexer (VWR International, Darmstadt), Wallac Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer, Freiburg), Wasserbad Typ 1003 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel), Zellzähler Z1 Coulter (Beckmann Coulter, Krefeld), Zentrifuge 5415 C für die Bakterienkultur (Eppendorf, Hamburg), Zentrifuge MLW T45 für die Zellkultur (Medizintechnik, Leipzig)

#### **2.1.2 Verbrauchsmaterialien**

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden verwendet: Farbfilm EPT 160T 36er (Kodak), Kryoröhrchen (Sarstedt, Nürmbrecht), Küvetten für die Zellzählung (Beckmann Coulter,

Krefeld), pico pro vials® für die Radioisotop-Assays (PerkinElmer, Freiburg), 1000 µl, 200 µl, 20 µl und 10 µl Pipettenspitzen (Sarstedt, Nürmbrecht), 15 ml-Röhre und 50 ml-Röhre und 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml Safe-Lock Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg), Sterilfilter 0,2 µm (Schleicher&Schuell, Dassel), 10 ml und 25 ml Corning® Costar® Stripette® und 24-Well Corning® Costar® Transwells (Sigma-Alderich, Steinheim), 96-Well-, 48-Well-, 24-Well- und 6-Well-Platten (Sarstedt, Nürmbrecht), 25 cm<sup>2</sup> und 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen und 100x200 mm Zellkulturschale (BD Falcon, Heidelberg)

### 2.1.3 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Folgende Chemikalien wurden verwendet: Acid-Phenol:Chlorophorm (Ambion, Darmstadt), Agarose-Gel Probenpuffer und Agarosetabs (Eurogentec, Köln), Coulter® Isoton® II Diluent und Coulter Clenz® (Beckmann Coulter, Krefeld), Dimethylsulfoxid (DMSO) (Roth, Karlsruhe), deionisiertes Wasser (Fluka BioChemica, Buchs, Schweiz), Essigsäure (J.T. Baker, Griesheim), Ethanol (Herbeta-Arzneimittel, Berlin), Ethidiumbromid (Fluka BioChemica, Buchs, Schweiz), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Roth, Karlsruhe), Glycerin (Merck, Darmstadt), Luria-Bertani Broth (LB) und LB-Top Agar (Fluka BioChemica, Buchs, Schweiz), Matrigel (BD Bioscience, Heidelberg), Methanol (J.T.Baker, Griesheim), Molekulargewichtsmarker SmartLadder 1700 - 10 bp (Eurogentec, Köln), 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) (Sigma, Deisenhofen), 2 M Natronlauge (Merck, Darmstadt), Paraformaldehyd (PFA) (Merck, Darmstadt), Radioisotope [methyl-<sup>3</sup>H]Thymidin (37 MBq/ml) und L-[4,5-<sup>3</sup>H]Leucin (37 MBq/ml) (Amersham, Freiburg), Scintilationscocktail Ultima Gold™ (PerkinElmer, Freiburg), Trichloressigsäure (TCA) (Roth, Karlsruhe), Trizma® base (Tris) (Sigma-Alderich, Steinheim).

Folgende Puffer und Lösungen wurden für die Arbeit verwendet: 10x TAE-Puffer (0,5 M EDTA, 0,4 M Tris, 1,142% Essigsäure in dH<sub>2</sub>O), MTT-Lösung (5 mg PBS in 1ml PBS).

### 2.1.4 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Für die Zellkulturexperimente wurden folgende Medien und Reagenzien verwendet: Ampicillin (100 mg/ml) und Angiotensin II (Sigma-Alderich, Steinheim), Blastocidin S HCL (Invitrogen, Karlsruhe), Fötale Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin), Dulbecco`s Phosphat Buffered Saline (PBS) ohne Ca<sup>++</sup> und Mg<sup>++</sup> (PAA Laboratories, Cölbe), Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe), Trypsin-EDTA (PAA Laboratories, Cölbe), Zellkulturmedium VLE RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, Berlin).

### 2.1.5 Kit-Systeme, Primer und Restriktionsenzyme

Folgende molekularbiologische Kits wurden verwendet: Deoxyribonuklease I Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim), NucleoSpin® Plasmid Kit und NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren), *mirVana*<sup>™</sup> miRNA Isolation Kit (Ambion, Darmstadt), Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden) unter zusätzlicher Verwendung von RnaseOUT<sup>™</sup> Ribonuklease Inhibitor (Invitrogen, Karlsruhe) und Oligo (dT) 15 Primer C110A (Promega, Mannheim), Taq PCR Core Kit und QuantiTect<sup>™</sup> SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden).

Für die PCR-Analysen wurden folgende Primer verwendet:  $\beta$ -Aktin-F (CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC) und  $\beta$ -Aktin-R (CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT) (Qiagen, Hilden), AT1R-F (CTG CAA TTC TAC AGT CAC GTA TG), AT1R-R (GGG CTT GTG AAC ATC TCT GG), AT1R-nested-F (GGC CAG TTT GCC AGC TAT AA), AT1R-nested-R (GGG GAA TCC AGG AAA AGA AA), pEF-F (ACA TTA ATT GCG TTG CGC TCA CT) und pEF-R (CTG CGT TAT CCC CTG ATT CTG TG) (BioTeZ, Berlin).

Folgende Restriktionsenzyme kamen zur Anwendung: *AatII* (20000 U/ml), *BspDI* (1000 U/ml), *BspQI* (10000 U/ml), *FspI* (5000 U/ml) und *SapI* (2000 U/ml) (New England BioLabs, Großbritannien). Alle Restriktionsenzyme wurden mit dem 10x NEBuffer 4 (New England BioLabs, Großbritannien) verdünnt.

### 2.1.6 Bakterienstämme und Zelllinien

In dieser Arbeit wurde mit folgenden Bakterienstämmen gearbeitet: *Escherichia coli* (*E.coli*) Competent Cells JM109 (Promega, Mannheim) und *E.coli* DH10B (Invitrogen, Karlsruhe).

Die humane Magenkarzinomzelllinie MKN28 wurde von der Health Science Research Resources Bank, Osaka, Japan bezogen.

### 2.1.7 Plasmide

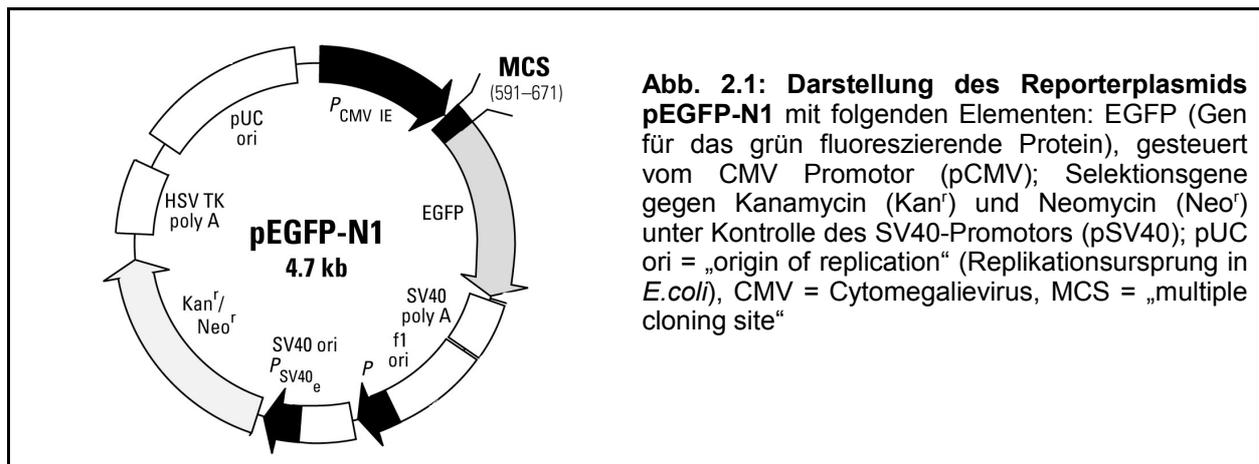
Folgende Vektoren wurden verwendet: pEGFP-N1 (Clontech, Heidelberg), pEF-DEST51/agtr1 (in *E.coli* DH10B) (RZPD, Berlin), pEF/GW-51//lacZ (Invitrogen, Karlsruhe).

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Plasmidherstellung

#### 2.2.1.1 *pEGFP-N1*

Das Plasmid *pEGFP-N1* wurde uns freundlicherweise in aufgereinigter Form von der Arbeitsgruppe Sers (Institut für Pathologie, Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt.

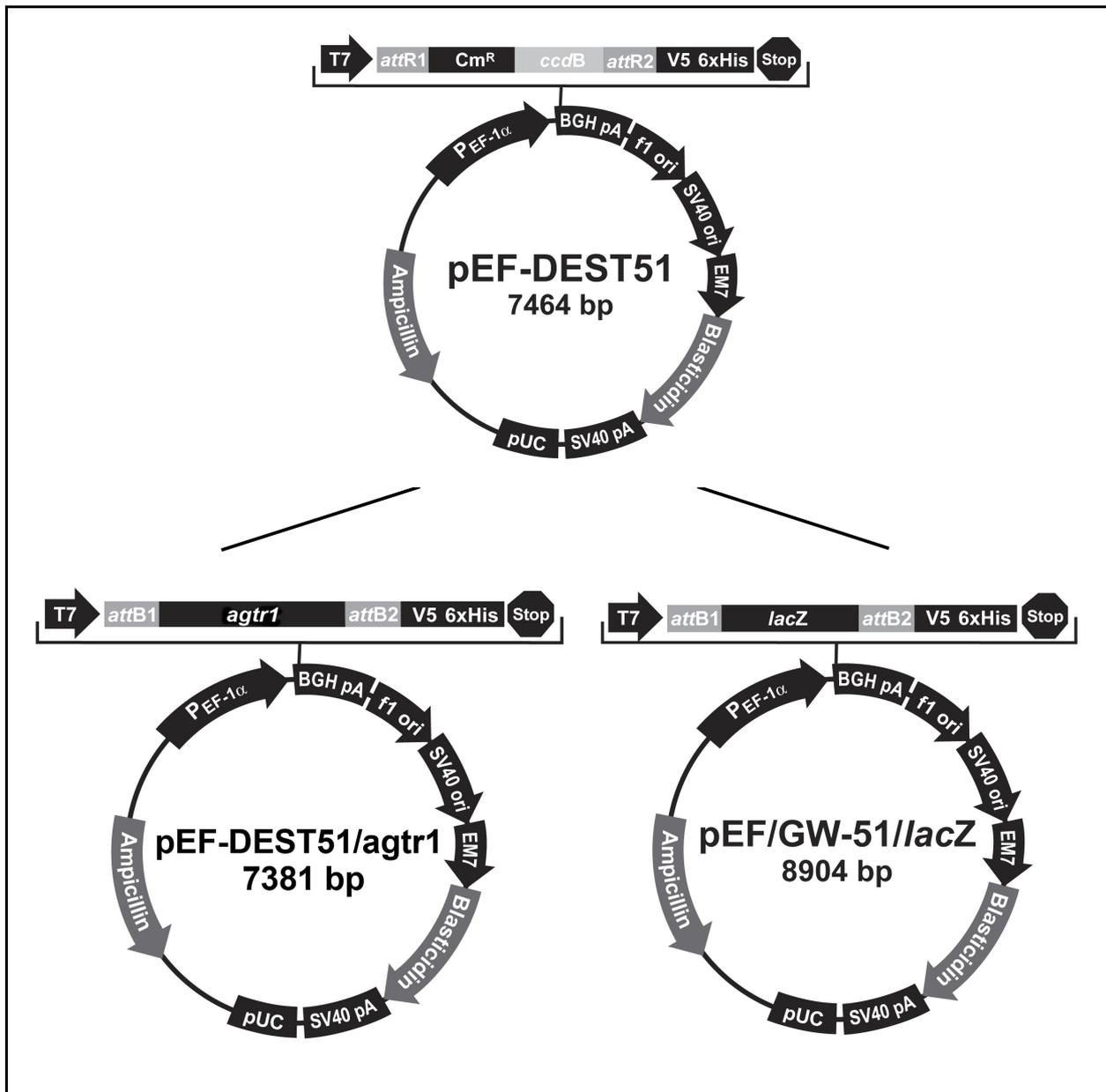


#### 2.2.1.2 *pEF-Dest51/agtr1*

Der Vektor *pEF-Dest51/agtr1* ist ein kommerziell verfügbarer Expressionsvektor, der von der Firma RZPD bezogen wurde. In den Zielvektor *pEF-Dest51* wurde mittels der Gateway™ Technologie die Gensequenz des AT1R kloniert. Das Gateway-System nutzt das natürlich vorkommende Rekombinationssystem des Bakteriophagen  $\lambda$ . Durch Rekombination zwischen einem Eingangsvektor, der die gewünschte Gensequenz enthält, und dem Zielvektor mit einem geeigneten Promoter wird ein Expressionsplasmid erstellt. Dabei erfolgt der Austausch des für eukaryotische Zellen toxischen *ccdB*-Gens gegen die Gensequenz des AT1R. Der Einbau der Gensequenz erfolgte unter Verwendung eines Stoppcodons vor dem V5-Epitop.

#### 2.2.1.3 *pEF/GW-51/lacZ*

Der Vektor *pEF/GW-51/lacZ* wurde von der Firma Invitrogen bezogen und wie oben beschrieben nach dem Prinzip der Gateway™ Technologie mit Hilfe des Zielvektors *pEF-Dest51* durch Rekombination generiert. Der Vektor ist identisch zum Expressionsvektor *pEF-Dest51/agtr1* aufgebaut, enthält aber statt der AT1R-Gensequenz die Information für das *lacZ*-Gen.



**Abb. 2.2: Darstellung des Vektorrückrads und der linearisierten MCS des Zielvektors pEF-DEST51 und der Expressionsvektoren pEF-DEST51/agtr1 bzw. pEF/GW-51/lacZ** Im Vektorrückrad befinden sich das Ampicillinresistenzgen zur prokaryotischen Selektion und das Blastidicinresistenzgen zur eukaryotischen Selektion. Eine gute Expression des Blastidicinresistenzgens gewährleisten SV40-Promotor, EM7-Promotor und SV40-Polyadenylierungssignal. Der prokaryotische Replikationsursprung (pUC) erlaubt eine effiziente Klonierung in *E.coli*. Der EF-1α-Promotor und das Polyadenylierungssignal (BGH pA) bewirken die Expression des insertierten Gens. In der MCS liegt der T7-Promotor, an der die T7-Polymerase angreift, und die c-terminale Markierung mit dem V5-Epitop und dem Polyhistidinpatch (6xHis). Der pEF-Dest51 Vektor besitzt zusätzlich attR1 bzw. attR2 Rekombinationsstellen für die rekombinante Klonierung des Zielgens mit einem Eingangsklon sowie das Chloramphenicolresistenzgen (Cm<sup>R</sup>) und das ccdB-Gen zur Selektion dieser Klone.

## 2.2.2 Plasmidvervielfältigung und -aufreinigung

### 2.2.2.1 Kultivierung und Gefrierlagerung von Bakterien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren enthalten ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion der Bakterien, die das Plasmid enthalten. 5 ml eines ampicillinhaltigen LB-Mediums (100 µg/µl) wurden mit einer Einzelkolonie frisch transformierter Zellen (*E.coli* JM109) bzw. mit kommerziell erhältlichen, schon transformierten Zellen (*E.coli* DH10B) beimpft und über Nacht bei 37°C und 200 Umdrehungen pro Minute (U/Min.) im Schüttler inkubiert.

Zur Anlegung von Dauerkulturen wurden 300 µl Glycerin und 700 µl einer Übernachtskultur steril in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80°C gelagert.

### 2.2.2.2 Transformation kompetenter Zellen

Zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA wurden die entsprechenden, kommerziell in aufgereinigter Form erhältlichen Plasmide in kompetente *E.coli* des Stammes JM109 transformiert. Die Transformation erfolgte nach Standardmethoden unter semisterilen Bedingungen. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt.

Zunächst wurden die bei -80°C gelagerten Bakterien auf Eis aufgetaut. Pro Ansatz wurden 100 µl kompetente Zellen mit 50 ng Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und für 10 Min. auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 45-50 Sek., wodurch die Zellwand kurzzeitig für DNA durchlässig wird. Nach einer 2-minütigen Inkubation auf Eis wurde jedem Ansatz 900 µl 4°C kaltes LB-Medium zugesetzt und dieser 60 Min. bei 37°C und 220 U/Min. auf dem Schüttler inkubiert.

100 µl des Ansatzes wurden auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte ausgestrichen und 12 bis 14 Std. bei 37°C inkubiert. Nach einer erfolgreichen Transformation konnten auf den Selektionsplatten einzelne Bakterienkolonien beobachtet werden.

### 2.2.2.3 Herstellung von LB-Flüssigmedium

20 g LB-Broth wurden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst und mit NaOH auf einen pH von 7,2 eingestellt. Anschließend wurde das LB-Flüssigmedium für 15 Min. im Autoklaven sterilisiert.

### 2.2.2.4 Herstellung von Ampicillin-LB-Agarplatten

32 g LB-Top Agar wurden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst und mit NaOH auf einen pH von 7,0 eingestellt. Anschließend wurde der Ansatz im Autoklaven für 15 Min.

sterilisiert. Dem auf 60°C abgekühlten Medium wurden 100 µg/ml Ampicillin hinzugefügt. Anschließend wurde unter sterilen Bedingungen der flüssige Ampicillin-Agar in Zellkulturschalen (100x200 mm) gegossen. Die Agar-Platten härteten über Nacht aus und wurden bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

#### 2.2.2.5 Mini-Plasmidpräparation

Die Aufreinigung der Plasmide aus *E.coli* erfolgte mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Das Kit beruht auf einer alkalischen Lyse der Zellen und anschließender Adsorption der Plasmid-DNA an eine Kieselgelmembran spezieller Säulen.

3 ml einer Übernachtskultur *E. coli* wurden für 5 Min. bei 10000 U/Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl A1 Puffer resuspendiert, vorsichtig mit 250 µl A2 Puffer gemischt und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 300 µl A3 Puffer hinzupipettiert. Das so gewonnene Zelllysat wurde bei 4°C für 10 Min. bei 10000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine NucleoSpin® Plasmid Säule geladen und für 1 Min. bei 10000 U/Min. zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend mit 500 µl vorgewärmten (50°C) AW Puffer und 600 µl A4 Puffer gewaschen. Nachdem die Säule für 2 Min. getrocknet wurde, erfolgte die Eluierung der Plasmid-DNA mit 50 µl AE Puffer. Die Konzentration des Eluats wurde spektralphotometrisch gemessen und die Qualität der Plasmid-DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Die aufgereinigten Plasmide wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.3 Plasmidlinearisierung

Die Plasmidlinearisierung erfolgte mit Restriktionsenzymen, die genau eine Schnittstelle im Vektor aufweisen. Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert.

#### 2.2.3.1 Testrestriktion

Für die Plasmidlinearisierung wurden vorab verschiedene Restriktionsenzyme (*AatII*, *BspDI*, *BspQI*, *FspI*, *SapI*) in unterschiedlichen Konzentrationen ausgetestet und die optimalen Inkubationszeiten ermittelt. 1 µg aufgereinigtes Plasmid wurden mit 5-10 µl 10x NEBuffer 4 und 10-50 Units Enzym auf ein Endvolumen von 50 µl mit Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde 1-16 Std. bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch eine 20-minütige Inkubation bei 65°C gestoppt. Die vollständige Restriktion wurde auf einem Agarose-Elektrophoresegel kontrolliert.

### 2.2.3.2 Präparative Restriktion

Entsprechend den optimierten Reaktionsbedingungen wurden für präparative Zwecke 30 µg aufgereinigtes Plasmid mit 10 µl 10x NEBuffer 4 und 40 Units Enzym gemischt. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt und für 1 Std. bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Durch eine Inkubation für 20 Min. bei 65°C wurde die Reaktion gestoppt. Die vollständige Linearisierung des Plasmids wurde gelelektrophoretisch kontrolliert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des Plasmids aus dem Restriktionsansatz mittels des NucleoSpin® Extract II Kit.

### 2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wurde durch eine spektralphotometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Es wurden 2,5 µl Probe mit 97,5 µl Wasser gemischt und in eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm überführt. Die Messung erfolgte gegen einen Leerwert von destilliertem Wasser.

Die Konzentration konnte nach folgenden Formeln berechnet werden:

$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD } 260\text{nm} \times 40 \text{ (molarer Extinktionskoeffizient von RNA)} \times \text{Verdünnungsfaktor}$
$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD } 260\text{nm} \times 50 \text{ (molarer Extinktionskoeffizient von DNA)} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der DNA-Präparation wurde der Quotient aus der Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) gebildet.

### 2.2.5 Aufreinigung von DNA

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach einer PCR oder nach einer Restriktion von Plasmiden wurde das NucleoSpin® Extract II Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei werden die Enzyme, Primer und Puffer entfernt und die DNA in Elutionspuffer aufgenommen.

Den Proben wurde das doppelte Volumen NT-Puffer zugeben und der Ansatz auf eine NucleoSpin® Extract II Säule gegeben. Nach Zentrifugation für 1 Min. bei 10000 U/Min. wurde die Säule mit 600 µl NT3-Puffer gewaschen. Nach einer 2-minütigen Trocknung der Säule konnte die gereinigte DNA in 50 µl Elutionslösung eluiert und die Konzentration spektralphotometrisch gemessen werden.

### 2.2.6 Agarosegel-Elektrophorese

Je nach Größe der erwarteten DNA- oder RNA-Fragmente wurden 1-1,5% Gele verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid beigefügt, um die Fragmente später mittels UV-Licht sichtbar zu machen. Die leicht abgekühlte Agaroselösung wurde in vorbereitete Kammern gegossen. Nach dem Aushärten der Gele wurde eine Elektrophoresekammer mit 0,5x TAE-Puffer gefüllt und die Proben, versetzt mit 5x Probenpuffer, aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V/cm für 30 Min. Die Größe der Fragmente konnte anhand eines mitlaufenden Größenmarkers bestimmt werden. Die Gele wurden mit einem computergestützten Aufnahmegerät dokumentiert.

### 2.2.7 RNA-Isolation

Die gesamte RNA wurde mittels des *mirVana*<sup>TM</sup> miRNA Isolation Kit nach Angaben des Herstellerprotokolls aus den Zellen isoliert. Das Kit beruht auf einer Phenol-Chloroform-Extraktion zur Entfernung der meisten zellulären Komponenten, einschließlich DNA, mit anschließender Aufreinigung der RNA über spezielle Glasfiber-Filter.

Von den auf einer Zellkulturplatte gewachsenen Zellen wurde der Überstand entfernt und diese 3-mal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen direkt auf den Zellkulturplatten mit 600-900 µl Lysis/Bindungs-Puffer lysiert. Das Lysat wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit einem entsprechenden Volumen „miRNA Homogenate Additive“ gemischt. Anschließend wurde der Mix für 10 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden 600-900 µl Phenol-Chloroform hinzugefügt, das Gemisch für 30-60 Sek. gevortext und bei Raumtemperatur für 5 Min. bei 10000 U/Min. zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase mit der RNA vorsichtig abpipettiert und mit 1,25-fachem Volumen 100% Ethanol gemischt. Der Lysat-Ethanol-Mix wurde auf eine spezielle Filtereinheit gegeben und bei Raumtemperatur für 15 Sek. bei 10000 U/Min. zentrifugiert. Nachdem der Filter 3-mal mit Waschlösungen gereinigt wurde, konnte die RNA mit 100 µl 95°C vorgewärmtem Elutionspuffer gewonnen werden. Die Konzentration der RNA wurde spektralphotometrisch gemessen und die Reinheit der RNA gelelektrophoretisch kontrolliert. Die RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

### 2.2.8 DNase-Verdau und cDNA-Synthese

Für den DNase-Verdau wurde das Deoxyribonuklease-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden 1 µg RNA in 8 µl Wasser aufgenommen, mit 1 µl 10x Reaktionspuffer sowie 1 µl Deoxyribonuklease (1 Unit/µl) gemischt und für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 µl Stopplösung bei 70°C für 5 Min. inaktiviert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis schloss sich die cDNA-Synthese an.

Für die cDNA-Synthese wurde der Omniscript Reverse Transcriptase Kit und Oligo-dT Primer nach Angaben des Herstellerprotokolls verwendet.

Es wurden pro 1 µg RNA 10 µl eines cDNASynthese-Mastermix hinzupipettiert. Dieser bestand aus: 2,5 µl 10x Reverse Transkriptase Puffer, 2,5 µl dNTPs (5 mM), 0,3125 µl Oligo-dTs (10 µM), 0,3125 µl RTase-Inhibitor (10 Units/µl), 1,25 µl RTase (4 Units/µl) und 3,125 µl Wasser.

Der Ansatz wurde mit deionisiertem Wasser auf ein Endvolumen von 25 µl aufgefüllt und 1 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion bei 93°C für 5 Min. gestoppt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die jeweiligen Anforderungen kamen in dieser Arbeit verschiedene speziell modifizierte PCR-Methoden zur Anwendung. Die verwendeten Primer (Tabelle 2.1) wurden von der Firma BioTeZ bezogen und mit deionisiertem Wasser auf eine Konzentration von 50 µM eingestellt. Die Stocklösung wurde aliquottiert und bei -20°C gelagert. Je nach Gebrauch wurden durch eine 1:5 Verdünnung mit Wasser Nutzlösungen mit einer Konzentration von 10 µM hergestellt.

#### 2.2.9.1 Semiquantitative RT-PCR

Für die Amplifizierung wurde das Taq PCR Core Kit nach Herstellerangaben verwendet. Im Allgemeinen wurden PCRs zu analytischen Zwecken im 20 µl Ansatz durchgeführt. 2 µl 1x CoralLoad PCR Puffer (inkl. 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,4 µl dNTP-Mix (10 mM), 0,6-1 µl Primer vorwärts (10 µM), 0,6-1 µl Primer rückwärts (10 µM), 0,1 µl Taq DNA-Polymerase (5 Units/µl), 2 µl cDNA-Template und Wasser wurden gemischt und im Thermocycler inkubiert. Folgendes PCR-Programm wurde standardmäßig verwendet: Initialdenaturierung bei 94°C für 3 Min., 30-40 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 60 Sek., Annealing bei 58-60°C für 30-45 Sek. und Extension bei 72°C für 60 Sek. Die PCR wurde in einer abschließenden Elongation von 10 Min. bei 72°C beendet.

und das Reaktionsgemisch auf 4°C gekühlt. Anschließend wurden die PCR-Produkte in einer Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Die Amplifizierung des Housekeeping-Gens  $\beta$ -Aktin wurde als Kontrolle für eine normale Expression verwendet. Die für die PCR-Produkte spezifischen Primer-Konzentrationen sowie Annealingzeiten und -temperaturen sind aus Tabelle 2.2 ersichtlich.

### 2.2.9.2 *Nested PCR*

Zunächst wurde eine konventionelle RT-PCR in einem 50  $\mu$ l Ansatz durchgeführt. Dafür wurden 5  $\mu$ l 1x CoralLoad PCR Puffer (inkl. 15 mM  $MgCl_2$ ), 1  $\mu$ l dNTP-Mix (10 mM), 1,5  $\mu$ l Primer vorwärts (10  $\mu$ M), 1,5  $\mu$ l Primer rückwärts (10  $\mu$ M), 0,25  $\mu$ l Taq DNA-Polymerase (5 Units/ $\mu$ l), 5  $\mu$ l cDNA-Template und Wasser gemischt und wie unter 2.2.9.1 beschrieben im Thermocycler inkubiert. Danach erfolgte die Isolierung des PCR-Produktes mittels NucleoSpin® Extract II Kit wie unter 2.2.5 beschrieben, um mögliche Interaktionen (Dimerbildungen) zwischen den Reagenzien und Primern der ersten Reaktion zu vermeiden. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde 1:80 mit deionisiertem Wasser verdünnt und in einer zweiten PCR mittels nested-Primern (Tabelle 2.2) wie unter 2.2.9.1 beschrieben, amplifiziert.

### 2.2.9.3 *Real-time quantitative RT-PCR-Analysen*

#### Etablierung der externen Standards für die real-time RT-PCR

Für die Analyse der PCR-Produkte  $\beta$ -Aktin, AT1R-nested und pEF wurden diese nach gelelektrophoretischer Trennung aus dem Gel unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mittels NucleoSpin® Extract II Kit wie unter 2.2.5 beschrieben aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA-Menge spektralphotometrisch bestimmt und die Kopienzahl der PCR-Produkte nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Kopienzahl [Kopien/\mu l]} = 6 \times 10^{23} [\text{Kopien/\mu l}] \times \text{DNA-Konzentration [g/\mu l]} / \text{MW [g/mol]}$$

MW (Molekulargewicht) = Anzahl der bp des PCR-Produktes x 660 daltons/bp

Serielle Verdünnungen (1:10) der aufgereinigten DNA wurden als externe Standards in jedem *real-time* PCR-Lauf verwendet, um eine Standardkurve zu erstellen, anhand derer die PCR-Produkte quantifiziert wurden.

### Real-time RT-PCR

Die *real-time* PCR wurde mit dem Light Cycler der Firma Roche durchgeführt. Für die Amplifikation wurde das QuantiTect SYBR® Green PCR Kit nach Herstellerangaben verwendet. Für eine *real-time* PCR wurde pro Reaktion ein Ansatz von 20 µl pipettiert, der 10 µl SYBR® Green Mastermix, je 1 µl der jeweils zu verwendenden Primer (Tabelle 2.2), 6 µl Wasser und 2 µl cDNA enthielt. Dieser Ansatz wurde in vorgekühlte Light Cycler Glaskapillaren überführt und für 10 Sek. zentrifugiert. Als interne Kontrolle wurde bei allen Durchläufen die Expression des Housekeeping-Gens  $\beta$ -Aktin ermittelt. Die *real-time* PCR startet mit einem 10-minütigen „Hot Start“ bei 95°C, dann folgen die für die einzelnen PCR-Produkte variierenden Amplifikationszyklen (Tabelle 2.3). Nach der Amplifikation wird eine Schmelzkurve erstellt indem ein Temperaturgradient von 95°C bis 65°C mit 0,1°C/Sek. gefahren wird. Anhand der Schmelzkurve kann die Reinheit und Identität der Produkte überprüft werden. Anschließend erfolgt eine Abkühlung des Reaktionsgemisches auf 40°C. Nur Proben ohne ersichtliche Artefakte wurden in die Auswertung mit einbezogen.

### Quantifizierung der PCR-Produkte

Die Menge der amplifizierten PCR-Produkte wird mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen des Doppelstrang-DNA sensitiven Farbstoffes SYBR-Green-I in der Elongationsphase am Ende jeden Amplifikationszyklusses bestimmt. Die Fluoreszenzintensität nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Zur Charakterisierung der PCR-Produkte wurden zuvor in Schmelzkurvenanalysen die unterschiedlichen Schmelzpunkte der PCR-Produkte bestimmt. Die Quantifizierung basierte auf der Bestimmung des CT-Wertes (Treshhold-Cycle) bzw. Cp-Wertes (Crossing Point) für jedes PCR-Produkt. Dieser beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Durch Vergleiche der CT-Werte mit denen der im gleichen Lauf parallel amplifizierten DNA-Standards (serielle Verdünnung des gleichen PCR-Produktes) wurde die mRNA-Kopienzahl beruhend auf der „Second Derivative Maximum“ Berechnungsmethode mittels der Light Cycler 3.5 Software bestimmt. Auf gleiche Weise wurden die Expressionslevel des Housekeeping-Gens  $\beta$ -Aktin ermittelt und verwendet, um den cDNA-Gehalt gegen Variationen in der Ausgangsmenge oder Integrität der eingesetzten RNA zu normalisieren.

**Tabelle 2.1: Primerdetails**

Produktbezeichnung		Primersequenz	Produktgröße (bp)
β-Aktin	vorwärts	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	250
	rückwärts	CTCCTTAATGTCACGCACGAT	
AT1R	vorwärts	CTGCAATTCTACAGTCACGTATG	416
	rückwärts	GGGCTTGTGAACATCTCTGG	
AT1R-nested	vorwärts	GGCCAGTTTGCCAGCTATAA	293
	rückwärts	GGGGAATCCAGGAAAAGAAA	
pEF	vorwärts	ACATTAATTGCGTTGCGCTCACT	226
	rückwärts	CTGCGTTATCCCCTGATTCTGTG	

**Tabelle 2.2: RT-PCR-Bedingungen**

Primer	Konzentration	Annealingtemperatur	Annealingzeit	Zyklen
β-Aktin	0,5 µM	60,0°C	30 Sek.	35
AT1R	0,3 µM	60,0°C	45 Sek.	40
AT1R-nested	0,3 µM	58,8°C	45 Sek.	40
pEF	0,3 µM	58,0°C	30 Sek.	40

**Tabelle 2.3: Real-time PCR-Bedingungen**

Primer	Denaturierung	Annealing	Extension	Zyklen
β-Aktin	95°C – 15 Sek.	61°C – 15 Sek.	72°C – 20 Sek.	40
AT1R-nested	95°C – 15 Sek.	62°C – 25 Sek.	72°C – 30 Sek.	50
pEF	95°C – 15 Sek.	59°C – 25 Sek.	72°C – 30 Sek.	50

## **2.3 Zellbiologische Methoden**

### **2.3.1 Kultivierung adhärent wachsender Zellen**

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Zellkulturbank. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 96% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zelllinie MKN28 wurde in RPMI 1640/10% FCS kultiviert. Stabil transfizierte Zellen wurden durch Zugabe von 1 mg/ml Blasticidin von Invitrogen zum Zellkulturmedium unter einem ständigen Selektionsdruck gehalten. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Bei Erreichen einer Konfluenz von über 90-95% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen 3-mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 Min. mit Trypsin-EDTA im Brutschrank inkubiert, um die Zellen von der Unterlage abzulösen. Die Reaktion wurde mit Zellkulturmedium gestoppt und die Zellsuspension 5 Min. bei Raumtemperatur und 800 U/Min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen je nach Verwendungszweck im Verhältnis 1:100 bis 1:1000 in neue Zellkulturgefäße ausgesät. Wurden für bestimmte Zellkulturexperimente exakte Zellzahlen benötigt, so wurden 500 µl der Zellsuspension entnommen und in einer Küvette mit 9,5 ml isotoner Messlösung gemischt. Anschließend erfolgte die Zellzählung mit einem Coulter Counter.

### **2.3.2 Herstellung von Zellkonserven**

Zur dauerhaften Lagerung wurden von den Zellen Dauerkulturen angelegt, die tiefgefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut und kultiviert werden konnten.

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie unter 2.3.1 beschrieben geerntet und gezählt. Anschließend wurde eine Zellsuspension von 10<sup>6</sup> Zellen/ml erstellt und mit 100 µl/ml DMSO gemischt. 1 ml Portionen dieser Lösung wurden in Kryoröhrchen pipettiert und über Nacht in einer Styroporbox langsam eingefroren. Anschließend konnten die Zellen bei -80°C gelagert werden.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde tropfenweise in frisches Zellkulturmedium gegeben und zur Kultivierung ausgesät. Nach Absetzen der Zellen erfolgte ein Mediumwechsel, um das DMSO zu entfernen.

### 2.3.3 Transfektion von Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen. In dieser Arbeit wurde die Transfektionsmethode mit Lipofectamin™ 2000 von Invitrogen angewendet, die auf dem Prinzip der Lipofektion beruht.

#### 2.3.3.1 *Transiente Transfektion*

$4,5 \times 10^5$  Zellen wurden pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät und 24 Std. inkubiert, so dass am Transfektionstag eine Zelldichte von 90-95% erreicht wurde. Für die Herstellung des Plasmid-Transfektionsreagenz-Mixes wurden 4 µg Plasmid in 250 µl serumfreiem Medium gemischt. In einem separaten Reaktionsgefäß wurden 10 µl Lipofectamin™ 2000 in 250 µl serumfreiem Medium gemischt und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Plasmidlösung zur Transfektionsreagenzlösung gegeben und der Ansatz 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Plasmid-Lipid-Mix zu den Zellen in der 6-Well-Platte gegeben, die Platte kurz geschwenkt und im Brutschrank für 5 Std. inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 48 Std. Inkubation wurde die erfolgreiche Transfektion mittels RT-PCR (siehe 2.2.9.1) kontrolliert.

Alle nachfolgenden Transfektionsversuche wurden entsprechend den optimierten Bedingungen nach dem oben beschriebenen Prozedere durchgeführt.

#### 2.3.3.2 *Optimierung des Plasmid-Transfektionsreagenz-Verhältnisses*

Zur Optimierung der Transfektionsbedingungen erfolgte eine transiente Transfektion des Reporterplasmids pEGFP-N1 in die Zelllinie MKN28. Bei der Transfektion wurde analog zu 2.2.3.1 vorgegangen. Da die Optimierung in 24-Well-Platten erfolgte, wurden  $10^5$  Zellen pro Well ausgesät. Für die Austestung wurde eine Transfektionsmatrix mit verschiedenen Verhältnissen von Plasmid zu Transfektionsreagenz erstellt. Dafür wurde in Reaktionsgefäßen 50 µl serumfreies Medium mit 0,2-1,2 µg Plasmid sowie 50 µl serumfreies Medium mit 1-3,5 µl Lipofectamin™ 2000 gemischt. In einer entsprechend der 24-Well-Platte beschrifteten 96-Well-Platte wurde die Plasmidlösung mit der Transfektionsreagenzlösung gemischt und wie unter 2.3.3.1 beschrieben weiterverarbeitet. Nach 48 Std. Inkubation erfolgte die Auswertung der transienten Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dazu wurde das Medium von den Platten abgezogen und die Zellen mit 5% Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

### 2.3.3.3 *Bestimmung der Blastocidin-Toleranzdosis*

MKN28 Zellen wurden in einer Konzentration von  $10^4$  Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät und 24 Std. im Brutschrank inkubiert, so dass die Zellen eine 20-25% Konfluenz aufwiesen. Das Antibiotikum wurde in deionisiertem Wasser gelöst (10 mg/ml) und steril filtriert. Anschließend wurden Konzentrationen zwischen 0-5 µg/ml zum Wachstumsmedium zugegeben. Alle 2 Tage erfolgte ein Mediumwechsel oder eine Auswertung mittels MTT-Assay (2.3.4.2). Für jede neue Charge Blastocidin wurde erneut eine Dosis-Wirkungskurve ermittelt.

### 2.3.3.4 *Stabile Transfektion*

Entsprechend den optimierten Transfektionsbedingungen erfolgte die stabile Transfektion der einzelnen Plasmide mit Lipofectamin™ 2000 in MKN28 Zellen. Die stabile Transfektion erfolgte in 6-Well-Platten, wobei  $4,5 \times 10^5$  Zellen pro Well eingesetzt wurden. Pro Strukturgen diente ein Well als Negativkontrolle (nur Transfektionsreagenz). Bei der Transfektion wurde analog zu 2.3.3.1 vorgegangen. 24 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und im Verhältnis 1:15 auf 10-cm-Zellkulturschalen überführt. Nach weiteren 24 Std. erfolgte die Selektion transfizierter Zellen durch Zugabe von 3 µg/ml Blastocidin zum Wachstumsmedium. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt, bis einzelne Zellkolonien auf dem Schalenboden herangewachsen waren. Nun konnten mittels limitierender Verdünnung Einzelzellklone gewonnen werden. Dazu wurden die Zellen geerntet und auf einer 96-Well-Platte so stark verdünnt, dass theoretisch 0,5 Zellen pro Well ausgesät wurden. Nach 2 bis 3 Tagen wurden die Wells auf Zellkolonien überprüft, von denen angenommen wird, dass sie sich auf einzelne Zellen zurückführen lassen. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen nacheinander auf 24-Well- und 6-Well-Platten, danach auf 10-cm-Schalen und schließlich auf Flaschen transferiert. Der Selektionsdruck wurde bis zum Einfrieren der Zellen erhalten, wobei die Konzentration des Selektionsantibiotikums auf 1 µg/ml Blastocidin gesenkt wurde.

### 2.3.4 Proliferationsassays

Die Untersuchung der Proliferation der Zelllinie MKN28 erfolgte mit Hilfe des MTT-Assays, des Thymidin- und Leucinassays sowie durch Zellzählung. Alle Assays wurden in 24-Well-Platten durchgeführt, wobei pro Well  $2,5 \times 10^4$  Zellen ausgesät wurden. Nach 24 Std. Inkubation wurde das Medium durch serumfreies Medium ersetzt und die Zellen für weitere 24 Std. inkubiert, um diese in ihrem Wachstum zu synchronisieren. Die Auswertung erfolgte 24 und 48 Std. nach erneuter Zugabe von FCS-haltigem Medium.

#### 2.3.4.1 Zellzählung

Das Medium wurde von den Zellen abgezogen und die Zellen 1 Min. mit 500  $\mu$ l Trypsin-EDTA benetzt. Anschließend wurden die Zellen für 5 Min. in 500  $\mu$ l PBS bei 37°C inkubiert und danach in eine Küvette mit 9,5 ml isotoner Messlösung überführt. Mit einem Coulter Counter wurde die Zellzahl ermittelt.

#### 2.3.4.2 MTT-Assay

In Abhängigkeit von den verwendeten Multiwellplatten wurden den Zellen 10  $\mu$ l (96-Well-Platte) oder 50  $\mu$ l (24-Well-Platte) MTT-Reagenz (5mg/ml) zugegeben. Nach 4 Std. Inkubation bei 37°C wurde der Überstand abpipettiert und die Zellen mit 100  $\mu$ l oder 500  $\mu$ l DMSO für 15 Min. auf einem Schüttler lysiert. Die Extinktion konnte anschließend bei einer Wellenlänge von 492 nm am Photometer gemessen werden.

#### 2.3.4.3 $^3\text{H}$ -Thymidinassay / $^3\text{H}$ -Leucinassay

Während der letzten 6 Std. des Assays wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l  $^3\text{H}$ -Thymidin bzw.  $^3\text{H}$ -Leucin (je 1 mCi/ml) pro Well stimuliert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen einmal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Die Platten konnten nun bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert werden.

Zur Messung des Thymidin- bzw. Leucineinbaus in die Zellen wurden diese mit 4°C kalter 5% TCA für 30 Min. bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit 4°C kaltem PBS gewaschen, um nicht eingebautes Thymidin bzw. Leucin zu entfernen. Die Zellen wurden mit 0,5 M NaOH-Lösung lysiert und das Lysat mit 3 ml Scintillationscocktail gemischt. Der Gehalt an  $^3\text{H}$ -Thymidin bzw.  $^3\text{H}$ -Leucin wurde mit einem  $\beta$ -Counter gemessen.

### 2.3.5 Matrigel-Invasionsassay

Die Transwelleinsätze mit Polykarbonatmembranen (Porengröße 8,0  $\mu\text{m}$ , 0,33  $\text{cm}^2/\text{Well}$ ) wurden in 24-Well-Platten platziert, mit 300  $\mu\text{l}$  verdünntem Matrigel (7,4  $\text{mg}/\text{ml}$  in Zellkulturmedium) beschichtet und für 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absetzen des Matrigels wurde der Überstand abgezogen und 300  $\mu\text{l}$  einer Zellsuspension ( $10^5$  Zellen/ml) in die obere Kammer ausgesät. Die untere Kammer wurde mit 500  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium befüllt. Parallel wurde als Kontrolle eine 48-Well-Platte, die von der Wachstumsoberfläche den Transwelleinsätzen entspricht, mit der identischen Zellzahl beimpft. Die Auswertung erfolgte nach 24 und 48 Std. Inkubation. Dazu wurde das Medium aus den Kammern entfernt und die Zellen an der Unterseite der Membran mit Trypsin-EDTA für 1 Min. benetzt. Anschließend konnten die Zellen mit 500  $\mu\text{l}$  PBS geerntet und die Zellzahl mit einem Coulter Counter ermittelt werden. Die Anzahl der Zellen auf der 48-Well-Platte wurde wie in Kapitel 2.3.4.1 beschrieben bestimmt.

### 2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel oder SPSS für Windows, Version 4.0. Die Werte sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) oder als Medianwert und Interquartilsabstand angegeben. Des Weiteren wurde als Maß für die Intra-Assay- und Inter-Assay-Variabilität der Variabilitätskoeffizient (VK) wie folgt ermittelt:

$$\text{VK} = \text{SD} / \text{arithmetischer Mittelwert} \times 100$$

Die statistische Signifikanz der Versuche wurde für interindividuelle Vergleiche mit der einfachen Varianzanalyse (ANOVA) und für intraindividuelle Vergleiche mit dem zweiseitigen t-Test für verbundene Stichproben geprüft. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von  $p < 0,05$  für Signifikanz und ein Wert von  $p < 0,01$  für eine hohe Signifikanz festgelegt.

### 3 Ergebnisse und Diskussion I: Stabiler Gentransfer

Diese Arbeit wurde in zwei Abschnitte gegliedert. Im ersten Teil erfolgte die stabile Transfektion der humanen Magenkarzinomzelllinie MKN28 mit einem Expressionsvektor, der für den AT1R codiert (Kapitel 3). Anschließend wurden im zweiten Teil einige der AT1R überexprimierenden Zellen in Zellkulturexperimenten auf ihre Wachstumseigenschaften hin untersucht (Kapitel 4).

Der Schwerpunkt dieses Kapitels liegt auf der Darstellung der einzelnen Schritte zur Etablierung der stabil transfizierten Zellen. Zunächst wurden geeignete Expressionsvektoren hergestellt. Anschließend musste in Vorversuchen eine Transfektionsmethode optimiert werden, die eine stabile Transfektion der MKN28 Zellen mit einer ausreichenden Effizienz ermöglicht. Danach wurde geprüft, ob sich die Zellen mit den ausgewählten Vektoren transfizieren lassen. Abschließend erfolgte die Gewinnung und Isolierung stabil transfizierter AT1R überexprimierender Zellklone, deren Wachstumseigenschaften anschließend im zweiten Teil der Arbeit untersucht wurden.

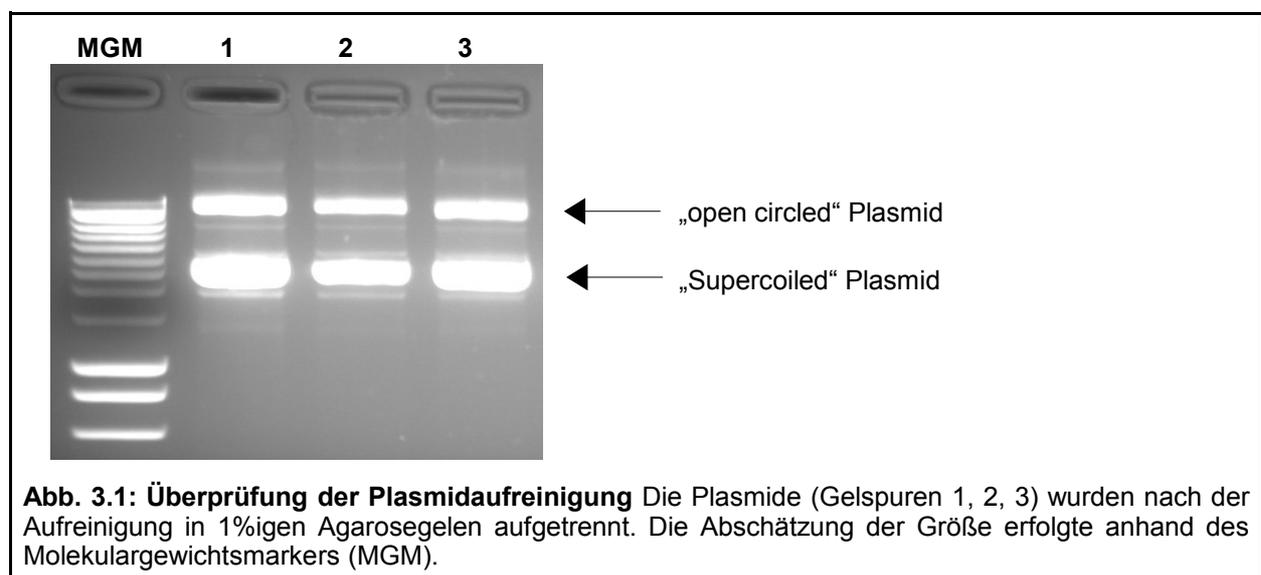
#### 3.1 Ergebnisse

##### 3.1.1 Plasmidherstellung

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Expressionsvektors pEF-DEST51/agtr1 der AT1R in der Magenkarzinomzelllinie MKN28 stabil zur Expression gebracht. Dieses Plasmid ist kommerziell verfügbar und wurde von der Firma RZPD bezogen. Um mögliche Effekte auf das Verhalten der Zellen durch die Transfektion des reinen Vektors an sich auszuschließen, wurden zusätzlich MKN28 Zellen als Negativkontrolle mit einem Vektor stabil transfiziert, der bis auf die Gensequenz des AT1R alle Elemente des Expressionsvektors enthält. In dieser Arbeit wird für die Negativkontrolle der Begriff „Mockvektor“ verwendet. Als Mockvektor diente das pEF/GW-51/lacZ-Plasmid von Invitrogen, das identisch zum verwendeten Expressionsvektor aufgebaut ist. Allerdings kodiert dieser Vektor für das Reporter-gen *lacZ*. Durch den Einsatz eines Restriktionsenzymes, das im Bereich der *lacZ*-Gensequenz schneidet, wurde das Gen unbrauchbar und das Plasmid konnte als Mockvektor verwendet werden.

### 3.1.1.1 Plasmidaufreinigung

Nach der Aufreinigung mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit wurde die Qualität der Plasmid-DNA gelelektrophoretisch kontrolliert (Abb. 3.1) und die Konzentration und Reinheit spektralphotometrisch bestimmt. Nach der Aufreinigung lag der Großteil der Plasmide als „supercoiled“ Plasmid vor. Die schwächere Bande außerhalb des Größenbereichs des Molekulargewichtsmarkers entspricht am ehesten der „open circled“ Form. Mit dieser Methode konnten 2-10 µg Plasmid-DNA gewonnen werden. Für die Transfektion wurden nur Proben verwendet, deren  $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$  war.



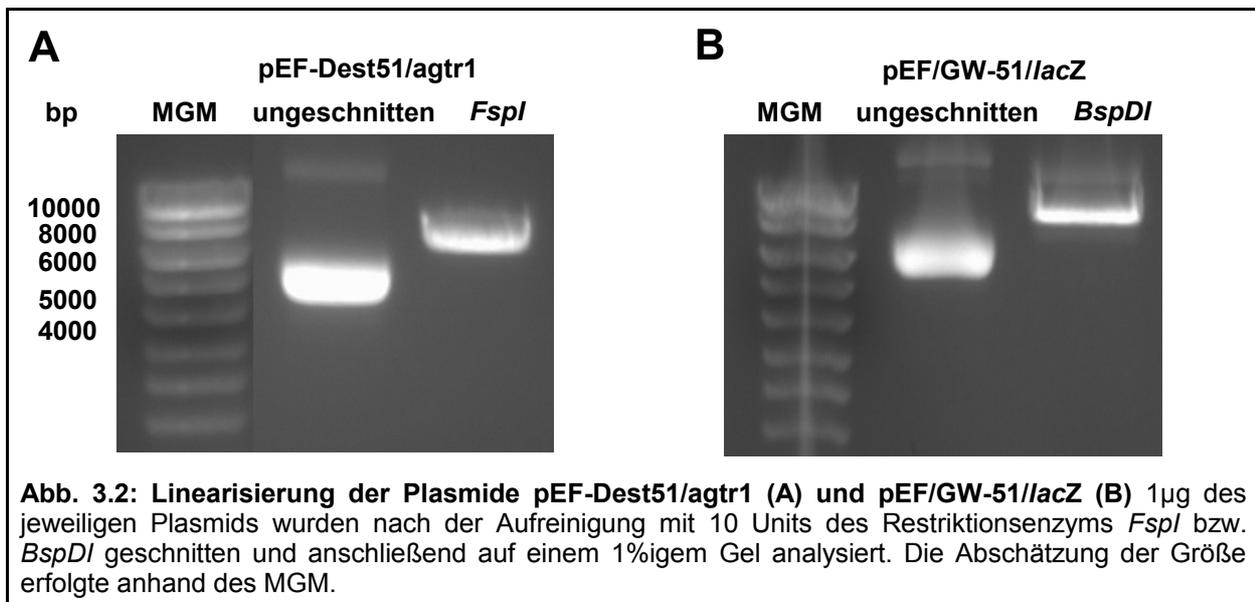
**Abb. 3.1: Überprüfung der Plasmidaufreinigung** Die Plasmide (Gelspuren 1, 2, 3) wurden nach der Aufreinigung in 1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Abschätzung der Größe erfolgte anhand des Molekulargewichtsmarkers (MGM).

### 3.1.1.2 Plasmidlinearisierung

Für die stabile Transfektion wurden alle Plasmide vorher mit Restriktionsendonukleasen linearisiert. Vor der Linearisierung größerer Mengen DNA für die Transfektionsversuche wurden ausgehend vom Herstellerprotokoll zunächst Testrestriktionen durchgeführt, um die optimalen Reaktionsbedingungen zu ermitteln. Dabei trat die Schwierigkeit auf, das Plasmid pEF-Dest51/agtr1 mit dem ausgewählten Restriktionsenzym (*SapI*) zu spalten. Weder durch die Erhöhung der Inkubationszeit von 1 Std. auf bis zu 16 Std. noch durch die Steigerung der Enzymmenge auf bis zu 20 Units/µg Plasmid konnte der Vektor linearisiert werden. Ein Kontrollverdau von Lambda-DNA zeigte die Intaktheit und vollständige Aktivität des Restriktionsenzym an. Die Inkubation des Plasmids mit anderen Restriktionsenzymen (*BspQI*, *AatII* und *FspI*) mit gleichen bzw. anderen Schnittstellen erbrachte ebenfalls keine Linearisierung. Erst nach Transformation und Vervielfältigung des Vektors pEF-Dest51/agtr1 in einen

anderen Bakterienstamm (*E.coli* JM109 von Promega) und anschließender Aufreinigung konnte die Linearisierung des Plasmids erzielt werden.

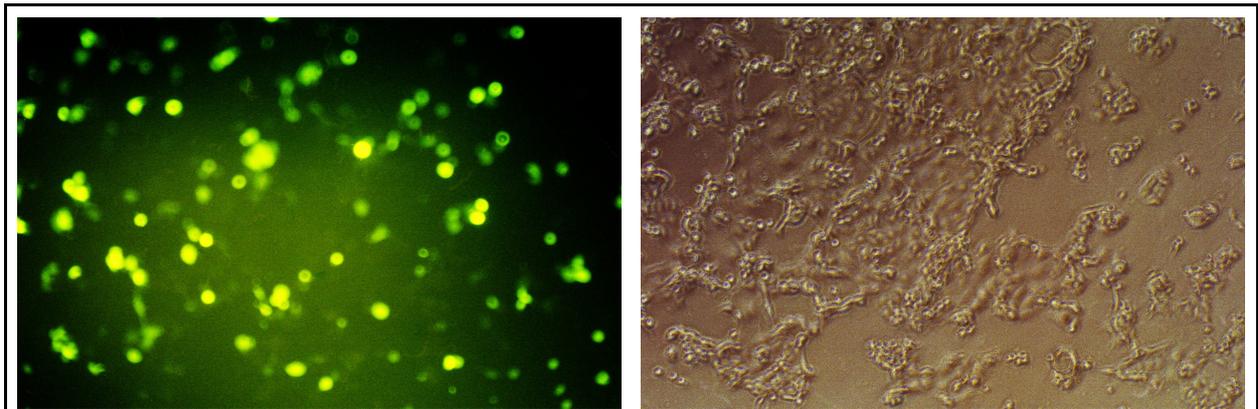
Für die präparative Linearisierung des pEF-Dest51/agtr1 Vektors diente das Restriktionsenzym *FspI*, das im Bereich des Ampicillinresistenzgens an der Stelle 6886 schneidet. Der linearisierte Vektor hat eine theoretische Länge von 7464 bp. Der Mockvektor wurde mit dem Restriktionsenzym *BspDI* linearisiert. Dieses Enzym schneidet im Bereich des *lacZ*-Gens an der Stelle 2588. Der linearisierte Vektor hat eine theoretische Länge von 8904 bp. Nach Inkubation der Plasmide mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen und gelelektrophoretischer Auftrennung der Ansätze entsprachen die Bandenhöhen für den pEF-Dest51/agtr1 Vektor und für den Mockvektor den Erwartungen (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Linearisierung der Plasmide pEF-Dest51/agtr1 (A) und pEF/GW-51/lacZ (B)** 1µg des jeweiligen Plasmids wurden nach der Aufreinigung mit 10 Units des Restriktionsenzym *FspI* bzw. *BspDI* geschnitten und anschließend auf einem 1%igem Gel analysiert. Die Abschätzung der Größe erfolgte anhand des MGM.

### 3.1.2 Optimierung der Transfektionsparameter

Um die Transfektionseffizienz zu erhöhen, wurde vor der stabilen Transfektion das optimale Plasmid-Transfektionsreagenz-Verhältnis für die Zelllinie MKN28 ermittelt. Dazu wurde das Plasmid pEGFP-N1 verwendet. Dieser Vektor enthält ein Reporterogen, das für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodiert, das eine optische Quantifizierung der Transfektionsrate und -effizienz erlaubt (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3: Transiente Transfektion des Reporterplasmids pEGFP-N1 in MKN28 Zellen** links: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (10-fache Vergrößerung); rechts: lichtmikroskopische Aufnahme (10-fache Vergrößerung) desselben Ausschnitts. Die Transfektionsrate wurde durch Auszählung der grün fluoreszierenden Zellen an der Gesamtzellzahl ermittelt.

Zunächst wurde eine Transfektionsmatrix mit verschiedenen Plasmid-Transfektionsreagenz-Verhältnissen erstellt (Tabelle 3.1). Nach PFA-Fixierung konnte die Matrix unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Dabei wurden pro Well 3 Gesichtsfelder ausgezählt und aus dem Anteil der grün fluoreszierenden Zellen zur Gesamtzellzahl die Transfektionsrate ermittelt.

Die in dieser Arbeit getesteten Plasmid-Lipid-Verhältnisse ergaben für die Zelllinie MKN28 Transfektionsraten zwischen 20 bis 25 % (Tabelle 3.1). Zwischen den untersuchten DNA-Lipid-Verhältnissen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Transfektionseffizienz. Für die nachfolgenden Transfektionsversuche wurden die im Herstellerprotokoll empfohlenen Konzentrationen verwendet. In Tabelle 3.2 sind die an die verschiedenen Zellkulturgefäße angepassten optimierten Transfektionsparameter zusammengefasst.

**Tabelle 3.1: Transfektionsmatrix mit den entsprechenden Transfektionsraten**

		Transfektionsraten (MW [%] ± SD)					
		Lipofectamin™ 2000 (µl)					
		1	1,5	2	2,5	3	3,5
DNA (µg)	0,2	22,77 % ± 6,42	24,43 % ± 4,48	24,03 % ± 4,34	21,22 % ± 3,8	20,21 % ± 3,62	20,02 % ± 4,5
	0,4	25,12 % ± 9,27	21,92 % ± 7,45	25,96 % ± 3,66	25,37 % ± 2,92	24,73 % ± 6,02	22,38 % ± 7,39
	0,8	24,21 % ± 4,94	25,15 % ± 7,72	24,48 % ± 7,85	25,85 % ± 6,48	25,18 % ± 3,75	23,45 % ± 8,34
	1,2	20,83 % ± 4,4	25,88 % ± 7,83	24,93 % ± 4,74	25,12 % ± 6,82	23,19 % ± 11,09	20,51 % ± 2,96

Aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten wurden wie im Text beschrieben die Transfektionsraten ermittelt und die Mittelwerte (MW) in % ± Standardabweichung (SD) bestimmt.

**Tabelle 3.2: Optimierte Transfektionsbedingungen**

Zellkulturgefäß	Ausgesäte Zellzahl	Plasmid	Lipofectamin™2000	Verdünnungsmedium
24-Well-Platte	1 x 10 <sup>5</sup>	0,8 µg	2,0 µl	2 x 50 µl
6-Well-Platte	4,5 x 10 <sup>5</sup>	4 µg	10 µl	2 x 250 µl

### 3.1.3 Transiente Expression des AT1R in MKN28 Zellen

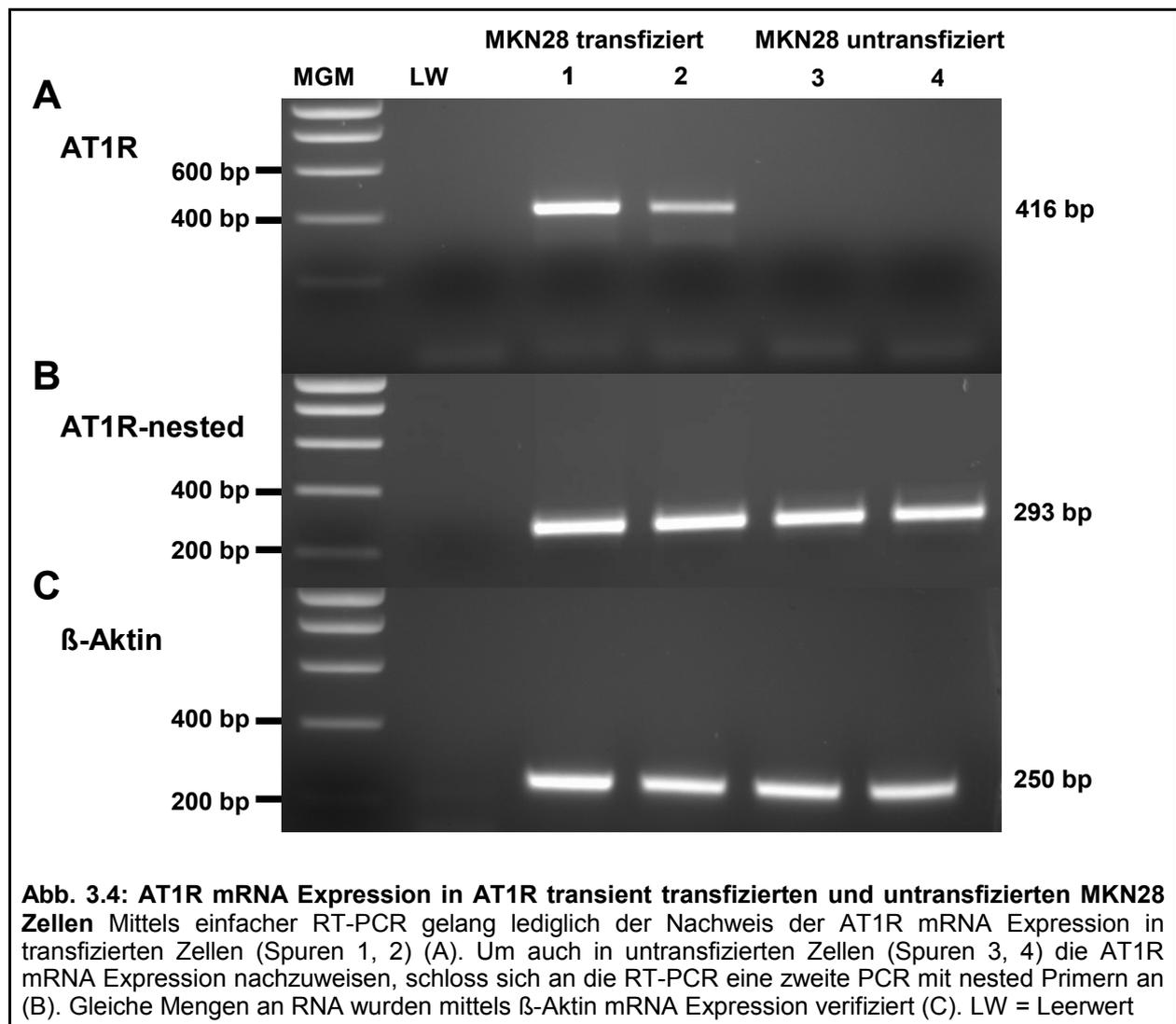
Vor der stabilen Transfektion der Zelllinie MKN28 mit dem pEF-DEST51/agtr1 Vektor wurde zunächst getestet, ob sich die Zelllinie mit diesem Plasmid transfizieren lässt. Dazu wurden die Zellen mit dem pEF-DEST51/agtr1 Vektor transient transfiziert.

24 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe der RT-PCR auf ihre AT1R mRNA Expression hin kontrolliert. Dazu wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Obwohl DNA-Kontaminationen bei der Aufreinigung mittels des *mirVana*™ miRNA Isolation Kit selten sind, wurden alle RNA-Proben einem DNase-Verdau unterzogen, um mögliche DNA-Spuren, die die RT-PCR verfälschen könnten, zu beseitigen. Als Primerpaar dienten AT1R-F und AT1R-R, die ein 416 bp großes Amplifikat erzeugen (Tabelle 2.1). Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA mitgeführt. Gleichzeitig wurde auch mRNA aus nicht transfizierten Zellen eingesetzt. Nur in den transfizierten Zellen konnte AT1R mRNA nachgewiesen werden (Abb. 3.4). Als Kontrolle für die gelungene RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurde eine β-Aktin

PCR durchgeführt. In allen Proben, in denen RNA eingesetzt wurde, konnte mit  $\beta$ -Aktin spezifischen Primern (Tabelle 2.1) ein 250 bp großes Produkt amplifiziert werden.

### 3.1.3.1 AT1R mRNA Expression in untransfizierten MKN28 Zellen

Für den Nachweis der AT1R mRNA in der Zelllinie MKN28 wurde eine nested PCR etabliert. Dabei schloss sich an die RT-PCR mit dem Primerpaar AT1R-F und AT1R-R eine zweite PCR an, bei der ein Primerpaar verwendet wurde, das innerhalb der ersten Zielsequenz liegt. Das Produkt der Primer AT1R-nested-F und AT1R-nested-R hat eine Größe von 293 bp (Tabelle 2.1). Die Negativkontrolle wurde ebenfalls ein zweites Mal amplifiziert. Mittels nested PCR konnte auch in den untransfizierten Zellen AT1R mRNA nachgewiesen werden (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4: AT1R mRNA Expression in AT1R transient transfizierten und untransfizierten MKN28 Zellen** Mittels einfacher RT-PCR gelang lediglich der Nachweis der AT1R mRNA Expression in transfizierten Zellen (Spuren 1, 2) (A). Um auch in untransfizierten Zellen (Spuren 3, 4) die AT1R mRNA Expression nachzuweisen, schloss sich an die RT-PCR eine zweite PCR mit nested Primern an (B). Gleiche Mengen an RNA wurden mittels  $\beta$ -Aktin mRNA Expression verifiziert (C). LW = Leerwert

### 3.1.4 Stabile Expression des AT1R in MKN28 Zellen

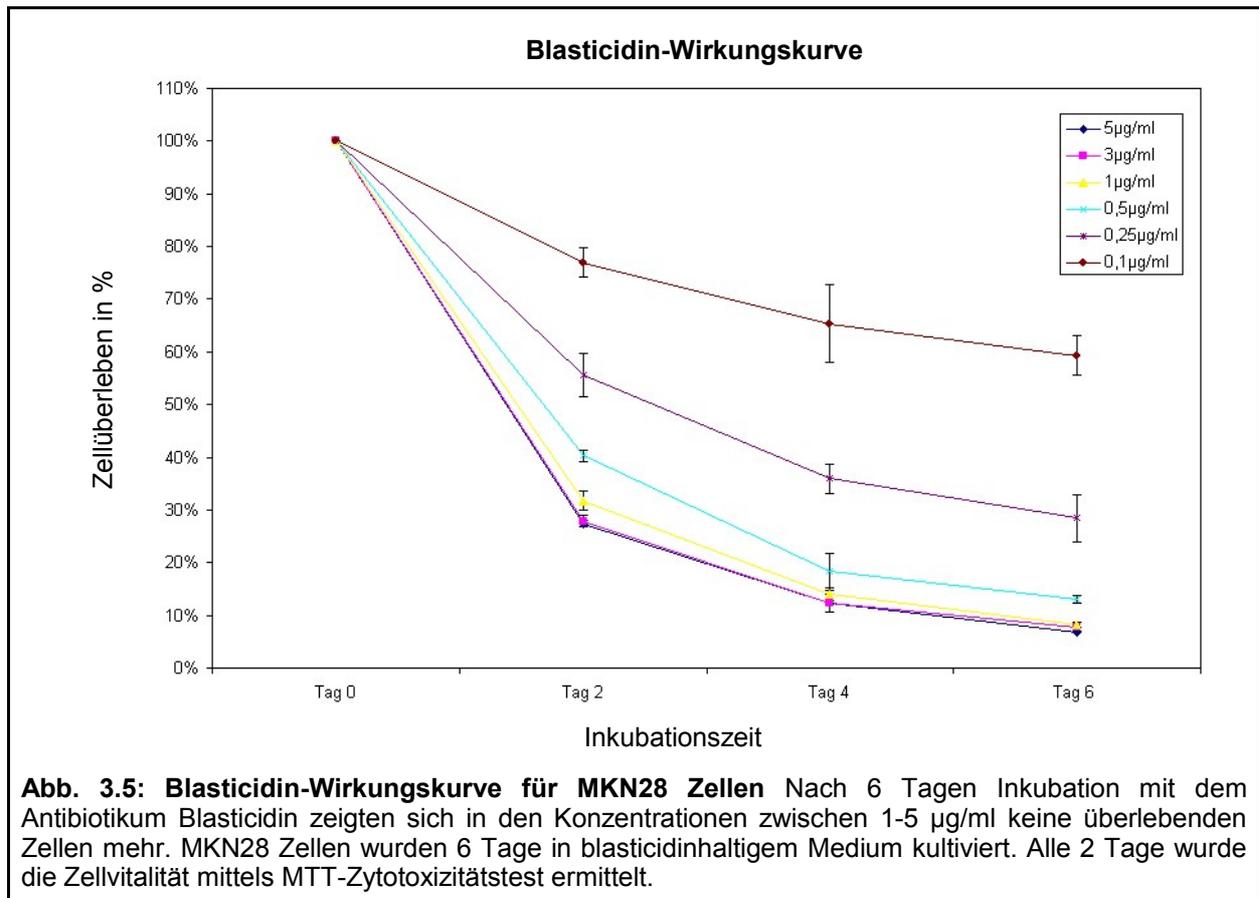
Für die Zellkulturexperimente war es nötig, eine Zelllinie zu etablieren, die den AT1R konstant überexprimiert. Da bei der transienten Transfektion die eingebaute Information im Verlauf mehrerer Zellteilungen verloren geht, wurde die Zelllinie MKN28 mit dem pEF-DEST51 Vektor, der für den AT1R kodiert, mit Lipofectamin™ 2000 stabil transfiziert und anschließend kloniert.

#### 3.1.4.1 Erstellen einer Dosis-Wirkungskurve für die Zelllinie MKN28

In dieser Arbeit vermitteln die verwendeten Plasmide eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Blasticidin. Vorab wurde die letale Konzentration für nicht transfizierte Zellen in einer Dosis-Wirkungskurve ermittelt (Abb. 3.5).

Die Zelllinie MKN28 wurde über einen Zeitraum von 6 Tagen mit dem Antibiotikum Blasticidin behandelt. Es wurden Konzentrationen zwischen 0,1-5 µg/ml Blasticidin ausgetestet. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Antibiotikazusatz. Das Zellwachstum wurde täglich optisch am Lichtmikroskop kontrolliert. Eine Auswertung erfolgte alle 2 Tage mittels MTT-Zytotoxizitätstest.

Nach 6 Tagen Inkubation unter dem Antibiotikum Blasticidin zeigten sich keine überlebenden Zellen in den Konzentrationen zwischen 1 µg/ml und 5 µg/ml. Bereits nach 2 Tagen wurde eine deutliche Reduktion der überlebenden Zellen auf unter 30% bei den Blasticidin-Konzentrationen von 3 µg/ml und 5 µg/ml erzielt. Daher wurde für eine rasche Selektion nach der Transfektion eine Konzentration von 3 µg/ml Blasticidin verwendet und für die dauerhafte Kultivierung stabil transfizierter Zellen eine Konzentration von 1 µg/ml.



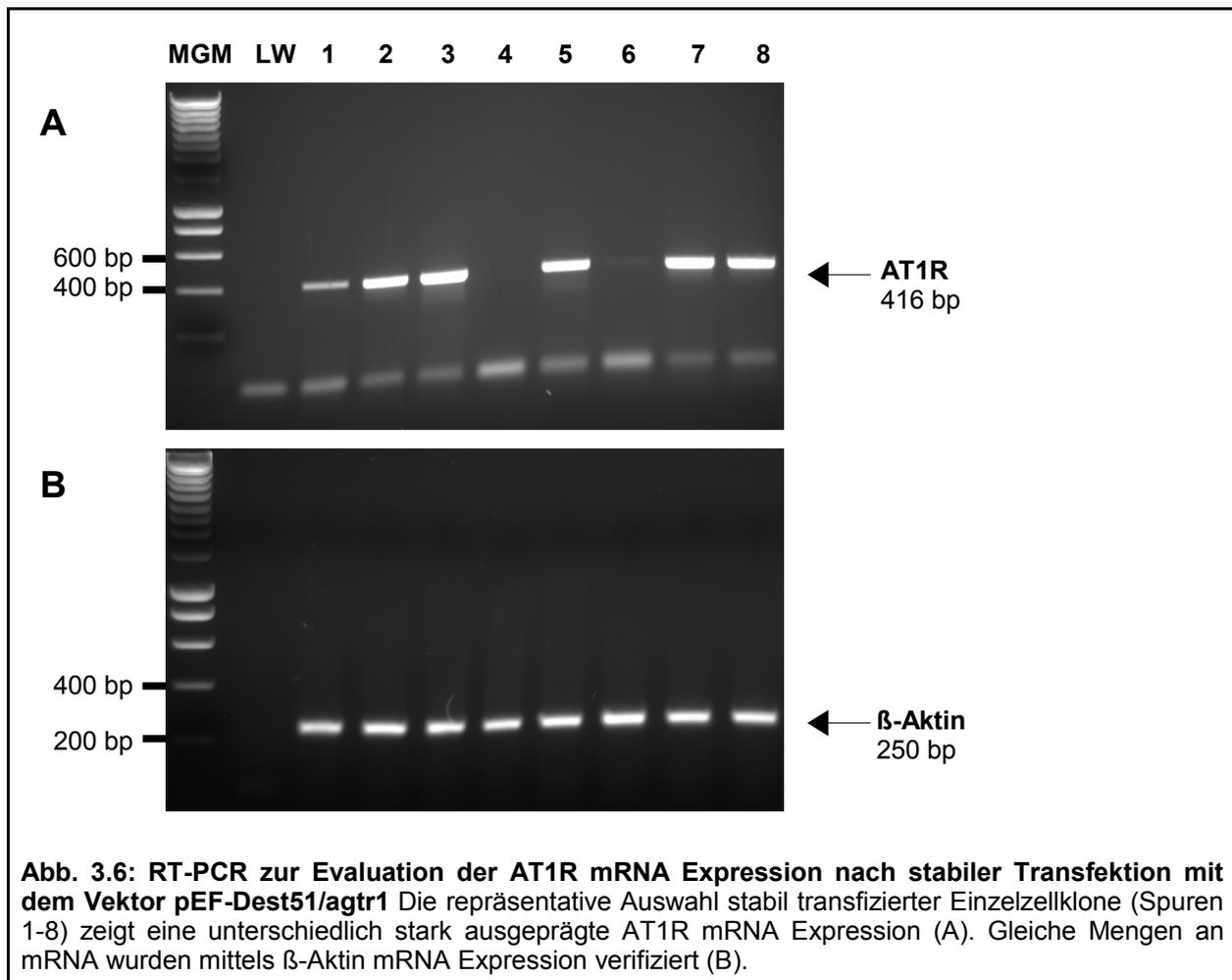
### 3.1.4.2 Stabile Transfektion und Klonierung von Einzelzellen

Um eine stabile Expression des AT1R zu erreichen, wurden die Zellen 48 Std. nach der Transfektion in blasticidinhaltigem Selektionsmedium kultiviert. Nach 2 Wochen waren die stabil transfizierten Zellen zu Zellkolonien herangewachsen. Um homogene Zellpopulationen zu erhalten, wurden die Zellen anschließend kloniert. Pro Kavität einer 96-Well-Platte wurde mittels limitierender Verdünnung eine halbe Zelle ausgesät. Von den Zellen, die sich in einer Kavität vermehren, wird angenommen, dass sie positiv transfiziert sind und nur von einer Zelle abstammen. Auf diese Weise wurden ca. 30 Einzelzellklone gewonnen.

### 3.1.4.3 AT1R mRNA Expression der Zellklone

6-8 Wochen nach Transfektion hatten die Klone eine ausreichend große Zellzahl erreicht, so dass ein qualitativer Nachweis des pEF-Dest51/agtr1-Einbaus mit Hilfe der RT-PCR erfolgen konnte. In den untersuchten Zellklonen konnte AT1R mRNA nachgewiesen werden (Abb. 3.6). Da bei der cDNA-Synthese gleiche Mengen an RNA eingesetzt wurden, konnten anhand der Bandenstärke vorab Rückschlüsse auf den

AT1R mRNA-Gehalt der einzelnen Zellklone gezogen werden. Es zeigten sich deutliche Unterschiede im Expressionsniveau zwischen den einzelnen Zellklonen, so dass eine grobe Einteilung in eine starke, mäßige und sehr niedrige Überexpression vorgenommen wurde. Aus jeder dieser Gruppen wurden 3-4 Zellklone in Zellkulturflaschen weiter kultiviert und von den frühen Passagen Kryokonserven angelegt.

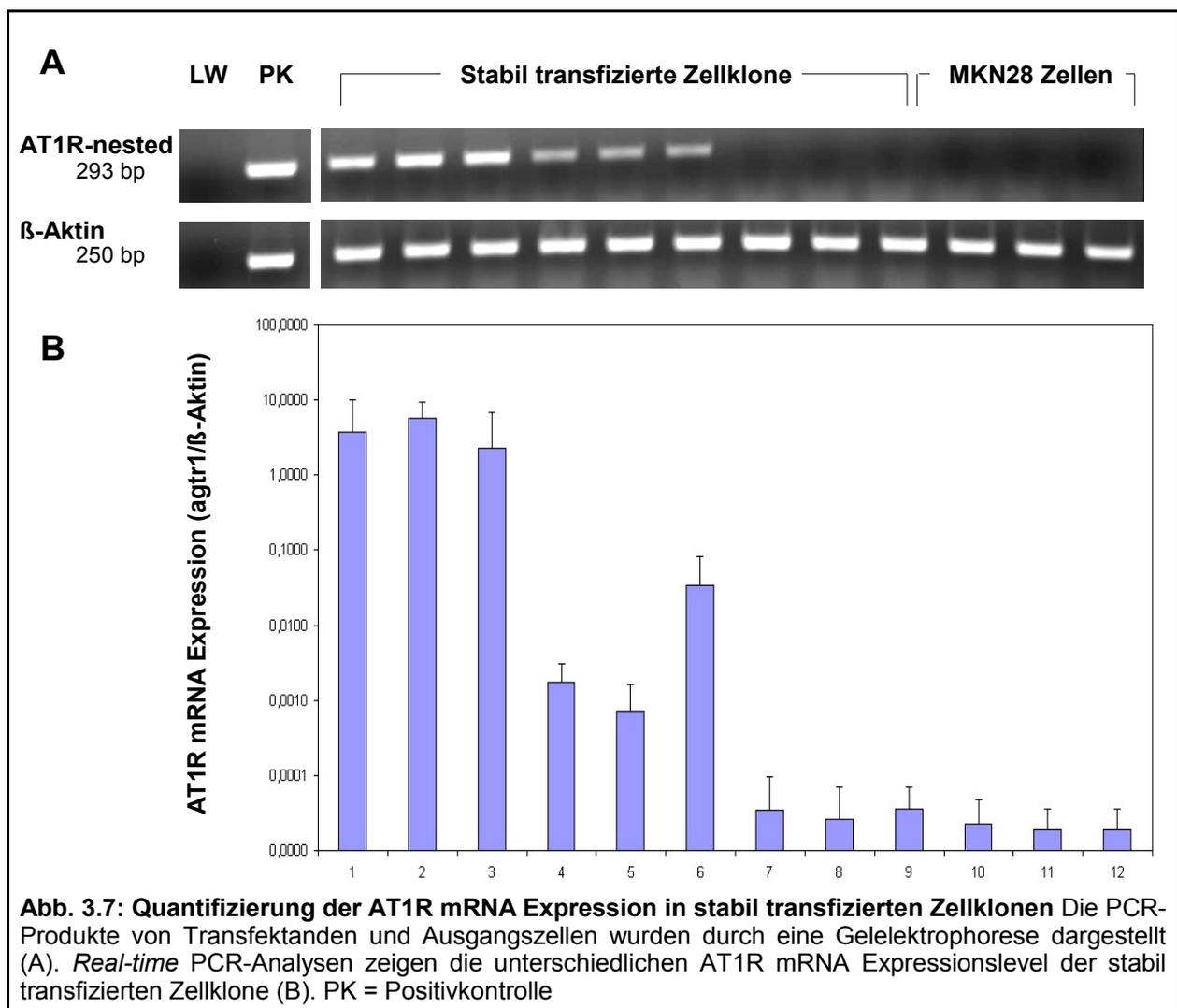


**Abb. 3.6: RT-PCR zur Evaluation der AT1R mRNA Expression nach stabiler Transfektion mit dem Vektor pEF-Dest51/agtr1** Die repräsentative Auswahl stabil transfizierter Einzelzellklone (Spuren 1-8) zeigt eine unterschiedlich stark ausgeprägte AT1R mRNA Expression (A). Gleiche Mengen an mRNA wurden mittels  $\beta$ -Aktin mRNA Expression verifiziert (B).

Um exakte Aussagen über den AT1R mRNA-Gehalt der transfizierten Zellen treffen zu können, wurde von allen Klonen mit Hilfe der *real-time* PCR der AT1R mRNA-Gehalt quantifiziert. Die AT1R Expression wurde gegen die  $\beta$ -Aktin Expression normalisiert. Die relative Quantifizierung erfolgte über die Verwendung einer Standardkurve, die zuvor für die entsprechenden PCR-Produkte etabliert wurde. Die Zellen wurden lysiert, die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Von jeder Probe wurden mindestens 3 Werte bestimmt und gegen die  $\beta$ -Aktin mRNA Expression verglichen. Als Primerpaar dienten AT1R-nested-F und AT1R-nested-R (293 bp) bzw.  $\beta$ -Aktin-F und  $\beta$ -

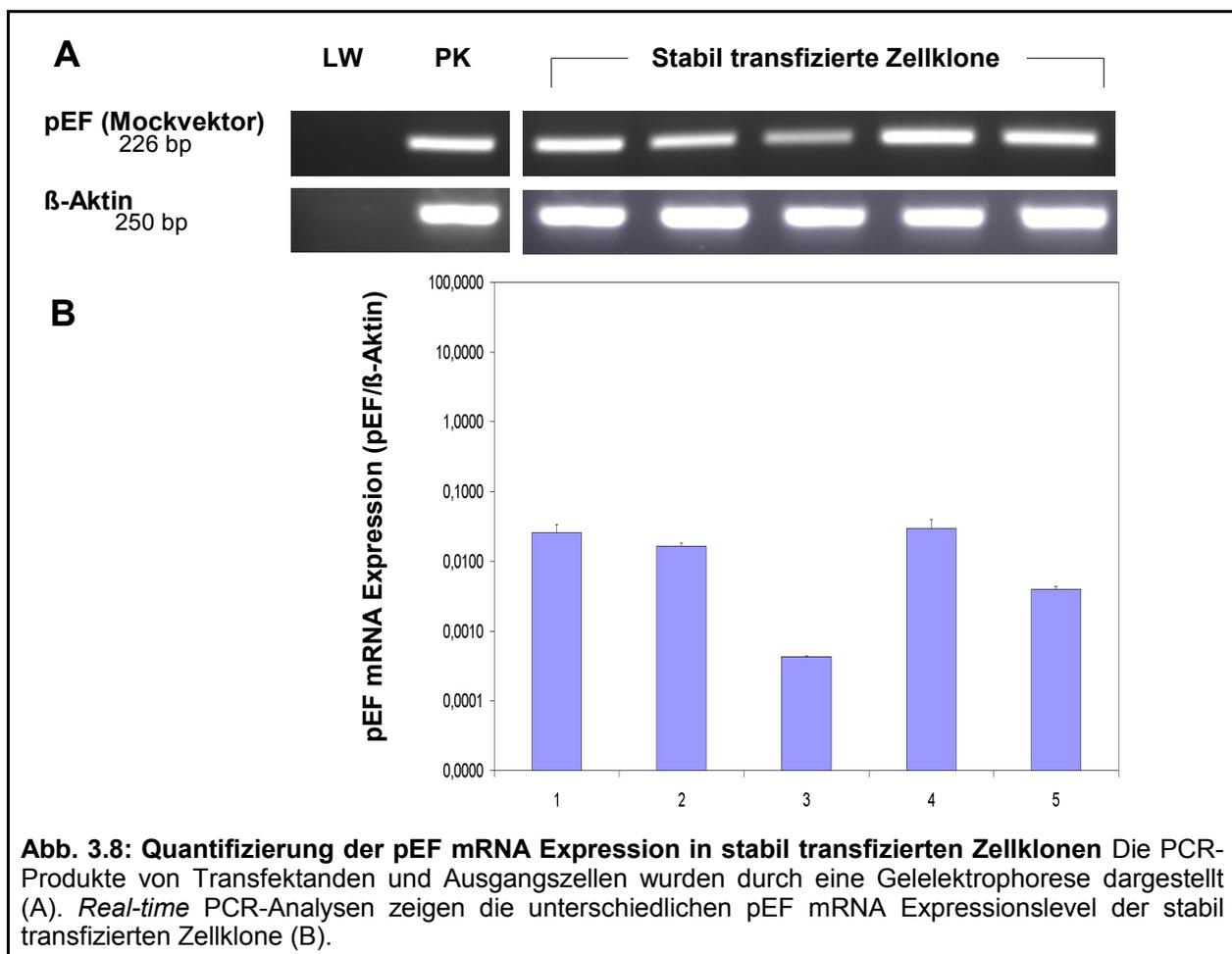
Aktin-R (250 bp). Gleichzeitig wurde auch mRNA aus nicht transfizierten Zellen eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne DNA.

Die stabile Transfektion des pEF-Dest51/agtr1 Vektors in die Zelllinie MKN28 führte zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Überexpression des AT1R-Gens (Abb. 3.7). Verglichen mit untransfizierten Zellen wurde eine signifikant höhere Expression des AT1R-Gens in transfizierten Zellen erreicht. Die Einteilung der Zellklone in die Gruppen mit hoher, moderater und niedriger AT1R mRNA Expression konnte beibehalten werden. Der mRNA-Gehalt der Gruppe mit sehr geringer Expression war vergleichbar mit dem von untransfizierten Zellen, so dass diese Gruppe nicht weiter kultiviert wurde. Für die nachfolgenden Zellkulturexperimente (Kapitel 4) wurde aus den beiden übrigen Gruppen je ein Zellklon ausgewertet. Die mit  $\beta$ -Aktin spezifischen Primern durchgeführte PCR zeigte, dass die cDNA intakt und in den verschiedenen Zellklonen in annähernd gleicher Konzentration vorhanden war (Abb. 3.7).



### 3.1.5 Stabile Expression des Mockvektors in MKN28 Zellen

Um mögliche Auswirkungen durch die Transfektion des Plasmids an sich auf das Verhalten der Zellen zu untersuchen, wurden zusätzlich MKN28 Zellen mit dem Mockvektor pEF/GW-51//*lacZ* stabil transfiziert. Dabei wurde analog zu Kapitel 3.1.4 vorgegangen. Die Selektion stabiler Transfektanden erfolgte ebenfalls mit dem Antibiotikum Blasticidin. Durch limitierende Verdünnung auf 96-Well-Platten konnten Einzelzellklone gewonnen werden, die mit Hilfe der RT-PCR auf den korrekten Einbau des Vektors überprüft wurden. Das Primerpaar pEF-F und pEF-R lieferte für alle untersuchten Proben ein 226 bp großes Amplifikat. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA mitgeführt. Mit Hilfe der *real-time* PCR wurde die Menge des eingebauten Vektors quantifiziert (Abb. 3.8). Es zeigten sich ebenfalls unterschiedliche Expressionsmengen zwischen den einzelnen Zellklonen. Für die nachfolgenden Zellkulturexperimente wurden Zellen eingesetzt, deren Menge eingebauter Plasmide in etwa denen der ausgewählten AT1R überexprimierenden Zellen entsprachen.



## 3.2 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, in der humanen Magenkarzinomzelllinie MKN28 den AT1R durch Transfektion stabil zur Expression zu bringen (Kapitel 3), um anschließend mit Hilfe verschiedener Zellkulturexperimente die Bedeutung dieses Rezeptors auf das Wachstumsverhalten der MKN28 Zellen untersuchen zu können (Kapitel 4). Literaturrecherchen haben ergeben, dass MKN28 Zellen noch nie mit dem AT1R transfiziert wurden. Des Weiteren war die Methode der Transfektion in unserem Labor noch nicht etabliert, so dass vor der stabilen Transfektion der MKN28 Zellen in Vorversuchen die optimalen Transfektionsbedingungen für diese Zelllinie bestimmt und die Transfizierbarkeit der Zellen mit dem pEF-DEST51 Vektor, der für den AT1R kodiert, getestet wurden.

### 3.2.1 Optimierung der Transfektion

Für den stabilen Gentransfer stehen physikalische, chemische und biologische Methoden zur Auswahl. Wir haben uns für die Methode der Lipofektion entschieden. Dies ist eine von Felgner und Mitarbeitern 1987 entwickelte Methode, die auf dem liposomenvermittelten Transport der Fremd-DNA in die Zelle beruht. Dabei wird die DNA an der Oberfläche kationischer Lipide gebunden und gelangt durch Membranfusion und Endozytose in die Zellen (Felgner et al., 1987; Zhou und Huang, 1994). Wie die DNA in den Zellkern gelangt, ist noch nicht geklärt (Schrimpf, 2002). Die Vorteile dieser Methode gegenüber anderen Transfektionsmethoden beruhen auf einer hohen Effizienz, der Fähigkeit, eine Vielzahl eukaryotischer Zellen erfolgreich zu transfizieren – unter anderem auch schwer zu transfizierende Zelllinien – und der relativ geringen Zelltoxizität (Freshney, 2005; Schrimpf 2002). Die Effizienz der Transfektion mit kationischen Lipiden ist von verschiedenen Parametern, u.a. verwendete Zelllinie, Art des Transfektionsreagens, Zelldichte, DNA- und Lipidkonzentration sowie Plasmidkonformation, abhängig.

#### 3.2.1.1 DNA-Lipid-Verhältnis

Es stehen zahlreiche kommerziell erhältliche Liposomengemische zur liposomenvermittelten Transfektion zur Verfügung. Die Wahl fiel auf Lipofectamin™ 2000, da dieses Reagenz für die Transfektion einer großen Anzahl eukaryotischer Zellen geeignet ist und die optimalen Transfektionsbedingungen für dieses Transfektionsreagenz gut dokumentiert sind (Dalby et al., 2004). Lipofectamin™ 2000

ist eine Liposomenformulierung bestehend aus einem polykationischen Lipid in Kombination mit einem neutralen Colipid. Dieses Transfektionsreagenz bewirkt die Bildung kompakter Lipid-DNA-Komplexe und ermöglicht somit eine effiziente Aufnahme in Säugerzellen. Ein entscheidender Parameter, der von Zelllinie zu Zelllinie stark variiert, ist das optimale Verhältnis zwischen der Menge des Lipids und der DNA (Sakurai et al., 2000, Birchall et al., 1999). Im allgemeinen werden Lipid und DNA in einem solchen Verhältnis gemischt, dass eine positive Nettoladung verbleibt, so dass eine Bindung an die negativ geladene Zellmembran gewährleistet wird. Zu hohe Mengen an DNA bzw. Lipid können sich jedoch toxisch auf die Zellen auswirken. Für die Bestimmung des optimalen Lipid-Plasmid-Verhältnisses diente das Reporterplasmid pEGFP-N1, das für das grün fluoreszierende Protein codiert. Durch Anregung mit UV- bzw. Blaulicht (400-480 nm) emittiert das GFP ein grünes Licht (508 nm), das fluoreszenzmikroskopisch detektierbar ist und eine Quantifizierung der Expression des Proteins in transfizierten Zellen erlaubt. Das GFP ist ein Protein, das in nahezu allen eukaryotischen Zellen als nicht toxisch einzustufen ist und welches ohne den Umsatz von Substraten sowie ohne weitere Kofaktoren, nur durch Einstrahlung von blauem Licht fluoresziert (Chalfie et al., 1994). Daher ist das pEGFP-N1 Plasmid als Reporterkonstrukt für die Untersuchung von Transfektionsbedingungen gut geeignet. Die in dieser Arbeit getesteten Plasmid-Lipid-Verhältnisse ergaben für die Zelllinie MKN28 Transfektionsraten zwischen 20-25%. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der grün fluoreszierenden Zellen an der Gesamtzellzahl transfizierter Zellen. Diese Transfektionsraten sind vereinbar mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen (Hu et al., 2005). Diese beschrieben nach transienter Transfektion von MKN28 Zellen mit dem pEGFP-Plasmid mittels Lipofectamin™ 2000 ebenfalls Transfektionsraten von 20-25%. Hinsichtlich der verschiedenen Verhältnisse zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Transfektionsraten. Die Erhöhung der Lipid- bzw. Plasmidmengen bewirkte keine Steigerung der Transfektionseffizienz, zeigte aber auch keine erhöhte Letalität der Zellen, was auf eine gute Verträglichkeit des Transfektionsreagenzes in den Zellen hinweist. Gleiche Transfektionsraten auch bei niedrigem Materialeinsatz deuten auf die gute und effiziente Transfizierbarkeit von MKN28 Zellen hin.

### 3.2.1.2 Plasmidkonformation

Die Effizienz der Transfektion ist unter anderem auch von der Konformation des verwendeten Plasmids abhängig (Remaut et al., 2006, Boktov et al., 2007). Es gibt verschiedene Zustandsformen von Plasmiden. Nach der Aufreinigung aus Bakterienkulturen liegt der Hauptteil als sogenannte superhelikale („supercoiled“) Form vor. Hierbei sind die DNA-Doppelstränge in sich verwunden. Dadurch sind die Plasmide wesentlich kompakter und wandern bei gelelektrophoretischer Auftrennung deutlich schneller im elektrischen Feld. Plasmide nehmen diese Form aufgrund des Platzmangels im Zytoplasma bevorzugt ein. Weitere Konformationen entstehen durch DNA-Strangbrüche, z.B. durch starkes Vortexen während der Aufreinigung. Dadurch entwindet sich die verdrillte DNA und nimmt einen relaxierten Zustand ein, der als offenes entspanntes Ringsystem („open circled“) bezeichnet wird und im Agarosegel deutlich langsamer wandert. Kommt es in beiden DNA-Strängen zu einem Bruch, ist das Ringsystem aufgebrochen und das Plasmid linearisiert.

Transiente Transfektionen sind am wirksamsten mit „supercoiled“ Plasmid, wohingegen bei der stabilen Transfektion lineare DNA bevorzugt wird, was zwar eine geringere Aufnahme in die Zellen bewirkt, jedoch die korrekte Integration ins Wirtsgenom fördert (Chu et al., 1987, Potter et al., 1984). Linearisierte DNA baut sich kontrollierter in die genomische DNA ein und unterliegt somit weniger Abbauprozessen als beliebig integrierte DNA. Dadurch erhöht sich die Häufigkeit stabiler Transfektanden (Sambrook und Russel, 2001, Ausubel et al., 2003, Freshney, 2005). Vor der stabilen Transfektion der MKN28 Zellen mit den Expressionsvektoren pEF-DEST51/agtr1 bzw. pEF/GW-51//lacZ wurden die Plasmide daher linearisiert.

### 3.2.2 Plasmidlinearisierung

Für die Plasmidlinearisierung wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, die nur eine Schnittstelle im Vektor aufweisen und weder die Zielsequenz noch wichtige für die Expression des Zielgens notwendige Elemente im Vektor zerschneiden. Typ II Restriktionsendonukleasen sind Endonukleasen, die DNA an palindromischen Sequenzen erkennen und schneiden. Bei der Restriktion des pEF-DEST51/agtr1 mit dem ausgewählten Restriktionsenzym *SapI* traten Schwierigkeiten auf, die „supercoiled“ Form zu spalten, obwohl die „open circled form“ des Plasmids gut linearisierbar war. Normalerweise führt ein Überschuss (ca. 3-fach) des

Restriktionsenzym zur vollständigen Spaltung der DNA. Da einige Restriktionsenzyme extrem ineffizient beim Verdau von „supercoiled“ DNA sein können, wurde die Unitzahl bis auf das 20-fache erhöht. Da weder die Steigerung der Enzymmenge noch die Erhöhung der Inkubationszeit zu einer Linearisierung des Vektors führte, wurde ein anderes Enzym (*BspQI*), das an derselben Stelle im Vektor angreift (Isoschizomer), getestet. Auch der Wechsel des Restriktionsenzym führte zu keiner erfolgreichen Linearisierung des Plasmids. Um die Intaktheit der Enzyme zu überprüfen, wurden Lambda-DNA Kontrollverdaue durchgeführt. Die vollständige Spaltung der Lambda-DNA durch die beiden Enzyme zeigte jedoch keinen Aktivitätsverlust. Restriktionsstellen können ganz oder teilweise durch Methylierung inaktiviert sein. Bakterien benutzen diese natürliche Modifizierung zum Schutz ihrer DNA vor dem Verdau durch ihre eigenen Restriktionsendonukleasen. Daher und um auszuschließen, dass durch die Konformation des Plasmids die Erkennungssequenz für die Enzyme unzugänglich ist, wurden zwei andere Restriktionsenzyme (*FspI* und *AatII*) getestet, die an anderen Stellen im Vektor schneiden. Auch der Verdau mit den neuen Enzymen erbrachte nicht die gewünschte Linearisierung des Vektors.

Eine unzureichende Aktivität der Plasmide in enzymatischen Reaktionen kann auch durch eine mangelnde Plasmidqualität verursacht werden. Daher wurde für die Aufreinigung des Plasmids ein anderer Kit (NucleoBond2000 von Macherey und Nagel) ausgetestet. Auch das Ausweichen auf eine andere Methode der Plasmidaufreinigung führte nicht zu einer Linearisierung des Vektors.

Nicht nur die Aufreinigungsmethode, sondern auch der zur Replikation der Vektoren verwendete Bakterienstamm, können einen Einfluss auf die Plasmidqualität haben. Daher wurde der Vektor in einen anderen Bakterienstamm (*E.coli* JM109) transformiert und kultiviert. Nach der Aufreinigung konnte der Vektor mit allen untersuchten Restriktionsenzymen erfolgreich linearisiert werden. Dieser Umstand weist auf einen Zusammenhang zwischen dem zur Replikation verwendeten Bakterienstamm und den Eigenschaften des Vektors hin. Möglicherweise beruht die fehlende Linearisierbarkeit auf einer veränderten Struktur des Vektors. Für ein konformationelle Ursache spricht auch der Aspekt, dass die „open circled form“, nicht aber die „supercoiled form“ linearisierbar war.

### 3.2.3 Transiente und stabile Transfektion der MKN28 Zellen

Bei einer transienten Transfektion wird die Plasmid-DNA in die Zelle aufgenommen, wobei aber im Gegensatz zur stabilen Transfektion keine Integration in das Genom erfolgt. Die Fähigkeit zur Expression des Zielgens ist nur vorübergehend und geht im Verlauf mehrerer Zellteilungen verloren. Dafür entfällt aber eine lange Selektionsphase und das Isolieren von Einzelzellklonen, so dass eine erfolgreiche transiente Transfektion zeitnah überprüft werden kann. Daher wurde in transienten Transfektionsversuchen geprüft, ob sich die MKN28 Zellen mit dem pEF-DEST51/agtr1 Vektor transfizieren lassen bzw. ob toxische Reaktionen auf das ausgewählte Plasmid oder Elemente des Vektors auftreten. Lässt sich eine Zelllinie nicht effizient transient transfizieren, ist es extrem schwer, stabile Zellkone zu isolieren (Ausubel et al., 2003).

Für die nachfolgenden Zellkulturexperimente zur Analyse des Wachstumsverhaltens der MKN28 Zellen war es dann aber nötig, eine Zelllinie zu etablieren, die den AT1R konstant überexprimiert. Daher wurden die MKN28 Zellen anschließend stabil mit dem pEF-DEST51/agtr1 Vektor transfiziert. Bei der stabilen Transfektion kommt es durch Integration der Fremd-DNA ins Wirtsgenom der Zelle zu einer dauerhaften (stabilen) Expression des gewünschten Zielgens. Dadurch können Expressionsanalysen über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden. Des Weiteren hat die Verwendung stabil transfizierter Zellen den Vorteil, dass hohe intra- und inter-Experiment-Variabilitäten vermieden werden können (Hollon und Yoshimura, 1989; Farr und Roman, 1991). Da die stabile Integration ein sehr seltenes Ereignis ist – von  $10^4$  in einer Transfektion eingesetzten Zellen baut nur annähernd eine Zelle die DNA stabil in ihr Wirtsgenom ein (Ausubel et al., 2003; Würtele et al., 2003) – kodieren die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren für ein Resistenzgen gegenüber dem Antibiotikum Blasticidin. Nur jene Zellen, die den Vektor in ihr Genom integriert hatten und das Antibiotikaresistenzgen exprimierten, konnten dauerhaft unter dem Selektionsdruck wachsen.

Der Einbau der Plasmid-DNA erfolgt jedoch zufällig und multiple Vektorinsertionen sind bei solchen ungerichteten Gentransferen häufig (Ng und Baker, 1999), woraus eine sehr heterogene Zellpopulation hervorgeht. Um einen homogenen Pool an Zellen mit der gleichen Anzahl eingebauter Plasmidkopien zu gewinnen, wurden daher durch limitierende Verdünnung Einzelzellklone gewonnen. Der Einsatz monoklonaler Zellen gewährleistete für die nachfolgenden Zellkulturexperimente reproduzierbare Ergebnisse, da Beeinflussungen im Wachstumsverhalten durch Schwankungen der

Transfektionseffizienz vermieden werden konnten.

Um falsch positive Klone mit geringer oder gar keiner Genexpression zu identifizieren, wurde vor der Verwendung stabil transfizierter Zellen für die Zellkulturassays die Genexpression mittels *real-time* PCR quantifiziert. Es zeigte sich ein unterschiedlich starkes Expressionsniveau zwischen den einzelnen Zellklonen. Dabei wurden Zellklone mit hoher, moderater und geringer bis fast gar keiner Genexpression identifiziert. Multiple Vektorinsertionen bei einzelnen Zellklonen könnten dafür verantwortlich sein. Es ist ein häufiges Phänomen bei Gentransferen, dass nicht nur eine Kopie, sondern mehrere (einige hundert) Kopien der transfizierten DNA, meist an nur einer Stelle im Wirtsgenom, eingebaut werden (Würtele et al., 2003, Wurm, 2004). Dabei integrieren die multiplen DNA-Moleküle in Form von Concatemeren, die in einer Kopf-Schwanz- oder Kopf-Kopf-Orientierung miteinander verknüpft sind (Koch-Brand, 1993). Aufgrund der aufeinanderfolgenden Anordnung (tandem array) gleicher Sequenzen kann es aber auch zu einem intrachromosomalen Rearrangement kommen, was zu einem Verlust der Kopienzahl und zu einem verminderten Expressionslevel führt (Ausubel et al., 2003, Würtele et al., 2003). Durch eine Zerstörung von wichtigen Vektorbereichen, z.B. EF-1 $\alpha$ -Promotor oder AT1R-Gen und bei Unversehrtheit des Blastocidinresistenzgen können Klone mit geringer bis gar keiner AT1R Expression isoliert werden. Einige der Integrationen führen demnach nicht zu einer adäquaten Expression des gewünschten Zielgens, so dass mehrere (ca. 30 Einzelzellklone) resistente Klone auf ihre AT1R Expression untersucht wurden. Des Weiteren beeinflusst der Ort der Insertion der Plasmid-DNA die Expressionsrate des Zielgens (Wurm, 2004). Der Einbau der Plasmid-DNA in das zelluläre Wirtsgenom erfolgt ungerichtet, d.h. nicht durch homologe Rekombination, sondern randomisiert an zufälligen Stellen des Genoms (Murnane et al., 1990). Typischerweise insertiert die Fremd-DNA im Bereich von natürlich vorkommenden Doppelstrangbrüchen, wobei eventuell entstehende Nukleotid-Lücken durch Reparaturenzyme aufgefüllt werden (Murnane et al., 1990, Würtele et al., 2003). Insertion der Vektor-DNA in Bereich von Enhancer-Strukturen bzw. in stillen Bereichen des Wirtsgenoms, z.B. in Bereichen mit hoher Methylierung, könnten die unterschiedlich starken Genexpressionslevel erklären.

Der genaue Mechanismus der DNA-Insertion in das zelluläre Genom ist aber noch nicht vollständig geklärt und inwiefern es dadurch zu Unterschieden in der Expression kommt, wurde bisher noch nicht umfassend aufgeklärt.

### 3.2.4 Nachweis der AT1R mRNA Expression in MKN28 Zellen

Für den Nachweis der AT1R Expression in MKN28 Zellen kamen verschieden modifizierte PCR-Methoden zur Anwendung. Mit Hilfe der RT-PCR kann die Transkription bestimmter Gene in Zellen qualitativ nachgewiesen werden. Bei der RT-PCR wird zunächst aus der mRNA mittels der Reversen Transcriptase eine komplementäre cDNA synthetisiert, die anschließend als Template in der PCR eingesetzt wird. So konnte zuverlässig der erfolgreiche Plasmideinbau nach transienter und stabiler Transfektion überprüft werden. Mit Hilfe der *real-time* RT-PCR lässt sich hingegen exakt feststellen, wieviel mRNA von den Zellen gebildet worden ist. Für die *real-time* RT-PCR wird die mRNA ebenfalls in cDNA umgeschrieben. Im Unterschied zur RT-PCR wird während der Amplifikation der DNA die Menge durch Messung von Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. In dieser Arbeit diente daher die *real-time* RT-PCR dafür, mRNA-Konzentrationen in stabil transfizierten Zellen quantitativ zu erfassen, um so statistisch auswertbare Aussagen über Expressionsunterschiede in den Zellen zu treffen.

In früheren Arbeiten haben wir bereits für eine Reihe von humanen Magenkarzinomzelllinien, unter anderem auch für MKN28 Zellen, mittels RT-PCR-Analysen die AT1R mRNA Expression qualitativ nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass MKN28 Zellen im Vergleich zu MKN45, AGS und N87 Zellen in viel geringerem Maße AT1R mRNA exprimieren (Carl-McGrath et al., 2007<sub>b</sub>). Obwohl der Nachweis der AT1R mRNA Expression in MKN28 Zellen schon erbracht worden war, kamen während der Arbeit Schwierigkeiten auf, diese Ergebnisse mit den etablierten Primern und dem etablierten PCR-Protokoll zu wiederholen, was wahrscheinlich mit der Heterogenität der kultivierten Zellen zusammenhängt. Nur in pEF-DEST/51agtr1 transfizierten Zellen, nicht aber in normalen MKN28 Zellen konnte AT1R mRNA nachgewiesen werden und die Quantifizierung der AT1R mRNA Expression mittels *real-time* RT-PCR zeigte kaum messbare Werte für untransfizierte Zellen. Eine erfolgreiche stabile Transfektion ist im hohem Maße abhängig von der Frische und Vitalität der Zellen. Um junge Passagen zu erhalten, wurde mit einer neuen Charge MKN28 Zellen, die von einer anderen Zellbank bezogen wurde, gearbeitet. MKN28 Zellen sind maligne transformierte Krebszellen, die in Kultur keine homologe Zellkultur darstellen. Diese Heterogenität der Zellen könnte die unterschiedliche Nachweisbarkeit der AT1R mRNA in unserer Arbeitsgruppe

erklären. Ferner könnten veränderte Gen-Eigenschaften und unterschiedliche Expressionsniveaus dieser neuen Passagen für das Fehlschlagen des AT1R mRNA Nachweises mit dem etablierten PCR-Programm und Primern verantwortlich sein.

Da in der RT-PCR auch mit veränderten Primerkonzentrationen, einem neuen Primerpaar sowie unterschiedlich veränderten Amplifikationsbedingungen kein Produkt amplifiziert werden konnte, wurde auf eine andere PCR-Methode umgestellt. Für den Nachweis der AT1R mRNA Expression in der Zelllinie MKN28 wurde eine nested PCR etabliert. Die nested PCR ist ein hochsensitives PCR-Verfahren, mit dessen Hilfe sich auch kleinste Templatemengen nachweisen lassen. Das Prinzip beruht darauf, dass zwei PCR-Reaktionen nacheinander geschaltet werden. Das PCR-Produkt aus der ersten Amplifikation dient als Matrize für die zweite PCR, wobei Primer verwendet werden (nested Primer), die innerhalb der ersten Zielsequenz liegen. Dadurch bieten unspezifische Produkte aus der ersten PCR keine komplementäre Sequenz für die inneren Primer und können in der zweiten PCR nicht amplifiziert werden. Mit Hilfe dieser Methode gelang auch für die untransfizierten Zellen der Nachweis der AT1R mRNA Expression. Das Ausweichen auf die nested PCR zum Nachweis der AT1R Expression zeigt, dass die humane Magenkarzinomzelllinie MKN28 nur sehr geringe Mengen an AT1R mRNA besitzt. Die Fähigkeit einer jeden Zelle, nahezu alle Gene, wenn auch auf sehr niedrigem Niveau, exprimieren zu können, nennt man illegitime Transkription (Chelly et al., 1989, Kaplan, 1992). Solche Transkripte sind physiologisch irrelevant. Die Tatsache, dass der qualitative Nachweis für das AT1R-Gen in MKN28 Zellen in dieser Arbeit nur mittels einer hochsensitiven nested PCR gelungen ist und in quantitativen *real-time* PCR-Analysen kaum messbare Werte erreicht wurden, beweisen aber noch nicht, dass die AT1R Expression in MKN28 Zellen keine Bedeutung hat. Die Induktion von Matrix-Metalloproteinasen via AT1R in MKN28 Zellen (Huang et al., 2008<sub>a</sub>), weisen auf die funktionelle Bedeutung dieses Rezeptors in MKN28 Zellen hin. Weiterhin korreliert die mRNA-Menge nicht zwangsläufig mit der Proteinmenge (Korf et al., 2007). Auch bei geringer mRNA Expression kann die Proteinmenge sehr hoch sein bzw. umgekehrt. Dennoch sei anzumerken, dass MKN28 Zellen verglichen mit den transfizierten Zellen viel geringere AT1R mRNA-Mengen enthalten. Für transfizierte Zellen gelang der qualitative AT1R Nachweis mittels einer RT-PCR. Dies verdeutlicht konkret, wie hoch die Expressionsunterschiede zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen einzustufen sind.

## **4 Ergebnisse und Diskussion II: Proliferation und Invasion transfizierter Zellen**

Der AT1R spielt eine große Rolle in der Vermittlung wachstumsstimulierender Signale, insbesondere auch in zahlreichen humanen Tumorzellen und Tumorgeweben. In diesem zweiten Teil der Arbeit sollte der Einfluss des AT1R auf das Proliferations- und Invasionsverhalten in der Magenkarzinomzelllinie MKN28 detailliert untersucht werden. Dazu wurde in verschiedenen Zellkulturassays getestet, welchen Einfluss die unterschiedlich starke Überexpression des AT1R auf das Wachstumsverhalten der MKN28 Zellen hat.

### **4.1 Ergebnisse**

Um mögliche wachstumsstimulierende Effekte der AT1R Überexpression in den stabil transfizierten Zellen zu untersuchen, wurden Proliferations- und Invasionsassays mit ausgewählten Zellklonen durchgeführt und mit denen untransfizierter Zellen verglichen. Für die Zellkulturassays wurde je ein Zellklon aus der Gruppe mit hohem und moderaten AT1R mRNA-Gehalt ausgewählt. Des Weiteren wurde ein Zellklon aus der Gruppe der Mockvektor transfizierten Zellen verwendet.

#### **4.1.1 Datenanalyse**

Die Reproduzierbarkeit und somit die Verlässlichkeit der Zellkulturassays wurde in mehreren Punkten überprüft. Pro Experiment wurden die Zellen als Triplikate oder Quadruplikate angesetzt und die Intra-Assay-Variabilität (Tabelle 4.1) bestimmt. Diese beschreibt die Streuung der Werte bei wiederholten Messungen innerhalb eines Experiments. Andererseits wurden die Experimente dreimal wiederholt und die Inter-Assay-Variabilität (Tabelle 4.1) abgeleitet. Diese beschreibt die Streuung der Messergebnisse über mehrere unabhängige Experimente hinweg. Als Maß für die Assay-Variabilität wurde der Variabilitätskoeffizient (VC) berechnet.

Für die graphische Darstellung der Proliferations- und Invasionsassays wurden aufgrund erheblicher Inter-Assay-Varianzen die Mittelwerte der Absolutzahlen der einzelnen Assays als ein Vielfaches an der Kontrolle (fold of control) angegeben. Die Kontrolle wurde dazu auf 1 gesetzt, was einem Ausgangswert von 100% entspricht. Die übrigen Werte wurden als relative Änderungen bezogen auf die Kontrolle berechnet (x-fold-Wert). Als Kontrolle dienten dabei die untransfizierten Zellen.

**Tabelle 4.1: Intra-Assay-Variabilität und Inter-Assay-Variabilität**

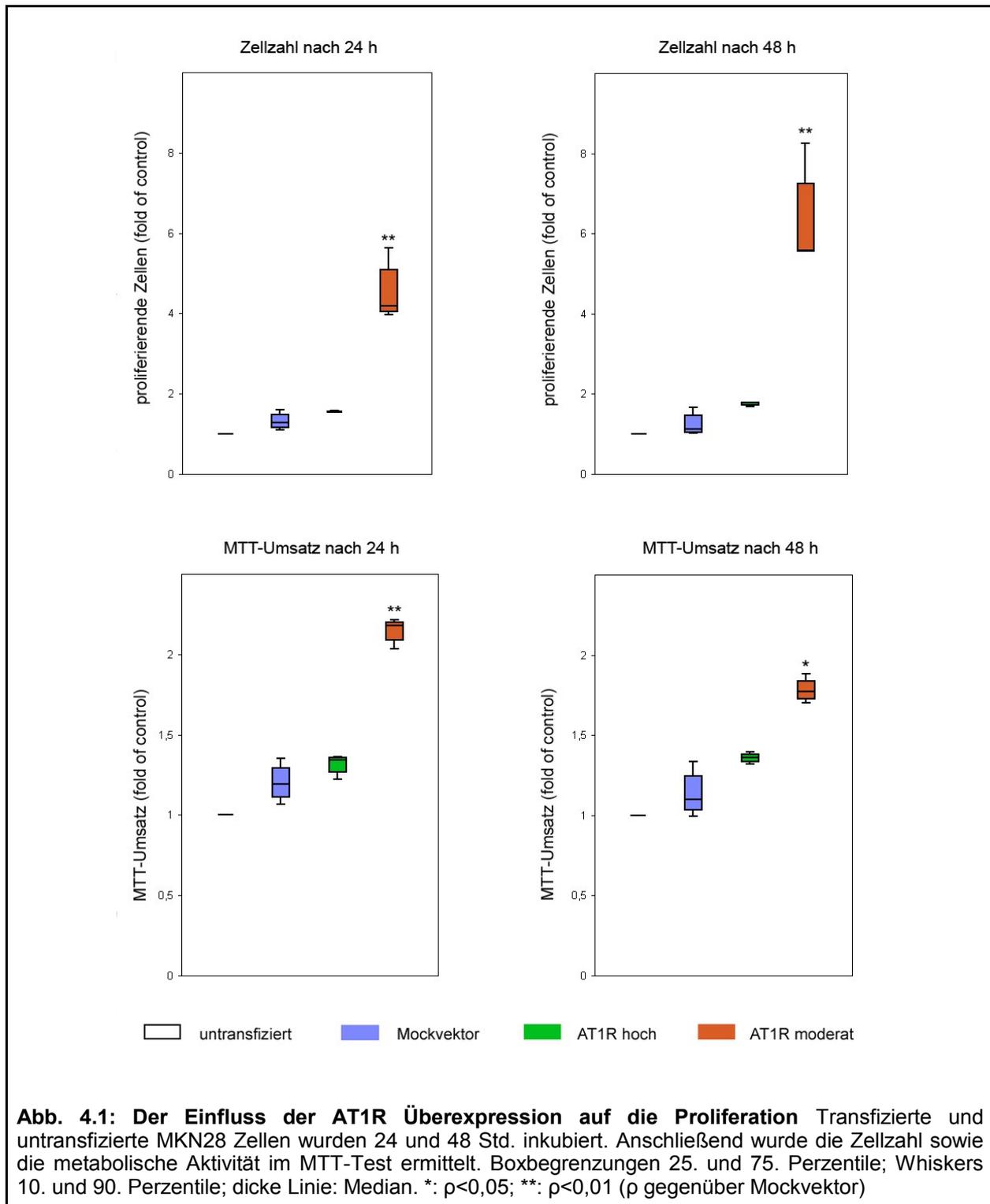
<b>Proliferationsassay</b>	<b>Intra-Assay-Variabilität</b> (VC in %)		<b>Inter-Assay-Variabilität</b> (VC in %)	
	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
<b>Zellzählung (Zellen/ml)</b>				
untransfiziert	7,0 - 14,0	8,8 - 17,7	9,9	13,7
Mockvektor	9,0 - 11,2	6,0 - 15,3	25,0	27,9
AT1R hoch	4,0 - 9,1	4,7 - 7,1	7,6	6,6
AT1R moderat	4,9 - 12,6	5,2 - 10,2	24,9	23,1
<b>MTT-Umsatz (OD<sub>492nm</sub>)</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
untransfiziert	2,7 - 2,8	2,8 - 8,5	3,8	5,6
Mockvektor	1,2 - 4,6	1,2 - 3,7	11,2	14,2
AT1R hoch	1,9 - 9,3	0,8 - 2,6	10,1	2,4
AT1R moderat	1,4 - 7,7	0,6 - 2,3	8,4	3,8
<b>Thymidineinbau (DPM)</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
untransfiziert	1,7 - 8,5	2,2 - 9,1	11,0	8,0
Mockvektor	2,6 - 13,8	3,2 - 4,1	17,9	23,1
AT1R hoch	6,8 - 12,4	2,0 - 6,2	15,7	14,0
AT1R moderat	4,0 - 5,2	2,4 - 7,2	11,4	6,3
<b>Leucineinbau (DPM)</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
untransfiziert	1,8 - 3,1	2,4 - 8,5	5,7	13,9
Mockvektor	6,2 - 8,5	3,7 - 6,4	20,2	26,8
AT1R hoch	5,2 - 10,3	3,2 - 13,5	11,0	17,1
AT1R moderat	4,1 - 11,1	2,6 - 13,5	23,6	19,6
<b>Invasionsassay</b>	<b>Intra-Assay-Variabilität</b> (VC in %)		<b>Inter-Assay-Variabilität</b> (VC in %)	
	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
<b>Zellzählung (Zellen/ml)</b>				
untransfiziert	0,9 - 12,5	5,5 - 14,9	21,7	27,4
Mockvektor	6,7 - 7,3	1,4 - 10,0	22,6	20,8
AT1R hoch	6,2 - 8,1	6,9 - 14,2	13,4	18,9
AT1R moderat	4,2 - 13,5	3,4 - 14,5	18,8	29,2
<b>Invasion in %</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
untransfiziert	26,7 - 29,5	5,2 - 25,8	31,1	34,5
Mockvektor	6,4 - 31,6	9,2 - 24,7	33,1	28,6
AT1R hoch	17,5 - 30,5	4,4 - 21,6	32,2	28,6
AT1R moderat	5,3 - 21,9	11,1 - 20,8	34,0	20,4

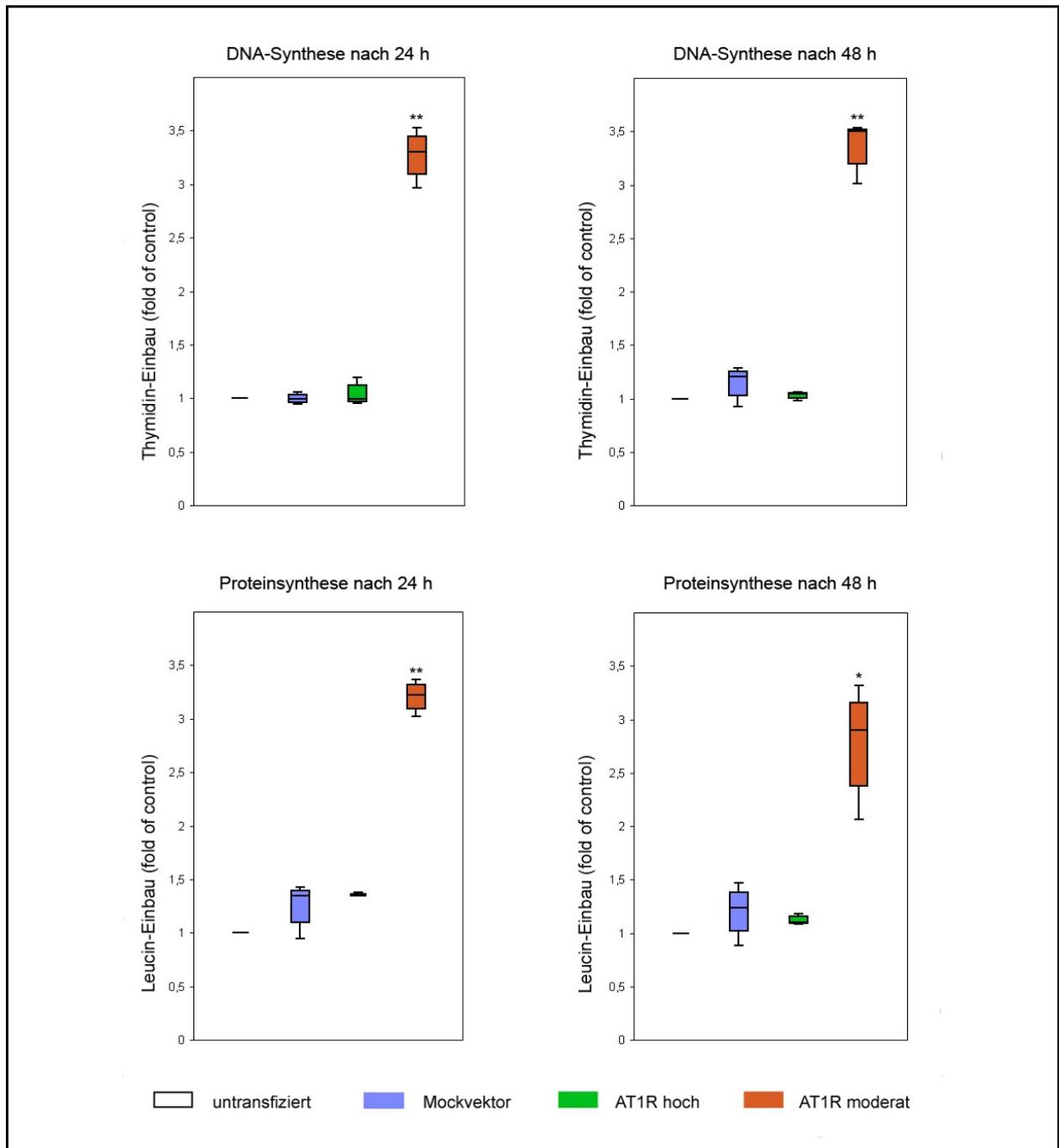
#### **4.1.2 Die AT1R Überexpression steigert die Proliferation**

Für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens kamen vier verschiedene Assays zur Anwendung. Die Anzahl der vorhandenen Zellen wurde mit einem Coulter Counter bestimmt. Die Umsetzung des MTT ermöglichte eine quantifizierende Aussage über den Metabolismus der Zellen. Mittels  $^3\text{H}$ -Thymidinassay wurde die DNA-Synthese und damit die Progression durch den Zellzyklus untersucht. Des Weiteren wurde mit Hilfe des  $^3\text{H}$ -Leucinassays die Proteinsyntheserate bestimmt, um eine differenzierte Aussage zwischen Hypertrophie und Proliferation von Zellen treffen zu können. Die Auswertung der verschiedenen Assays erfolgte nach 24 und 48 Std.

In den Abbildungen 4.1 und 4.2 ist eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten zu sehen. Es zeigt sich für die moderat AT1R überexprimierenden Zellen eine hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) Steigerung der Proliferation gegenüber den Mockvektor transfizierten Zellen. Nach 24 und 48 Std. weisen die moderat AT1R überexprimierenden Zellen sowohl einen gesteigerten MTT-Umsatz als auch eine gesteigerte DNA-Synthese (Thymidineinbau) auf, was mit der signifikanten Erhöhung der Zellzahl korreliert. Die Ergebnisse des Leucinassays zeigen ebenfalls eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Zunahme der Proteinsynthese für die AT1R moderat überexprimierenden Zellen. Die AT1R hoch überexprimierenden Zellen und die untransfizierten Zellen unterscheiden sich weder nach 24 Std. noch nach 48 Std. signifikant im Proliferationsverhalten von den Mockvektor transfizierten Zellen.

Zusätzlich sind in Tabelle 4.2 die entsprechenden Mittelwerte der Absolutzahlen  $\pm$  Standardabweichung und die dazugehörigen p-Werte sowie der Interquartilsabstand (25-75 Perzentile, IQR) aufgeführt. Es bestehen kleinere Differenzen in den Signifikanzniveaus zwischen den Mittelwerten und x-fold-Werten.





**Abb. 4.2: Der Einfluss der AT1R Überexpression auf die Proliferation** Transfizierte und untransfizierte MKN28 Zellen wurden 24 und 48 Std. inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Synthese mittels <sup>3</sup>H-Thymidinassays und die Proteinsynthese mittels <sup>3</sup>H-Leucinassays ermittelt. \*:  $\rho < 0,05$ ; \*\*:  $\rho < 0,01$  ( $\rho$  gegenüber Mockvektor)

Tabelle 4.2: Mittelwerte und Standardabweichung der Proliferationsassays

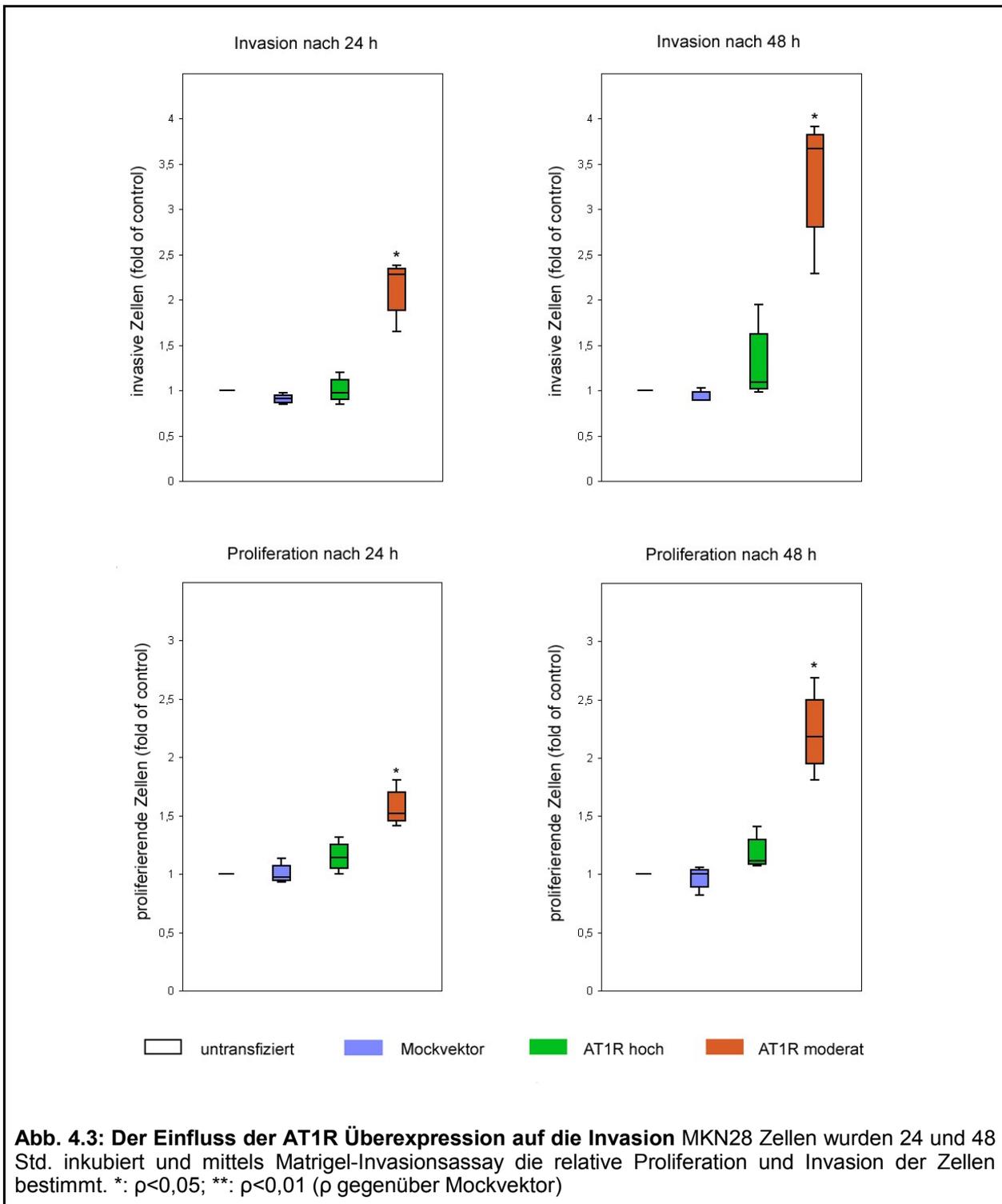
Proliferationsassay	MW $\pm$ SD ( $\rho$ -Wert) (Median [IQR])	
	24 h	48 h
<b>Zellzählung (Zellen/ml)</b>		
untransfiziert	19220 $\pm$ 813 (19300 [18835-19645])	31210 $\pm$ 940 (31210 [30740-31680])
Mockvektor	25858 $\pm$ 7042 (n.s.) (24637 [22072-29034])	40547 $\pm$ 12582 (n.s.) (34797 [33332-44887])
AT1R hoch	30022 $\pm$ 1713 (n.s.) (29700 [29096-30787])	54519 $\pm$ 2482 (n.s.) (54133 [53193-55653])
AT1R moderat	90624 $\pm$ 25109 (0,01) (76920 [76135-98262])	207627 $\pm$ 54017 (< 0,00) (179600 [176492-224749])
<b>MTT-Umsatz (OD<sub>492nm</sub>)</b>		
untransfiziert	0,42 $\pm$ 0,01 (0,42 [0,42-0,43])	0,66 $\pm$ 0,02 (0,67 [0,65-0,67])
Mockvektor	0,51 $\pm$ 0,06 (n.s.) (0,50 [0,48-0,54])	0,76 $\pm$ 0,12 (n.s.) (0,74 [0,69-0,81])
AT1R hoch	0,55 $\pm$ 0,05 (n.s.) (0,56 [0,53-0,58])	0,89 $\pm$ 0,02 (n.s.) (0,90 [0,89-0,90])
AT1R moderat	0,90 $\pm$ 0,07 (< 0,00) (0,91 [0,87-0,94])	1,18 $\pm$ 0,05 (< 0,00) (1,19 [1,15-1,20])
<b>Thymidineinbau (DPM)</b>		
untransfiziert	209309 $\pm$ 25375 (210976 [197058-222393])	300527 $\pm$ 21274 (291158 [288352-308017])
Mockvektor	210836 $\pm$ 40357 (n.s.) (209152 [190250-230580])	338630 $\pm$ 90553 (n.s.) (350435 [296595-3865689])
AT1R hoch	220273 $\pm$ 18008 (n.s.) (227815 [213768-230549])	308034 $\pm$ 29013 (n.s.) (302929 [292421-3210959])
AT1R moderat	678780 $\pm$ 84574 (< 0,00) (656121 [631983-714248])	989583 $\pm$ 46813 (< 0,00) (999171 [968945-1015016])
<b>Leucineinbau (DPM)</b>		
untransfiziert	26078 $\pm$ 1573 (26851 [25560-26983])	59516 $\pm$ 8770 (54853 [54458-62243])
Mockvektor	31356 $\pm$ 11197 (n.s.) (33249 [26291-37368])	73430 $\pm$ 27134 (n.s.) (72791 [59706-86834])
AT1R hoch	29394 $\pm$ 456 (n.s.) (29225 [29130-29573])	81050 $\pm$ 13431 (n.s.) (73822 [73301-85185])
AT1R moderat	70975 $\pm$ 21446 (0,04) (70302 [60087-81526])	191479 $\pm$ 39948 (0,01) (174416 [168656-205770])

### **4.1.3 Die AT1R Überexpression steigert die Invasion**

Die Auswertung der Invasionsassays erfolgte nach 24 und 48 Std. Aus dem Verhältnis invadierter Zellen zur Gesamtzahl (Zellen auf Kontrollplatte) konnte der Prozentsatz invasiver Zellen berechnet werden. Durch die Einbeziehung der Gesamtzellzahl, die auf einer separaten Kontrollplatte ermittelt wird, können mögliche Veränderungen des Proliferationsverhaltens mitberücksichtigt werden.

In Abbildung 4.3 ist eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten zu sehen. Nach 24 und 48 Std. zeigt sich eine signifikant ( $p < 0,05$ ) gesteigerte Invasion der transfizierten Zellen mit moderat überexprimierendem AT1R gegenüber den Mockvektor transfizierten Zellen. Es zeigt sich nach 24 Std. ein 2,5-facher und nach 48 Std. ein 3,5-facher Anstieg der invasiven Zellen gegenüber der Kontrolle. Die AT1R hoch überexprimierenden Zellen und die untransfizierten Zellen unterscheiden sich weder nach 24 Std. noch nach 48 Std. signifikant im Invasionsverhalten von den Mockvektor transfizierten Zellen.

Zusätzlich sind in Tabelle 4.3 die entsprechenden Mittelwerte der Absolutzahlen  $\pm$  Standardabweichung und die dazugehörigen p-Werte sowie der Interquartilsabstand (25-75 Perzentile, IQR) aufgeführt. Es bestehen kleinere Differenzen in den Signifikanzniveaus zwischen den Mittelwerten und x-fold-Werten.



**Tabelle 4.3: Mittelwerte und Standardabweichungen der Invasionsassays**

Invasionsassay	MW $\pm$ SD ( $\rho$ -Wert) (Median [IQR])	
	24 h	48 h
<b>Zellzählung (Zellen/ml)</b>		
untransfiziert	28270 $\pm$ 6676 (26512 [24581-31081])	37451 $\pm$ 10889 (32800 [31230-41347])
Mockvektor	28270 $\pm$ 7239 (n.s.) (31013 [25880-32867])	36384 $\pm$ 15503 (n.s.) (32787 [27891-43079])
AT1R hoch	31815 $\pm$ 2299 (n.s.) (30831 [30499-32629])	44517 $\pm$ 8255 (n.s.) (43991 [40265-48507])
AT1R moderat	44514 $\pm$ 8843 (0,07) (42512 [39678-48349])	82859 $\pm$ 26312 (0,06) (83485 [69862-96169])
<b>Invasion in %</b>		
untransfiziert	2,93 $\pm$ 1,13 (3,48 [2,56-3,58])	4,07 $\pm$ 1,12 (3,92 [3,47-4,5])
Mockvektor	2,61 $\pm$ 0,90 (n.s.) (2,88 [2,24-3,12])	3,86 $\pm$ 1,03 (n.s.) (4,17 [3,44-4,43])
AT1R hoch	2,84 $\pm$ 0,77 (n.s.) (2,86 [2,46-3,23])	5,60 $\pm$ 2,62 (n.s.) (5,01 [4,16-6,73])
AT1R moderat	6,27 $\pm$ 2,09 (0,05) (6,94 [5,43-7,44])	12,23 $\pm$ 2,08 (< 0,00) (12,05 [11,14-13,21])

## 4.2 Diskussion

Zahlreiche experimentelle Studien zeigen eine Aktivierung des lokalen Angiotensin II Systems in einer Vielzahl von Tumoren, einschließlich der Expression von ACE, der Generierung von ANG II durch ACE und der Hochregulierung des AT1R (Deshayes und Nahmias, 2005). Dadurch hat sich in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit vermehrt auf die Rolle des Angiotensin II Systems in der Pathologie maligner Tumoren und der Möglichkeit einer Blockierung dieses Systems als zielgerichtete Therapie in der Behandlung von Malignomen gerichtet (Ino et al., 2006<sub>a</sub>). Der AT1R wird in zahlreichen Tumoren und humanen Tumorzellen exprimiert bzw. hochreguliert, u.a. im Mammakarzinom (de Paepe et al., 2001), Pankreaskarzinom (Lam und Leung, 2002), Larynxkarzinom (Marsigliante et al., 1996), Plattenepithelkarzinom der Haut (Takeda und Kondo, 2001), Prostatakarzinom (Uemura et al., 2006), Zervixkarzinom (Kikkawa et al., 2004) und Ovarialkarzinom (Ino et al., 2006<sub>b</sub>). Es gibt jedoch nur wenige Studien, die die Expression des AT1R im Magenkarzinom analysierten. Huang und Kollegen konnten für das Magenkarzinom zeigen, dass der AT1R sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene verglichen mit normalem Magengewebe hochreguliert wird (Huang et al., 2008<sub>a</sub>). Auch wenn andere experimentelle Untersuchungen keine vermehrte Expression des AT1R im Magenkarzinom gegenüber normalem Gewebe nachweisen konnten (Carl-McGrath et al., 2007<sub>b</sub>), weist die Korrelation zwischen der AT1R Expression und der erhöhten Anzahl an Lymphknotenmetastasen (Röcken et al., 2007) darauf hin, dass der AT1R in Prozesse der Tumorprogression und -metastasierung des Magenkarzinoms involviert ist. Hinweise auf eine Beteiligung des AT1R an wichtigen Funktionen der Tumorbiologie wie Tumorwachstum, -metastasierung und -angiogenese haben sich in einer Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Experimenten angesammelt (Egami et al., 2003, Fujita et al., 2005). In dieser Arbeit sollten bestehende Erkenntnisse zur Bedeutung des AT1R im Magenkarzinom erweitert werden, indem die Mechanismen, durch die das lokale Angiotensin II System seine pathologischen Funktionen im Magenkarzinom vermittelt, genauer untersucht wurden.

## 4.2.1 Methodische Diskussion

### 4.2.1.1 Zellkulturassays

Das *in vitro* Wachstumsverhalten der MKN28 Zellen wurde mit vier verschiedenen Zellkulturassays untersucht. Dabei wurde die Proliferation zum einen durch Zellzählung, zum anderen mittels MTT-Test und <sup>3</sup>H-Thymidinassay kontrolliert. Das Prinzip des MTT-Assays beruht auf der Umsetzung des Tetrazoliumsalzes MTT durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem blauen Formazan-Komplex. Da das Formazan nur von lebenden Zellen gebildet wird, erlaubt dieser Test Aussagen über die Anzahl sowie den Metabolismus vitaler Zellen. Beim <sup>3</sup>H-Thymidinassay wird das <sup>3</sup>H-Thymidin während der Proliferationsphase der Zellen als Nukleotid eingebaut, so dass die DNA-Syntheserate der Zellen bestimmt werden kann. Des Weiteren wurde mit Hilfe des <sup>3</sup>H-Leucinassays die Proteinsyntheserate als Surrogatparameter für die Hypertrophie von Zellen ermittelt. Anhand dieser vier Assays lassen sich in einer Zusammenschau der Ergebnisse (Tabelle 4.4) Rückschlüsse auf die Progression der Zellen durch den Zellzyklus ziehen. Zellproliferation erfordert zunächst den Übertritt von der ruhenden Zelle (G<sub>0</sub>-Phase) über die sogenannte G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklusses, die durch die Synthese von RNA und Proteinen gekennzeichnet ist, in die DNA-Synthesephase (S-Phase) (Sulić et al., 2005). Von der S-Phase tritt die Zelle dann über die G<sub>2</sub>-Phase in die Mitose-Phase (M-Phase) ein, die in die Zellteilung und Proliferation mündet (Sulić et al., 2005). Kommt es zur Blockade der G<sub>1</sub>-Phase bzw. verbleiben die Zellen in dieser Phase des Zellzyklusses („G<sub>1</sub>-Arrest“), resultiert eine Hypertrophie der Zelle. Über den AT<sub>1</sub>R werden sowohl Zellproliferation als auch -hypertrophie vermittelt (de Gasparo et al., 2000, Wolf und Wenzel, 2004). Um daher die genauen Mechanismen der AT<sub>1</sub>R vermittelten Wachstumsantwort – Hypertrophie versus Proliferation – aufzuklären, kamen diese vier verschiedenen Assays zu Anwendung.

**Tabelle 4.4: Interpretation der Zellkulturassays hinsichtlich Hypertrophie vs. Proliferation**

Zellkulturassay	Hypertrophie	Proliferation
Zellzahl	↔	↑
MTT-Umsatz	↔ / ↑	↑
Thymidineinbau	↔	↑
Leucineinbau	↑	↑

↔ = unverändert, ↑ = erhöht

#### 4.2.1.2 Zellkulturbedingungen (Mockvektor und Selektionsmedium)

Die Verwendung von transgenen Zellen wirft zusätzliche Probleme auf, da die stabile Transfektion zu nicht vorhersagbaren sekundären Effekten durch die zufällige Integration des Vektors in das Wirtsgenom führen kann. Aus diesem Grund wurden überdies Zellen mit einem Mockvektor transfiziert und parallel funktionell untersucht. Die Ergebnisse aus den Proliferations- und Invasionsassays zeigen insgesamt, dass das Einbringen des Vektors physiologische Effekte auslöste. Da die Messwerte aber im Bereich der Werte, die für die Kontrolle (untransfizierte Zellen) ermittelt worden waren, lagen und sich keine signifikanten Unterschiede ergaben, kann davon ausgegangen werden, dass die Transfektion des Vektorsystems keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der untersuchten Zellen hatte.

Des Weiteren wurden die stabil transfizierten Zellen kontinuierlich unter einem ständigem Selektionsdruck gehalten. Genetische Veränderungen von Zelllinien in Kultur stellen ein allgemein bekanntes Phänomen dar. Dazu zählt auch der Verlust stabil transfizierter Eigenschaften. Daher wurden die stabil transfizierten Zellen (AT1R und Mockvektor transfiziert) im Gegensatz zur Kontrolle (untransfizierte Zellen) in blasticidinhaltigem Wachstumsmedium kultiviert. Da demnach nur die transfizierten Zellen identische Zellkulturbedingungen aufwiesen, wurden in der statistischen Auswertung der Proliferations- und Invasionsassays bei der Berechnung der Signifikanzniveaus ( $p$ -Wert) die AT1R transfizierten Zellen mit den Mockvektor transfizierten Zellen verglichen. Die dauerhafte Kultivierung unter Selektionsdruck kann jedoch auch von Nachteil sein. Tumorzelllinien sind maligne transformiert. Dabei birgt die dauerhafte Kultivierung unter zusätzlichem Selektionsdruck weitere Mutationsgefahren. Die hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in den Proliferations- und Invasionsassays weist jedoch daraufhin, dass sich die transfizierten Zellen über eine längere Zeit stabil kultivieren ließen.

#### 4.2.1.3 Statistische Auswertung der Zellkulturassays

Bei der Auswertung der Daten zeigten sich Differenzen in den Signifikanzniveaus zwischen den Mittelwerten der Absolutzahlen und denen der  $x$ -fold-Werte. Daher sind zusätzlich zu den Graphiken in tabellarischer Form die entsprechenden Mittelwerte der Absolutzahlen  $\pm$  Standardabweichung und die dazugehörigen  $p$ -Werte aufgeführt. Betrachtet man beispielsweise für die Invasionsassays die Mittelwerte für die Gruppe der AT1R moderat überexprimierenden Zellen, so zeigt sich sowohl nach 24 Std. als

auch nach 48 Std. Inkubation ein Anstieg der invasiven Zellen und der Gesamtzellzahl, der aber erst nach 48 Std. signifikant ( $p < 0,05$ ) ist. Analysiert man für diese Zelllinie die Ergebnisse der einzelnen Invasionsassays (Daten nicht gezeigt), ergibt sich nach 24 Std. eine signifikante ( $p < 0,05$ ) und nach 48 Std. eine hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) Steigerung der Invasion und Proliferation. Die Unterschiede in den Signifikanzniveaus zwischen den Mittelwerten der Absolutzahlen und denen der x-fold-Werte sind durch die Inter-Assay-Variabilitäten zu erklären. Es ergaben sich deutlich höhere Inter-Assay-Variabilitäten als Intra-Assay-Variabilitäten. So lag der Variabilitätskoeffizient für die Intra-Assay-Variabilität durchschnittlich unter 10%, für die Inter-Assay-Variabilität nur unter 20%. Um die höhere Inter-Assay-Variabilität zu kompensieren, wurden daher die Mittelwerte der Absolutzahlen der einzelnen Assays transformiert und als ein Vielfaches an der Kontrolle (fold of control) angegeben. Darüber hinaus verweisen jedoch die niedrigen Intra-Assay- und Inter-Assay-Variabilitäten auf eine optimale Reproduzierbarkeit der Proliferations- und Invasionsassays.

#### **4.2.2 Die AT1R Überexpression und spezielle Aspekte der Tumorbilogie**

Erfolgreiches Tumorwachstum setzt voraus, dass die Tumorzellen verschiedene Eigenschaften entwickeln, um physiologische Sicherungsmechanismen gegen unkontrolliertes und invasives Wachstum auszuschalten (Hanahan und Weinberg, 2000). Dazu zählen die Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, die Unempfindlichkeit gegenüber Tumorsuppressoren, die Umgehung von Apoptose und im Besonderen auch die Fähigkeit der Migration und Degradation extrazellulärer Matrix (Hanahan und Weinberg, 2000). Lokale Angiotensin II Systeme regulieren die Expression zahlreicher Wachstumsfaktoren (Toko et al., 2004, Hsueh et al., 1995) und sind an Vorgängen der Tumormetastasierung, u.a. Zelladhäsion (Berry et al. 2000, Puddefoot et al., 2006), Matrixdegradation (Shah und Catt, 2004, Volpert et al., 1996), Migration und Invasion (Kikkawa et al., 2004, Suganuma et al., 2005, Ishimatsu et al., 2006) beteiligt. Die bisherigen *in vitro* Experimente an Magenkarzinomzellen ergaben bereits Hinweise darauf, dass das lokale Angiotensin II System in Prozesse der Tumorzellproliferation und -invasion involviert ist (Carl-McGrath et al., 2007<sub>b</sub>). Die bestehenden Erkenntnisse sollten erweitert werden. Der mögliche Einfluss des lokalen Angiotensin II Systems auf die *in vitro* Proliferation und -Invasion einer Magenkarzinomzelllinie wurde untersucht, wobei der AT1R in den Zellen unterschiedlich stark zur Expression gebracht wurde.

#### 4.2.2.1 Die AT1R Expression erhöht die Tumorzellproliferation

Durch die eigene Produktion von Wachstumsfaktoren und der Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege sind Tumorzellen in der Lage, unabhängig von physiologischen Wachstumssignalen unkontrolliert zu wachsen, wobei die Zellvermehrung durch das Verhältnis von Proliferation zu Apoptose bestimmt wird. Lokale Angiotensin II Systeme regulieren das Krebswachstum, indem sie die Proliferation induzieren und die Apoptose der Tumorzellen hemmen können. Für einige Zelltypen, u.a. glatte Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten und Fibroblasten, wirkt ANG II selbst als potenter Wachstumsfaktor (Touyz et al., 1999). Des Weiteren erhöht ANG II in vielen Zellen die Expression von Wachstumsfaktoren und wachstumsassoziierter Onkogene (Hsueh et al., 1995). Auch in zahlreichen *in vitro* Tumorzellmodellen stimuliert ANG II die Proliferation humaner Krebszellen, u.a. Pankreaskrebszellen (Fujimoto et al., 2001), Brustkrebszellen (Greco et al., 2003, Muscella et al., 2002), Prostatakrebszellen (Uemura et al., 2003) und Choriokarzinomzellen (Ino et al., 2003). Dabei wird der wachstumsinduzierende Effekt von ANG II größtenteils über den AT1R vermittelt. So konnten AT1R-Blocker, nicht aber selektive AT2R-Blocker die proliferationsstimulierende Wirkung von ANG II in den *in vitro* Experimenten aufheben. Die funktionelle Bedeutung des AT1R für die Tumorzellproliferation von humanen Magenkarzinomzellen wurde mit verschiedenen Zellkulturassays bestätigt. So bewirkte die Überexpression des AT1R in der Magenkarzinomzelllinie MKN28 eine signifikante Erhöhung der Zellproliferation. Die AT1R hochregulierten Zellen zeigten gegenüber untransfizierten Zellen eine erhöhte Thymidin-Inkorporation und einen gesteigerten MTT-Umsatz, was mit einer Erhöhung der absoluten Zellzahl korrelierte. Der AT1R induziert die Zellproliferation humaner Krebszellen durch die Aktivierung komplexer G-Protein gekoppelter intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden, die gewöhnlich mit einer Stimulation der Transkription und Expression von Proteinen, die Wachstum, Proliferation und Apoptose der Zellen kontrollieren, einhergeht (Ino et al., 2006<sub>a</sub>). Ein weiterer entscheidender Mechanismus ist die AT1R vermittelte Transaktivierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (epidermal growth factor rezeptor, EGFR), die in Brustkrebszellen (Greco et al., 2003) und Prostatakrebszellen (Uemura et al., 2003) nachgewiesen werden konnte. Die Aktivierung von EGFR bewirkt die Phosphorylierung von Tyrosinkinase, was nachgeschaltete Signaltransduktionswege initiiert, u.a die Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK), wodurch Tumorzellproliferation

und Apoptosehemmung induziert werden. Darüber hinaus erfolgt über die Transaktivierung des EGFR auch eine GPCR-vermittelte Stimulation der Zellhypertrophie (Asakura et al., 2002, Shah und Catt, 2003), die durch einen erhöhten zellulären Proteingehalt bzw. eine gesteigerte Proteinsyntheserate ohne korrelierenden Anstieg der Zellzahl und DNA-Syntheserate charakterisiert ist (Hannan et al., 2003). Mit Hilfe des <sup>3</sup>H-Leucinassays wurde in dieser Arbeit die Proteinsyntheserate als Surrogatparameter für die Hypertrophie von Zellen bestimmt. Der Anstieg der Proteinsynthese korrelierte dabei mit der Erhöhung der Zellzahl, der DNA-Syntheserate und des MTT-Umsatzes, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Steigerung der Proteinsynthese nicht auf eine Hypertrophie der Zellen zurückzuführen ist. Als wahrscheinliche Mechanismen, über die der AT1R seine pro-proliferative Wirkung in Tumorgeweben ausübt, sind somit neben der gemeinhin bekannten Hemmung der Apoptose (Arrieta et al., 2005) und der Induktion der Angiogenese (Kapitel 4.2.2.2) eine direkte Wachstumsförderung zu diskutieren.

#### *4.2.2.2 Der Einfluss des AT1R auf die Tumorangio-genese*

Ein entscheidender Mechanismus, über den lokale Angiotensin II Systeme das Tumorwachstum fördern, ist die Induktion der Angiogenese. Die Neovaskularisation ist essentiell für das Wachstum, die Aufrechterhaltung und das Metastasierungspotential des entstehenden Tumors (Folkman, 1990). Ausreichend Sauerstoff und die Versorgung mit Nährstoffen sind entscheidend für die Zellfunktion und das Überleben einer Zelle. Ein entstehender Tumor muss daher sein Wachstum sichern, indem er seine eigene Durchblutung durch die Induktion von Blutgefäßen gewährleistet. ANG II induziert die Angiogenese durch die Stimulation wachstumfördernder und proangiogener Faktoren, u.a. „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) (Williams et al., 1995, Pupilli et al., 1999), Angiopoietin (Otani et al., 2001), „basic fibroblast growth factor“ (b-FGF) (Skaletz-Rorowski et al., 2004) und „platelet derived growth factor“ (PDGF) (Ishizaka et al., 2006, Khachigian et al., 2000). Diese Faktoren binden an endotheliale Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, aktivieren damit die Proliferation von normalerweise ruhenden Endothelzellen und induzieren die Neovaskularisation. Lokale Angiotensin II Systeme scheinen auch für die Induktion der Vaskularisierung in Tumoren eine wichtige Rolle zu spielen. Die Blockade dieser Systeme ist häufig mit einer verminderten Expression des proangiogenen Faktors VEGF im Tumor assoziiert (Arrieta et al., 2005, Miyajima et al., 2002, Yoshiji et al., 2001). Die proangiogenen

Effekte von ANG II scheinen dabei zum größten Teil über den AT1R vermittelt zu sein. So bewirkte die ANG II Stimulation eine Hochregulierung und vermehrte Sekretion von VEGF über den AT1R in humanen Ovarialkrebszellen (Suganuma et al., 2005), Endometriumskrebszellen (Watanabe et al., 2003) und Pankreaskrebszellen (Anandanadesan, 2008). In AT1R-knockout Mausmodellen zeigte sich die tumorassoziierte Angiogenese in den AT1R-negativen Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen signifikant vermindert (Egami et al., 2003, Fujita et al., 2005, Imai et al., 2007). Dies war nicht nur von einer reduzierten Expression des VEGF in den Tumorzellen, sondern auch von einer geringeren VEGF-Expression in den tumorassoziierten Fibroblasten und Makrophagen begleitet. Ferner wird der AT1R auch von Endothelzellen neugebildeter kleinster Mikrogefäße exprimiert (Fujita et al., 2002, Miyajima et al., 2002, Uemura et al., 2003). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass der AT1R, der sowohl von Tumorzellen als auch von gewebeständigen Stromazellen (Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen) exprimiert wird, für die Induktion der Angiogenese in der Mikroumgebung des Tumors eine wichtige Rolle spielt. Zusätzlich weisen die Studien auf die Bedeutung einer Aktivierung lokaler Angiotensin II Systeme in den Wirtszellen des Tumorstromas für die Tumorprogression hin.

#### *4.2.2.3 Die AT1R Expression erhöht die Invasivität*

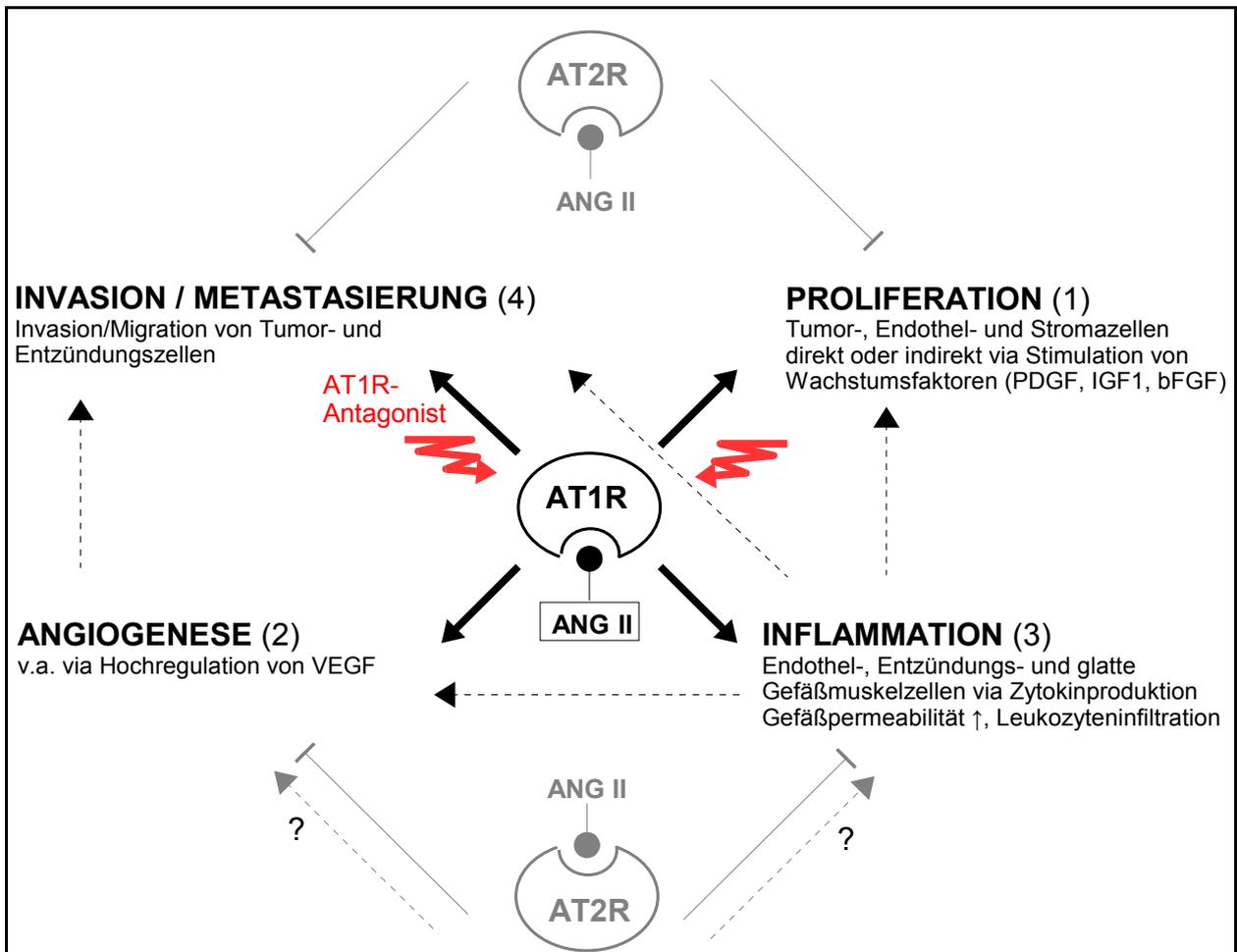
Die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen sind fundamentale Voraussetzungen für eine erfolgreiche Tumorentwicklung und -progression. Sie zählen zu einer der sechs essentiellen zellphysiologischen Alterationen während der Karzinogenese (Hanahan und Weinberg, 2000). Die Bedeutung der lokalen Angiotensin II Systeme für die Tumormetastasierung wird gewöhnlich auf den proangiogenen Effekt von ANG II zurückgeführt (Yoshiji et al., 2001, Fujita et al., 2002). Es zeigt sich jedoch, dass das Angiotensin II System in zusätzliche, für die Metastasierung entscheidende Prozesse involviert ist, u.a. Regulation der Zellmatrix- bzw. Zell-Zell-Interaktion, Förderung von Migration und Invasion sowie Degradation der extrazellulären Matrixproteine. Die Aufhebung der epithelialen Integrität durch Zelladhäsionsverluste und eine gesteigerte Lokomotion der neoplastischen Zelle spielen eine wichtige Rolle in der Tumorzellinvasion und -disseminierung. Der Prozess der Metastasierung setzt voraus, dass sich die Krebszellen durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten aus dem Primärtumorverband lösen, die extrazelluläre Matrix (ECM) durch Proteolyse infiltrieren und durch Eindringen in kleine Blut- und Lymphgefäße in sekundäre Gewebe

transportiert werden. Dies erfordert vor allem dynamische Veränderungen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, um sowohl das Passieren der invasiven Tumorzellen durch das Tumorgewebe als auch die Invasion in neue Gewebe zu gewährleisten. Das bedeutet, dass die Moleküle, die in die Regulation der normalen Zell-Zell-Adhäsion (Cadherine) bzw. Zell-Matrix-Adhäsion (Integrine) involviert sind, entscheidenden Einfluss auf das metastatische Verhalten des Tumors ausüben (Bogenrieder und Herlyn, 2003). Lokale Angiotensin II Systeme scheinen gewebespezifisch die Matrixadhäsion, Migration und Invasion beeinflussen zu können. In humanen Brustkrebszellen reduziert ANG II über den AT1R die Invasion und die Adhäsion an Proteine der extrazellulären Matrix, u.a. Fibronectin, Kollagen und Laminin (Puddefoot et al., 2006). Dabei scheint dieser Effekt durch eine ANG II-induzierte verminderte Expression der Integrine  $\alpha 3$  und  $\beta 1$  bedingt zu sein. Im Gegensatz dazu wird die Invasion humaner Ovarial- (Suganuma et al., 2005), Zervix- (Kikkawa et al., 2004, Suganuma et al., 2004), Chorio- (Ishimatsu et al., 2006, Ino et al., 2003) und Magenkarzinomzellen (Carl-McGrath et al., 2007<sub>b</sub>) durch ANG II gesteigert. Hierbei konnte für den Großteil dieser Krebszellen eindeutig eine AT1R vermittelte Invasionssteigerung nachgewiesen werden. Der Einfluss des AT1R auf die Tumorzellinvasion von Magenkarzinomzellen wurde mit Matrigelinvasionsassays bestätigt. So bewirkte die Überexpression des AT1R in der Magenkarzinomzelllinie MKN28 eine signifikante Erhöhung der Invasion. Die AT1R hochregulierten Zellen zeigten gegenüber untransfizierten Zellen ein gesteigertes invasives Potential. Diese Beobachtungen sind mit anderen Ergebnissen vereinbar. So bewirkte die Hemmung des AT1R in den Magenkarzinomzellen N87 und MKN45 eine deutliche Abnahme der Invasion, wohingegen die Blockade in MKN28 Zellen keine Veränderung des Invasionsverhaltens verursachte (Carl-McGrath et al., 2007<sub>b</sub>). Dies könnte mit dem unterschiedlichen AT1R-Expressionsniveau in den Zellen zusammenhängen. So konnte in N87 und MKN45 im Vergleich zu MKN28 eine weitaus höhere Expression des AT1R nachgewiesen werden (Carl-McGrath et al., 2007<sub>b</sub>).

Die Invasion und Migration von Tumorzellen werden über verschiedene AT1R vermittelte Signaltransduktionswege, die mit einer vermehrten Expression von Wachstumsfaktoren einhergehen, reguliert (Ino et al., 2006<sub>a</sub>). So erhöht ANG II die Invasion von Krebszellen über die Hochregulierung des VEGF (Kikkawa et al., 2004) und des „insulin-like growth factor“ IGF-1 (Yasumaru et al., 2003). Auch die AT1R

vermittelte Transaktivierung des EGFR scheint mit einer gesteigerten Migration und Invasion von humanen Tumorzellen assoziiert zu sein, u.a von Leberkarzinomzellen (Itabashi et al., 2008) und Plattenepithelkarzinomzellen der Kopf-Hals-Region (Gschwind et al., 2002). Die AT1R vermittelte Transaktivierung des EGFR stellt somit einen entscheidenden Faktor für die Tumorbiologie dar, da in einer Vielzahl von Tumoren, u.a. auch im Magenkarzinom, die Überexpression des EGFR mit einer vermehrten Tumorprogression und einem reduziertem Überleben assoziiert ist (Kopp et al., 2003, Kim et al., 2008, Kersting et al., 2006). Angiotensin II Systeme beeinflussen die Tumorzellinvasion und -migration nicht nur über die Regulation von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Adhäsion und über die Expression zahlreicher Wachstumsfaktoren, sondern auch über die Degradation der ECM (Prontera et al., 1999, Volpert et al., 1996). Eine zentrale Rolle im Prozess der Tumorzellinvasion und Metastasierung wird den Matrix-Metalloproteinasen (MMP) zugeschrieben, die neben dem Abbau der ECM sowie von Basalmembranen noch zahlreiche weitere pro-metastatische Funktionen besitzen (Deryugina und Quigley, 2006). Die Degradation der ECM durch MMP stellt einen entscheidenden Schritt während der Invasion, Metastasierung und Angiogenese des Tumors dar. ANG II induziert über den AT1R die MMP-Expression von einigen Zelltypen, u.a. von glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten (Shah et al., 2004, Wang et al., 2005), aber auch von humanen Magenkarzinomzellen (Huang et al., 2008<sub>a</sub>). Des Weiteren konnte in einem Xenograft-Mausmodell humaner Magenkarzinomzellen gezeigt werden, dass die Blockade des lokalen Angiotensin II Systems die Aktivität der MMP hemmt (Williams et al., 2005). In anderen experimentellen Studien war die Inhibierung der MMP mit einer verminderten Tumordinvasion und Metastasierung assoziiert (Prontera et al., 1999). Des Weiteren korrelieren im Magenkarzinom die MMP- und die VEGF-Expression mit dem Tumorwachstum, der lymphatischen und venösen Invasion sowie mit der Lymphknotenmetastasierung (Zheng et al., 2006).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das lokale Angiotensin II System nicht nur über die Induktion der Angiogenese die Invasion und Metastasierung fördert, sondern dass die Expression des AT1R von den Tumorzellen selbst, direkt die Invasion erleichtert und dadurch die Metastasierung begünstigt.



**Abb. 4.4: Die Rolle der Angiotensinrezeptoren AT1R und AT2R in tumorassoziierten Prozessen**  
 Die Komplexität lokaler Angiotensin II Systeme wird durch die Regulation über feedback-Mechanismen sowie Interaktionen physiologischer Prozesse, die durch das lokale Angiotensin II System in der Mikroumgebung von Tumoren induziert werden, zunehmend erhöht. Tumorentwicklung ist ein mehrstufiger Prozess, der 1. Tumorzellproliferation, 2. Angiogenese, um den wachsenden Tumor mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen, 3. Produktion von VEGF und proinflammatorischer Zytokine, die zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und Leukozyteninfiltration führt, ein Prozess, der die Extravasation von Tumorzellen erleichtert und demnach 4. die Invasion und Metastasierung fördert, einschließt. Der Einsatz von AT1R-Antagonisten sollte einen protektiven Effekt auf jeden dieser Schritte der Tumorentwicklung haben. Modifiziert nach Ager et al., 2008

### 4.2.3 AT1R-AT2R-Wechselwirkungen

Interessanterweise zeigten in den Experimenten zum Wachstumsverhalten nicht wie vermutet die Zellen mit der stärksten AT1R Expression den größten Anstieg der Proliferation und Invasion. Nur die AT1R moderat überexprimierenden Zellen wiesen eine signifikant gesteigerte Proliferation und Invasion im Vergleich zu den Mockvektor transfizierten Zellen auf. Bei den AT1R hoch exprimierenden Zellen war zwar tendenziell ein Anstieg der Proliferation zu beobachten, der aber statistisch gesehen nie signifikante Werte erreichte und bei weitem nicht an die Ausmaße der moderat überexprimierenden Zellen heranreichte. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass zusätzliche Faktoren die Wirkung des AT1R modulieren können. Eine große Rolle scheint dabei dem AT2R zuzukommen (Nouet und Nahmias, 2000). So scheint der AT2R viele Funktionen des AT1R zu antagonisieren, indem er proliferationshemmend und apoptoseinduzierend wirkt (Dinh et al., 2001). Auf funktioneller Ebene sowie auf der Ebene der intrazellulären Signaltransduktionswege existiert ein negativer Cross-Talk zwischen dem AT2R und dem AT1R, wodurch der AT2R verschiedene physiologische und pathophysiologische Funktionen des AT1R modulieren kann (Nouet und Nahmias, 2000). Transfektionsexperimente zeigen, dass durch Überexpression des AT2R die wachstumsstimulierenden Effekte des AT1R aufgehoben werden können (Nakajima et al., 1995). Dennoch scheint der AT2R nicht alle Funktionen des AT1R zu antagonisieren. So gibt es beispielsweise Hinweise darauf, dass der AT2R pro-inflammatorische und Angiogenese fördernde Funktionen ausübt (Wolf, 2002, Sarlos et al., 2003). Dass der AT2R prinzipiell eine zum AT1R entgegengesetzte Wirkung aufweist, sollte daher kritisch gesehen werden. Vielmehr scheint die Balance zwischen den exprimierten Rezeptorsubtypen und den intrazellulären Signalwegen den proliferativen und angiogenen Phänotyp der Zelle zu bestimmen. Das Wechselspiel zwischen dem AT1R und AT2R scheint für die komplexen ANG II vermittelten Wirkungen verantwortlich. Expressionsanalysen an Magenkarzinomzellen haben gezeigt, dass auch MKN28 Zellen den AT2R exprimieren (Carl-McGrath et al., 2007<sub>b</sub>). Es ist somit möglich, dass in Magenkarzinomzellen funktionelle Wechselwirkungen zwischen den Angiotensinrezeptoren bestehen und die Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den AT1R hoch und moderat überexprimierenden Zellen auf solche zurückzuführen sind. Dies wirft die Frage auf, welche Auswirkungen die Hochregulation des AT1R auf die AT2R Expression in den transfizierten Zellen hat

und ob Unterschiede im AT1R-AT2R-Verhältnis zwischen den einzelnen transfizierten Gruppen existieren. In glatten Gefäßmuskelzellen führte die Überexpression des AT2R zu einer Herabregulation des AT1R und einer Hemmung der Proliferation unabhängig von einer ANG II Bindung (Jin et al., 2002). Dies weist daraufhin, dass komplexe Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Rezeptoren existieren und sie sich möglicherweise gegenseitig in ihrer Expression regulieren. Da ANG II mit der gleichen Affinität an die beiden Rezeptorsubtypen bindet, hängt die Zellantwort entscheidend von dem relativen Rezeptor-Expressionsniveau der beiden Subtypen ab. Es ist somit möglich, dass es durch die Überexpression des AT1R zu Veränderungen im AT1R/AT2R-Expressionsprofil der transfizierten Zellen gekommen ist, die zu der unterschiedlichen Invasions- und Proliferationsantwort geführt haben. Weitere Expressionsanalysen zur Untersuchung des AT2R mittels quantitativer *real-time* PCR könnten diese Vermutungen bestätigen.

#### 4.2.3.1 *Modulation der AT1R Funktion durch Hochregulation des AT2R*

Im Gegensatz zum AT1R erfolgt nach ANG II Bindung weder eine Desensibilisierung und Internalisierung des AT2R (Hein et al., 1997) noch wird durch Hemmung der Transkription die Expression des AT2R auf der Zelloberfläche verringert. Vielmehr stimuliert der AT2R seine eigene Expression sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene (Shibata et al., 1997, Li et al., 1999). Darüber hinaus können Zellkulturbedingungen die Expression des Rezeptors stark beeinflussen. So ist in proliferierenden Zellen die AT2R-Dichte nur sehr gering, während die Aktivität des Rezeptors und die Rezeptordichte rapide zunimmt, wenn die Zellen ein konfluentes Stadium erreicht haben (de Gasparo et al., 2000). Dabei ist für die Funktion des AT2R die Bindung des Liganden ANG II nicht obligat, sondern das Überschreiten einer bestimmten kritischen Rezeptordichte auf der Zelloberfläche ist für die Signalwirkung des AT2R ausreichend (Miura und Karnik, 2000). Diese Befunde können zu einer Erklärung der Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den AT1R hoch und moderat überexprimierenden Zellen dienen. So kann der fehlende Proliferationsanstieg der AT1R hoch exprimierenden Zellen aus einer vermehrten AT2R-Dichte auf der Zelloberfläche herrühren, die den wachstumsstimulierenden AT1R vermittelten Signalen entgegenwirkt. Im Gegensatz dazu wird bei den moderat exprimierenden Zellen die Rezeptordichte, die zu einer ANG II unabhängigen Signalwirkung des AT2R nötig ist, nicht erreicht. Die Regulation der Expression des AT2R ist jedoch weitaus

komplexer als nur eine inverse Relation zur Zellproliferation. Zusätzlich können verschiedene Wachstumsfaktoren, die Aktivierung des AT1R und die Stimulation des AT2R Einfluss auf die Expression nehmen (de Gasparo et al., 2000). Natürlich müssen gezielte Untersuchungen zum AT1R-AT2R-Verhältnis in den transfizierten Zellen, beispielsweise mittels immunhistochemischen Nachweises der Rezeptorsubtypen, diese Vermutungen bestätigen.

#### *4.2.3.2 Modulation der AT1R Funktion durch Dimerisierung*

GPCR wurden lange Zeit als funktionelle Monomere angesehen. Neueste Ergebnisse haben aber gezeigt, dass eine Vielzahl von GPCR die Fähigkeit zur Heterodimerisierung besitzen (Breitwieser, 2004) und sie darüber die Signalwirkung ihrer Peptide, u.a. Bradikinin und ANG II modulieren. Dabei verstärkt die Heterodimerisierung mit dem Bradikininrezeptor die ANG II induzierte Aktivität des AT1R (AbdAlla et al., 2000). Im Gegensatz dazu bewirkt die Heterodimerbildung des AT1R mit dem AT2R, dass bestimmte Funktionen und Signaltransduktionswege des AT1R antagonisiert werden (AbdAlla et al., 2001). Interessanterweise erfolgte die AT2R vermittelte Hemmung des AT1R unabhängig von einer ANG II Stimulation, was auf eine konstitutive Aktivität des AT2R schließen lässt. Die Bildung von Homo- und Heterodimeren der GPCR verkompliziert die Wechselwirkungen zwischen AT1R und AT2R noch weiter, da sie den stöchiometrischen Verhältnissen, in denen die Rezeptoren zueinander stehen, ein größeres Gewicht bei der Betrachtung der Rezeptorfunktion verleiht (Milligan et al., 2003). Es ist somit denkbar, dass durch die starke Überexpression des AT1R in den Magenkarzinomzellen eine Heterodimerbildung des AT1R mit dem AT2R induziert wurde und dadurch der proliferationsfördernde Effekt der AT1R Hochregulierung, der in den AT1R moderat überexprimierenden Zellen zu sehen ist, antagonisiert wurde. Welche Auswirkungen die Blockierung des AT2R mit selektiven Antagonisten auf das Proliferationsverhalten der AT1R hoch exprimierenden Zellen hätte, ist diesbezüglich eine interessante Frage. Weitere Versuchsreihen müssen dies klären.

### 4.3 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des lokalen Angiotensin II Systems auf die Tumorzellprogression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des AT1R die Proliferation und Invasion in der Magenkarzinomzelllinie MKN28 stimuliert. Andere *in vitro* Experimente zeigen eine ANG II vermittelte Erhöhung der Invasion in Magenkarzinomzellen und die Abschwächung der Invasion durch ACE-Hemmer, AT1R- und AT2R-Antagonisten (Carl-McGrath et al., 2007<sub>b</sub>). Der Einsatz von Inhibitoren der Komponenten des lokalen Angiotensin II Systems wird bereits als neue Strategie in der Therapie und Prävention von Tumoren angesehen (Abali et al., 2002, Lindberg et al., 2004, Ino et al., 2006<sub>a</sub>). Auch in der Behandlung des Magenkarzinoms könnten sich AT1R-Blocker als nützlich erweisen. Um die Entwicklung solcher Behandlungsformen voranzutreiben, sollten weitere *in vitro* und auch in *in vivo* Untersuchungen zur Hemmung des lokalen Angiotensin II Systems im Magenkarzinom erfolgen.

## 5 Zusammenfassung

Das Magenkarzinom ist weltweit der vierthäufigste bösartige Tumor des Menschen. Trotz rückläufiger Inzidenz ist die Letalitätsrate unverändert hoch. Um die schlechte Prognose zu verbessern, benötigt es dringend eine frühere Diagnose und ein größeres Spektrum an therapeutischen Optionen. Zahlreiche epidemiologische Studien sowie *in vitro* und *in vivo* Experimente zeigen, dass das lokale Angiotensin II System, das aus ANG I, ANG II, ACE und den beiden Rezeptoren AT1R und AT2R besteht, in der Pathogenese maligner Tumoren eine entscheidende Rolle spielt und medikamentös beeinflussbar ist. Neueste Studien belegen die Beteiligung des lokalen Angiotensin II Systems auch in der Tumorbilogie des Magens.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Zellkulturmodell die pathophysiologischen Mechanismen, mit denen das lokale Angiotensin II System in die Biologie des Magenkarzinoms eingreift, zu identifizieren und zu charakterisieren. Mittels stabilen Gentransfers wurde eine Magenkarzinomzelllinie etabliert, die den AT1R verschieden stark überexprimiert. Anschließend wurde der Einfluss der unterschiedlichen AT1R Expression auf das Proliferations- und Invasionsverhalten dieser Zellen untersucht.

Die Zellkulturexperimente konnten zeigen, dass der AT1R das Tumorwachstum von Magenkarzinomzellen beeinflusst. Die Überexpression des AT1R-Gens in der Magenkarzinomzelllinie MKN28 bewirkte eine signifikant gesteigerte Proliferation und Invasion. Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass das lokale Angiotensin II System die Tumorprogression und -metastasierung nicht nur durch eine allgemein anerkannte Induktion der Angiogenese fördert, sondern dass die Expression des AT1R direkt das Wachstum der Tumorzellen stimuliert und die Invasion erleichtert. Allerdings ist festzuhalten, dass keine lineare Gen-Dosis-Wirkung vorliegt. Zusätzliche Faktoren scheinen die Wirkung des AT1R zu modulieren.

Die *in vitro* Experimente an Magenkarzinomzellen belegen die tumorbiologische Relevanz des lokalen Angiotensin II Systems und kennzeichnen dieses System als potentielle Zielstruktur für die Behandlung des Magenkarzinoms. Zusätzliche *in vivo* Untersuchungen müssen klären, ob sich die Hemmung des lokalen Angiotensin II Systems als neue therapeutische Strategie in der Behandlung des Magenkarzinoms eignet.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abali H, Güllü IH, Engin H, Haznedaroglu IC, Erman M, Tekuzman G (2002) Old antihypertensives as novel antineoplastics: angiotensin-I-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Medical Hypotheses* 59:344-348
- AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U (2001) The Angiotensin II AT2 Receptor Is an AT1 Receptor Antagonist. *The Journal of Biological Chemistry* 276:39721–39726
- AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U (2000) AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 407:94-98
- Ager EI, Neo JH, Christophi C (2008) The renin–angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis* 29:1675-1684
- Anandanadesan R, Gong Q, Chipitsyna G, Witkiewicz A, Yeo CJ, Arafat HA (2008) Angiotensin II Induces Vascular Endothelial Growth Factor in Pancreatic Cancer Cells Through an Angiotensin II Type 1 Receptor and ERK1/2 Signaling. *Journal of gastrointestinal surgery* 12:57-66
- Arrieta O, Guevara P, Escobar E, Garcia-Navarrete R, Pineda B, Sotelo J (2005) Blockage of angiotensin II type I receptor decreases the synthesis of growth factors and induces apoptosis in C6 cultured cells and C6 rat glioma. *British Journal of Cancer* 92:1247-1252
- Arrieta O, Pineda-Olvera B, Guevara-Salazar P, Hernández-Pedro N, Morales-Espinosa D, Cerón-Lizarraga T, González-De la Rosa CH, Rembao D, Segura-Pacheco B, Sotelo J (2008) Expression of AT1 and AT2 angiotensin receptors in astrocytomas is associated with poor prognosis. *British journal of cancer* 99:160-166
- Asakura M, Kitakaze M, Takashima S, Liao Y, Ishikura F, Yoshinaka T, Ohmoto H, Node K, Yoshino K, Ishiguro H, Asanuma H, Sanada S, Matsumura Y, Takeda H, Beppu S, Tada M, Hori M, Higashiyama S (2002) Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nature medicine* 8:35-40
- Atlas SA (2007) The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. *Journal of managed care pharmacy* 13:9-20
- Aurello P, D'Angelo F, Rossi S, Bellagamba R, Cicchini C, Nigri G, Ercolani G, De Angelis G, Ramacciato G (2007) Classification of Lymph Node Metastasis from Gastric Cancer: Comparison between N-Side and N-Number Systems. Our Experience and Review of the Literature. *The American Surgeon* 73:359-366
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds) (2003) *Current protocols in molecular biology*, Vol 3. John Wiley & Sons, New York
- Bader M, Ganten D (2008) Update on tissue renin–angiotensin systems. *Journal of molecular medicine* 86:615–621
- Batenburg WW, Danser Jan AH (2008) The (pro)renin receptor: a new addition to the renin-angiotensin system? *European journal of pharmacology* 585:320-324

- Belova LA (2000) Angiotensin II-generating enzymes. *Biochemistry* 65:1337-1345
- Berry MG, Goode AW, Puddefoot JR, Vinson GP, Carpenter R (2000) Integrin beta1 upregulation in MCF-7 breast cancer cells by angiotensin II. *European journal of surgical oncology* 26:25-29
- Birchall JC, Kellaway IW, Mills SN (1999) Physico-chemical characterisation and transfection efficiency of lipid-based gene delivery complexes. *International journal of pharmaceutics* 183:195-207
- Bissell MJ, Radisky D (2001) Putting Tumors In Context. *Nature reviews. Cancer* 1:46-54
- Bogenrieder T, Herlyn M (2003) Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 22:6524-6536
- Boktov J, Hirsch-Lerner D, Barenholz Y (2007) Characterization of the interplay between the main factors contributing to lipoplex-mediated transfection in cell cultures. *Journal of gene medicine* 9:884-893
- Breitwieser GE (2004) G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circulation research* 94:17-27
- Brenner H, Arndt V, Stegmaier C, Ziegler H, Rothenbacher D (2004) Is *Helicobacter pylori* Infection a Necessary Condition for Noncardia Gastric Cancer? *American Journal of Epidemiology* 159:252–258
- Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, Yokota J, Wiesner GL, Powell SM, Lewis FR, Huntsman DG, Pharoah PD, Jankowski JA, MacLeod P, Vogelsang H, Keller G, Park KG, Richards FM, Maher ER, Gayther SA, Oliveira C, Grehan N, Wight D, Seruca R, Roviello F, Ponder BA, Jackson CE (1999) Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *Journal of Medical Genetics* 36:873-880
- Campbell DJ (2008) Critical review of prorenin and (pro)renin receptor research. *Hypertension* 51:1259-1264
- Carey RM, Siragy HM (2003) Newly Recognized Components of the Renin-Angiotensin System: Potential Roles in Cardiovascular and Renal Regulation. *Endocrine Reviews* 24:261–271
- Carl-McGrath S, Ebert M, Lendeckel U, Röcken C (2007<sub>b</sub>) Expression of the Local Angiotensin II System in Gastric Cancer May Facilitate Lymphatic Invasion and Nodal Spread. *Cancer Biology & Therapy* 6:1-9
- Carl-McGrath S, Ebert M, Röcken C (2007<sub>a</sub>) Gastric adenocarcinoma: epidemiology, pathology and pathogenesis. *Cancer Therapy* 5:1-17
- Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye S-Y, Mendelsohn FAO, Jenkins TA, Albiston AL (2004) The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61:2728–2737
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805
- Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A (1989) Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:2617-2621

- Chu G, Hayakawa H, Berg P (1987) Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Research* 15:1311-1326
- Chu YQ, Ye ZY, Tao HQ, Wang YY, Zhao ZS (2008) Relationship between cell adhesion molecules expression and the biological behavior of gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 14:1990-1996
- Correa P (1992) Human Gastric Carcinogenesis: A Multistep and Multifactorial Process -- First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Research* 52:6735-6740
- Crew KD, Neugut AI (2006) Epidemiology of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* 12: 354-362
- Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC (2004) Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 33:95-103
- Danesh J (1999) Helicobacter pylori infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 13:851-856
- Danser Jan AH (2003) Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35:759-768
- De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T (2000) International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacological Reviews* 52:415-472
- De Paepe B, Verstraeten VLRM, De Potter CR, Vakaet LAM-L, Bullock GR (2001) Growth stimulatory angiotensin II type-1 receptor is upregulated in breast hyperplasia and in situ carcinoma but not in invasive carcinoma. *Histochemistry and cell biology* 116:247-254
- Deryugina EI, Quigley JP (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer metastasis reviews* 25:9-34
- Deshayes F, Nahmias C (2005) Angiotensin receptors: a new role in cancer? *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 16:293-299
- Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME (2001) Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clinical Science* 100:481-492
- Ebert MP, Lendeckel U, Westphal S, Dierkes J, Glas J, Folwaczny C, Roessner A, Stolte M, Malfertheiner P, Röcken C (2005) The Angiotensin I-Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism Is Linked to Early Gastric Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 14:2987-2989
- Egami K, Murohara T, Shimada T, Sasaki K-i, Shintani S, Sugaya T, Ishii M, Akagi T, Keda HI, Matsuishi T, Imaizumi T (2003) Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *The Journal of clinical investigation* 112:67-75
- Ernst PB, Gold BD (2000) The Disease Spectrum of Helicobacter Pylori: The Immunopathogenesis of Gastrointestinal Ulcer and Gastric Cancer. *Annual Review of Microbiology* 54:615-640

- Farr A, Roman A (1991) A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency. *Nucleic Acids Research* 20:920
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:7413-7417
- Ferrario CM, Chappell MC (2004) Novel angiotensin peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61:2720–2727
- Fleming I, Kohlstedt K, Busse R (2006) The tissue renin–angiotensin system and intracellular signalling. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 15:8–13
- Folkman J (1990) Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer metastasis reviews* 9:171-174
- Freshney RI (ed) (2005) *Culture of animal cells, a manual of basic technique*, Vol 5. Wiley-Liss, New York
- Friis S, Sørensen HT, Mellemejkær L, McLaughlin JK, Nielsen GL, Blot WJ, Olsen JH (2001) Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and the Risk of Cancer: A Population-Based Cohort Study in Denmark. *Cancer* 92:2462-2470
- Fujimoto Y, Sasaki T, Tsuchida A, Chayama K (2001) Angiotensin II type 1 receptor expression in human pancreatic cancer and growth inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist. *FEBS letters* 495:197-200
- Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Fukamizu A, Itoman M, Majima M (2005) Angiotensin type 1a receptor signaling-dependent induction of vascular endothelial growth factor in stroma is relevant to tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Carcinogenesis* 26:271-279
- Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Itoman M, Majimaa M (2002) Blockade of angiotensin AT1a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294:441-447
- Garcia M, Jemal A, Ward E, Center M, Hao Y, Siegel R, Thun M (2007) *Global Cancer Facts & Figures 2007*, GA:American Cancer Society, Atlanta
- Gravalos C, Jimeno A (2008) HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Annals of Oncology* 19:1523–1529
- Greco S, Muscella A, Elia MG, Salvatore P, Storelli C, Mazzotta A, Manca C, Marsigliante S (2003) Angiotensin II Activates Extracellular Signal Regulated Kinases via Protein Kinase C and Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Cancer Cells. *Journal of cellular physiology* 196:370–377
- Gretschel S, Kemmner W, Schlag PM (2001) Prognosefaktoren beim Magenkarzinom. *Onkologie* 7:623-631
- Gschwind A, Prenzel N, Ullrich A (2002) Lysophosphatidic Acid-induced Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation and Motility Involves Epidermal Growth Factor Receptor Signal Transactivation. *Cancer Research* 62:6329-6336

- Hajek D, Tomiskab M, Krahulcovab E, Druckmullerc M, Florianovaa M, Izakovicova-Hollaa L, Vachaa J (2003) I/D ACE gene polymorphism in survival of leukemia patients – hypothesis and pilot study. *Medical Hypotheses* 61:80-85
- Hall JE (2003) Historical Perspective of the Renin–Angiotensin System. *Molecular Biotechnology* 24:27-39
- Hamilton SR, Aaltonen LA (eds) (2000) Pathology and Genetics. Tumours of the Digestive System. WHO Classification of Tumours, Vol 2. IARC Press: Lyon
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100:57–70
- Hannan RD, Jenkins A, Jenkins AK, Brandenburger Y (2003) Cardiac hypertrophy: a matter of translation. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 30:517-527
- Haulica I, Bild W, Serban DN (2005) Angiotensin Peptides and their Pleiotropic Actions. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 6:121-131
- Hein L, Meinel L, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK (1997) Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Journal of molecular endocrinology* 11:1266-1277
- Hollon T, Yoshimura FK (1989) Variation in enzymatic transient gene expression assays. *Analytical biochemistry* 182:411-418
- Hsueh WA, Do YS, Anderson PW, Law RE (1995) Angiotensin II in cell growth and matrix production. *Advances in experimental medicine and biology* 377:217-223
- Hu J, Liu S, Wang J, Luo X, Gao X, Xia X, Feng Y, Tao D, Wang G, Li X, Zhao J, H D, Reed E, Li QQ, Gong J (2005) Overexpression of the N-terminal end of the p53 a regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase blocks cell cycle progression in gastric carcinoma cells. *International journal of oncology* 26:1321-1327
- Huang W, Wu YL, Zhong J, Jiang FX, Tian XL, Yu LF (2008<sub>b</sub>) Angiotensin II type 1 receptor antagonist suppress angiogenesis and growth of gastric cancer xenografts. *Digestive diseases and sciences* 53:1206-1210
- Huang W, Yu LF, Zhong J, Qiao MM, Jiang FX, Du F, Tian XL, Wu YL (2008<sub>a</sub>) Angiotensin II type 1 receptor expression in human gastric cancer and induces MMP2 and MMP9 expression in MKN-28 cells. *Digestive diseases and sciences* 53:163-168
- IARC (1994) Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 61:1-241
- Imai N, Hashimoto T, Kihara M, Yoshida S-i, Kawana I, Yazawa T, Kitamura H, Umemura S (2007) Roles for host and tumor angiotensin II type 1 receptor in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. *Laboratory Investigation*:189-198
- Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Nawa A, Nomura S, Kikkawa F (2006<sub>a</sub>) Manipulating the angiotensin system – new approaches to the treatment of solid tumours. *Expert Opinion on Biological Therapy* 6:243-255

- Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Yamamoto E, Nagasaka T, Nawa A, Nomura S, Kikkawa F (2006<sub>b</sub>) Angiotensin II type 1 receptor expression in ovarian cancer and its correlation with tumour angiogenesis and patient survival. *British Journal of Cancer* 94:552-560
- Ino K, Uehara C, Kikkawa F, Kajiyama H, Shibata K, Suzuki T, Khin EE, Ito M, Takeuchi M, Itakura A, Mizutani S (2003) Enhancement of Aminopeptidase A Expression during Angiotensin II-Induced Choriocarcinoma Cell Proliferation through AT1 Receptor Involving Protein Kinase C- and Mitogen-Activated Protein Kinase Dependent Signaling Pathway. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88:3973-3982
- Ishimatsu S, Itakura A, Okada M, Kotania T, Iwase A, Kajiyama H, Ino K, Kikkawa F (2006) Angiotensin II Augmented Migration and Invasion of Choriocarcinoma Cells Involves PI3K Activation Through the AT1 Receptor. *Placenta* 27:58-591
- Ishizaka N, Matsuzaki G, Saito K, Noiri E, Mori I, Nagai R (2006) Expression and localization of PDGF-B, PDGF-D, and PDGF receptor in the kidney of angiotensin II-infused rat. *Laboratory Investigation* 86:1285-1292
- Itabashi H, Maesawa C, Oikawa H, Kotani K, Sakurai E, Kato K, Komatsu H, Nitta H, Kawamura H, Wakabayashi G, Masuda T (2008) Angiotensin II and epidermal growth factor receptor cross-talk mediated by a disintegrin and metalloprotease accelerates tumor cell proliferation of hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatology Research* 38:601-613
- Jin X-Q, Fukuda N, Su J-Z, Lai Y-M, Suzuki R, Tahira Y, Ikeda Y, Kanmatsuse K, Miyazaki H (2002) Angiotensin II Type 2 Receptor Gene Transfer Downregulates Angiotensin II Type 1a Receptor in Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension* 39:1021-1027
- Kamineni A, Williams MA, Schwartz SM, Cook LS, Weiss NS (1999) The incidence of gastric carcinoma in Asian migrants to the United States and their descendants. *Cancer Causes and Control* 10:77-83
- Kaplan JC, Kahn A, Chelly J (1992) Illegitimate transcription: its use in the study of inherited disease. *Human mutation* 1:357-360
- Kersting C, Kuijper A, Schmidt H, Packeisen J, Liedtke C, Tidow N, Gustmann C, Hinrichs B, Wülfing P, Tio J, Boecker W, van Diest P, Brandt B, Buerger H (2006) Amplifications of the epidermal growth factor receptor gene (egfr) are common in phyllodes tumors of the breast and are associated with tumor progression. *Laboratory Investigation* 86:54-61
- Khachigian LM, Takawa Y, Collins T (2000) Mechanisms of angiotensin II-induced platelet derived growth factor gene expression. *Molecular and Cellular Biochemistry* 212:183-186
- Kikkawa F, Mizuno M, Shibata K, Kajiyama H, Morita T, Ino K, Nomura S, Mizutani S (2004) Activation of invasiveness of cervical carcinoma cells by angiotensin II. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190:1258-1263
- Kim MA, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH (2008) EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. *Histopathology* 52:738-746

- Koch-Brandt C (1993) Nichtvirale Gentransfersysteme - Schicksal der Fremd-DNA in der Wirtszelle. In: Koch-Brandt C (ed) Gentransfer: Prinzipien-Experimentelle-Anwendung. Georg Thieme, Stuttgart, New York, p 50-53
- Koh WP, Yuan JM, Sun CL, van den Berg D, Seow A, Lee HP, Yu MC (2003) Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Gene Polymorphism and Breast Cancer Risk among Chinese Women in Singapore. *Cancer Research* 63:573-578
- Kopp R, Rothbauer E, Ruge M, Arnholdt H, Spranger J, Muders M, Pfeiffer DG, Schildberg FW, Pfeiffer A (2003) Clinical implications of the EGF receptor/ligand system for tumor progression and survival in gastrointestinal carcinomas: evidence for new therapeutic options. *Recent results in cancer research* 162:115-132
- Korf U, Løbke C, Haller F, Pouska A, Sültmann H (2007) Reverse Phase-Proteinarrays in der Krebsforschung. *BIOspektrum* 13:736-738
- Kosaka T, Miyajima A, Takayama E, Kikuchi E, Nakashima J, Ohigashi T, Asano To, Sakamoto M, Okita H, Murai M, Hayakawa M (2007) Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist as An Angiogenic Inhibitor in Prostate Cancer. *The Prostate* 67:41-49
- Kosugi M, Miyajima A, Kikuchi E, Horiguchi Y, Murai M (2006) Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist Candesartan as an Angiogenic Inhibitor in a Xenograft Model of Bladder Cancer. *Clinical Cancer Research* 12:2888-2893
- Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczek W (2006) The Physiological Significance Of The Alternative Pathways Of Angiotensin II Production *Journal Of Physiology And Pharmacology* 57:529-539
- Lam KY, Leung PS (2002) Regulation and expression of a renin–angiotensin system in human pancreas and pancreatic endocrine tumours. *European Journal of Endocrinology* 146: 567-572
- Lang L (2006) ACE Inhibitors May Reduce Esophageal Cancer Incidence. *Gastroenterology* 131:343-344
- Lavoie JL, Sigmund CD (2003) Minireview: Overview of the Renin-Angiotensin System — An Endocrine and Paracrine System. *Endocrinology* 144:2179–2183
- Leung PS (2004) The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs. *Current protein & peptide science* 5:267-273
- Leung PS (2007) The physiology of a local renin–angiotensin system in the pancreas. *The Journal of physiology* 580:31-37
- Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacKinnon PL, Meredith PA, Murray LS, Reid JL, Robertson JWK (1998) Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* 352:179-184
- Li CI, Malone KE, Weiss NS, Boudreau DM, Cushing-Haugen KL, Daling JR (2003) Relation between Use of Antihypertensive Medications and Risk of Breast Carcinoma among Women Ages 65–79 Years. *Cancer* 1504-1513
- Li JY, Avallet O, Berthelon MC, Langlois D, Saez JM (1999) Transcriptional and translational regulation of angiotensin II type 2 receptor by angiotensin II and growth factors. *Endocrinology* 140:4988-4994

- Lindberg H, Nielsen D, Jensen BV, Eriksen J, Skovsgaard T (2004) Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors for Cancer Treatment? *Acta Oncologica* 43:142-152
- Lindholm LH, Anderson H, Ekblom T, Hansson L, Lanke J, Dahlöf B, de Faire U, Forsén K, Hedner T, Linjer E, Scherstén B, Wester P-O, Möller TR (2001) Relation between drug treatment and cancer in hypertensives in the Swedish Trial in Old Patients with Hypertension 2: a 5-year, prospective, randomised, controlled trial. *Lancet* 358:539-544
- Liotta LA, Kohn EC (2001) The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature* 411:275-379
- Liu YJ, Yan PS, Li J, Jia JF (2005) Expression and significance of CD44s, CD44v6, and nm23 mRNA in human cancer. *World Journal of Gastroenterology* 11:6601-6606
- Lordick F, Schulze T (2008) Molekulare Prognosefaktoren und neue systemische Therapien bei Magenkarzinomen. *Der Onkologe* 14:389-395
- Louis SN, Wang L, Chow L, Rezmann L, Imamura K, MacGregor DP, Casely D, Catt KJ, Frauman AG, Louis WJ (2007) Appearance of angiotensin II expression in non-basal epithelial cells is an early feature of malignant change in human prostate. *Cancer detection and prevention* 31:391-395
- Marsigliante S, Resta L, Muscella A, Vinson GP, Marzullo A, Storelli C (1996) AT1 angiotensin II receptor subtype in the human larynx and squamous laryngeal carcinoma. *Cancer letters* 110:19-27
- Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Lobo F, Morais A, Oliveira J, Lopes C (2004) Linkage of angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism to the progression of human prostate cancer. *The Journal of pathology* 202:330-335
- Milligan G, Ramsay D, Pascal G, Carrillo JJ (2003) GPCR dimerisation. *Basic life sciences* 74:181-188
- Miura S, Karnik SS (2000) Ligand-independent signals from angiotensin II type 2 receptor induce apoptosis. *The EMBO Journal* 19:4026-4035
- Miyajima A, Kosaka T, Asano To, Asano T, Seta K, Kawai T, Hayakawa M (2002) Angiotensin II Type I Antagonist Prevents Pulmonary Metastasis of Murine Renal Cancer by Inhibiting Tumor Angiogenesis. *Cancer Research* 62:4176-4179
- Miyazaki M, Takai S (2006) Tissue Angiotensin II Generating System by Angiotensin-Converting Enzyme and Chymase. *Journal of Pharmacological Sciences* 100:391-397
- Mori M, Sakaguchi H, Akazawa K, Tsuneyoshi M, Sueishi K, Sugimachi K (1995) Correlation between metastatic site, histological type, and serum tumor markers of gastric carcinoma. *Human pathology* 26:504-508
- Murnane JP, Yezzi MJ, Young BR (1990) Recombination events during integration of transfected DNA into normal human cells. *Nucleic Acids Research* 18:2733-2738
- Muscella A, Greco S, Elia MG, Storelli C, Marsigliante S (2002) Angiotensin II stimulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase activity and cell growth by calcium-independent pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Endocrinology* 173:315-323

- Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ (1995) The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:10663-10667
- Neo JH, Malcontenti-Wilson C, Muralidharan V, Christophi C (2007) Effect of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in a mouse model of colorectal cancer liver metastases. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22:577-584
- Ng P, Baker MD (1999) The Molecular Basis of Multiple Vector Insertion by Gene Targeting in Mammalian Cells. *Genetics* 151:1143-1155
- Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD (2002) Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *The Journal of clinical investigation* 109:1417-1427
- Nouet S, Nahmias C (2000) Signal Transduction from the Angiotensin II AT2 Receptor. *Trends in endocrinology and metabolism* 11:1-6
- Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Honda Y (2001) Angiotensin II Induces Expression of the Tie2 Receptor Ligand, Angiopoietin-2, in Bovine Retinal Endothelial Cells. *Diabetes* 50:867-875
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) *Global Cancer Statistics, 2002*. CA: A Cancer Journal for Clinicians 55:74-108
- Paul M, Mehr AP, Kreutz R (2006) Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiological reviews* 86:747-803
- Potter H, Weir L, Leder P (1984) Enhancer-dependent expression of human Kc immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:7161-7165
- Prontera C, Mariani B, Rossi C, Poggi A, Rotilio D (1999) Inhibition of gelatinase A (MMP-2) by batimastat and captopril reduces tumor growth and lung metastases in mice bearing Lewis lung carcinoma. *International journal of cancer* 81:761-766
- Puddefoot JR, Udeozo UKI, Barker S, Vinson GP (2006) The role of angiotensin II in the regulation of breast cancer cell adhesion and invasion. *Endocrine-Related Cancer* 13:895-903
- Pupilli C, Lasagni L, Romagnani P, Bellini F, Mannelli M, Misciglia N, Mavilia C, Vellei U, Villari D, Serio M (1999) Angiotensin II stimulates the synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human mesangial cells. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* 10:245-255
- Re RN (2004) Tissue renin angiotensin systems. *The Medical Clinics Of North America* 88:19-38
- Remaut K, Sanders NN, Fayazpour F, Demeester J, De Smedt SC (2006) Influence of plasmid DNA topology on the transfection properties of DOTAP/DOPE lipoplexes. *Journal of controlled release* 115:335-343

- Röcken C, Lendeckel U, Dierkes J, Westphal S, Carl-McGrath S, Peters B, Krüger S, Malfertheiner P, Roessner A, Ebert M (2005) The Number of Lymph Node Metastases in Gastric Cancer Correlates with the Angiotensin I-Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism. *Clinical Cancer Research* 11:2526-2530
- Röcken C, Röhl FW, Diebler E, Lendeckel U, Pross M, Carl-McGrath S, Ebert MP (2007) The Angiotensin II/Angiotensin II Receptor System Correlates with Nodal Spread in Intestinal Type Gastric Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16:1206-1212
- Ronquist G, Rodríguez LA, Ruigómez A, Johansson S, Wallander MA, Frithz G, Svärdsudd K (2004) Association between captopril, other antihypertensive drugs and risk of prostate cancer. *The Prostate* 58:50-56
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J (2001) Proinflammatory actions of angiotensins. *Current opinion in nephrology and hypertension* 10:321-329
- Sakurai F, Inoue R, Nishino Y, Okuda A, Matsumoto O, Taga T, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M (2000) Effect of DNA/liposome mixing ratio on the physicochemical characteristics, cellular uptake and intracellular trafficking of plasmid DNA/ cationic liposome complexes and subsequent gene expression. *Journal of Controlled Release* 66:255-269
- Sambrook J, Russel D (eds) (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Vol 3. Cold Spring Harbor, New York
- Santos RA, Ferreira AJ (2007) Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Current opinion in nephrology and hypertension* 16:122-128
- Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:8258-8263
- Sarlos S, Rizkalla B, Moravski CJ, Cao Z, Cooper ME, Wilkinson-Berka JL (2003) Retinal angiogenesis is mediated by an interaction between the angiotensin type 2 receptor, VEGF, and angiopoietin. *The American journal of pathology* 163:879-887
- Scartozzi M, Galizia E, Freddari F, Berardi R, Cellerino R, Cascinu S (2004) Molecular biology of sporadic gastric cancer: prognostic indicators and novel therapeutic approaches. *Cancer Treatment Reviews* 30:451-459
- Schrimpf G (2002) *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, Vol 3. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin
- Shah BH, Catt KJ (2004) Matrix metalloproteinase-dependent EGF receptor activation in hypertension and left ventricular hypertrophy. *Trends in endocrinology and metabolism* 15:241-243

- Shang J, Peña AS (2005) Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* 11:4131-4139
- Shibata K, Makino I, Shibaguchi H, Niwa M, Katsuragi T, Furukawa T (1997) Up-regulation of angiotensin type 2 receptor mRNA by angiotensin II in rat cortical cells. *Biochemical and biophysical research communications* 239:633-637
- Skaletz-Rorowski A, Pinkernell K, Sindermann JR, Schriever C, Müller JG, Eschert H, Breithardt G (2004) Angiotensin AT1 receptor upregulates expression of basic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor receptor and coreceptor in human coronary smooth muscle cells. *Basic research in cardiology* 99:272-278
- Smith GR, Missailidis S (2004) Cancer, inflammation and the AT1 and AT2 receptors. *Journal of Inflammation* 1:3-14
- Suganuma T, Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Nagasaka T, Mizutani S, Kikkawa F (2005) Functional Expression of the Angiotensin II Type1Receptor in Human Ovarian Carcinoma Cells and Its BlockadeTherapy Resulting in Suppression of Tumor Invasion, Angiogenesis, and Peritoneal Dissemination. *Clinical cancer research* 11:2686-2694
- Suganuma T, Ino K, Shibata K, Nomura S, Kajiyama H, Kikkawa F, Tsuruoka N, Mizutani S (2004) Regulation of aminopeptidase A expression in cervical carcinoma: role of tumor–stromal interaction and vascular endothelial growth factor. *Laboratory Investigation*:639-648
- Sulić S, Panić L, Dikić I, Volarević S (2005) Deregulation of Cell Growth and Malignant Transformation. *Croatian medical journal* 46:622-638
- Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J (2003) Inflammation and angiotensin II. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35:881–900
- Taal BG, van Loon HJ, Kahn N, de Jong D, Vasen HF, van 't Veer LJ (1999) The role of genetic factors in the development of gastric cancer. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 143:342-346
- Takeda H, Kondo S (2001) Differences between Squamous Cell Carcinoma and Keratoacanthoma in Angiotensin Type-1 Receptor Expression. *American Journal of Pathology* 158:1633-1637
- Toko H, Zou Y, Minamino T, Masaya M, Harada M, Nagai T, Sugaya T, Terasaki F, Kitaura Y, Komuro I (2004) Angiotensin II type 1a receptor is involved in cell infiltration, cytokine production, and neovascularization in infarcted myocardium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24:664-670
- Touyz R, Deng L, He G, Wu X, Schiffrin E (1999) Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *Journal of hypertension* 17:907-916
- Tsugane S (2005) Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer: Epidemiologic evidence. *Cancer Science* 96:1-6
- Uemura H, Hasumi H, Ishiguro H, Teranishi J-i, Miyoshi Y, Kubota Y (2006) Renin-Angiotensin Systems an Important Factor in Hormone Refractory ProstateCancer. *The Prostate* 66:822-830

- Uemura H, Ishiguro H, Nakaigawa N, Nagashima Y, Miyoshi Y, Fujinami K, Sakaguchi A, Kubota Y (2003) Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: A possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor. *Molecular Cancer Therapeutics* 2:1139-1147
- Vieth M, Stolte M (2006) Elevated risk for gastric adenocarcinoma can be predicted from histomorphology. *World Journal of Gastroenterology* 12:6109-6114
- Volpert OV, Ward WF, Lingen MW, Chesler L, Solt DB, Johnson MD, Molteni A, Polverini PJ, Bouck NP (1996) Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats. *European journal of clinical investigation* 98:671-679
- Wang M, Zhang J, Spinetti G, Jiang L, Monticone R, Zhao D, Cheng L, Krawczyk M, Talan M, Pintus G, Lakatta EG (2005) Angiotensin II activates matrix metalloproteinase type II and mimics age-associated carotid arterial remodeling in young rats. *The American journal of pathology* 167:1429-1442
- Watanabe Y, Shibata K, Kikkawa F, Kajiyama H, Ino K, Hattori A, Tsujimoto M, Mizutani S (2003) Adipocyte-Derived Leucine Aminopeptidase Suppresses Angiogenesis in Human Endometrial Carcinoma via Renin-Angiotensin System. *Clinical Cancer Research* 9:6497-6503
- Williams B, Baker AQ, Gallacher B, Lodwick D (1995) Angiotensin II Increases Vascular Permeability Factor Gene Expression by Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension* 25:913-917
- Williams RN, Parsons SL, Morris TM, Rowlands BJ, Watson SA (2005) Inhibition of matrix metalloproteinase activity and growth of gastric adenocarcinoma cells by an angiotensin converting enzyme inhibitor in in vitro and murine models. *European journal of surgical oncology* 31:1042-1050
- Wittekind C, Klimpfinger M, Sobin LH (eds) (2005) TNM Atlas. Illustrierter Leitfaden zur TNM/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren, Vol 5. Springer, Berlin Heidelberg, New York
- Wolf G (2002) "The road not taken": role of angiotensin II type 2 receptor in pathophysiology. *Nephrology, dialysis, transplantation* 17:195-198
- Wolf G, Wenzel UO (2004) Angiotensin II and Cell Cycle Regulation. *Hypertension* 43:693-698
- Wurm FM (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology* 22:1393-1398
- Würtele H, Little K, Chartrand P (2003) Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Therapy* 10:1791-1799
- Xu J, Carretero OA, Lin CX, Cavasin MA, Shesely EG, Yang JJ, Reudelhuber TL, Yang XP (2007) Role of cardiac overexpression of ANG II in the regulation of cardiac function and remodeling postmyocardial infarction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 293:1900-1907
- Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shutoh M, Nakayama H (2005) Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* 8:86-94

- 
- Yasumaru M, Tsuji S, Tsujii M, Irie T, Komori M, Kimura A, Nishida T, Kakiuchi Y, Kawai N, Murata H, Horimoto M, Sasaki Y, Hayashi N, Kawano S, Hori M (2003) Inhibition of angiotensin II activity enhanced the antitumor effect of cyclooxygenase-2 inhibitors via insulin-like growth factor I receptor pathway. *Cancer Research* 63:6726-6734
- Yasumatsu R, Nakashima T, Masuda M, Ito A, Kuratomi Y, Nakagawa T, Komune S (2004) Effects of the angiotensin-I converting enzyme inhibitor perindopril on tumor growth and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Journal of cancer research and clinical oncology* 130:567-573
- Yokota T, Ishiyama S, Saito T, Teshima S, Narushima Y, Murata K, Iwamoto K, Yashima R, Yamauchi H, Kikuchi S (2004) Lymph node metastasis as a significant prognostic factor in gastric cancer: a multiple logistic regression analysis. *Scandinavian journal of gastroenterology* 39:380-384
- Yoshiji H, Kuriyama S, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H (2001) The Angiotensin-I-converting Enzyme Inhibitor Perindopril Suppresses Tumor Growth and Angiogenesis: Possible Role of the Vascular Endothelial Growth Factor. *Clinical Cancer Research* 7:1073-1078
- Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Niwa H, Tsuneyama K, Y T (2006) Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Anticancer Research* 26:3579-3583
- Zhou X, Huang L (1994) DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochimica et biophysica acta* 1189:195-203

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Absorption
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ANG	Angiotensin
AP	Aminopeptidase
AT1R	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
AT2R	Angiotensin II Rezeptor Typ 2
b-FGF	„basic fibroblast growth factor“
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>++</sup>	Calcium
CAGE	Chemostatin-sensitives Angiotensin II -generierendes Enzym
CD	„cluster of differentiation“
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci, mCi	Curie, Milli-Curie
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CP	Carboxypeptidase
Cp-Wert	„Crossing Point“
CT-Wert	„Treshhold-Cycle“
d.h.	das heißt
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPM	„desintegrations per minute“
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	„elongation factor“

---

EGF	„epidermal growth factor“
EGFR	„epidermal growth factor receptor“
ELISA	„enzyme-linked-immunosorbent-assay“
ERK	Extrazellulär Regulierte Kinase
et al.	et altera
FAP	familiäre adenomatöse Polypose
FCS	Fötales Kälberserum
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
<i>H.p.</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HCL	Salzsäure
HER-2-Rezeptor	„human epidermal growth factor receptor 2“
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses Kolon-Karzinom-Syndrom
I/D	Insertation/Deletion
IARC	„international agency for research of cancer“
IGF-1	„insulin-like growth factor 1“
IQR	Interquartilsabstand
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
lacZ	β-Galactosidase
LB	„Luria-Bertani“
LW	Leerwert
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
MasR	Mas Rezeptor
MBq	Megabequerell
MCS	„multiple cloning site“
Mg <sup>++</sup> , MgCl <sub>2</sub>	Magnesium, Magnesiumchlorid
MGW	Molekulargewichtsmarker
Min.	Minute
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid

MW	Molekulargewicht; Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
Neo	Neomycin
OD	optische Dichte
p	Promotor
P/R-R	Prorenin/Renin Rezeptor
p53	Wachstumssuppressorprotein p53
PBS	„Phosphat Buffered Saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	„platelet derived growth factor“
PFA	Paraformaldehyd
PK	Positivkontrolle
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute media formulation“
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RTase	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
Std.	Stunde
TAE	Trisamoniummethan-Ethylendiamintetraacetat
TCA	Trichloressigsäure
TNM-System	Klassifikation des Tumors, der Lymphknoten und der Metastasen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
UICC	„International Union Against Cancer“
UV	ultraviolett
V	Volt
VC	Variabilitätskoeffizient
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
VEGFR	„vascular endothelial growth factor receptor“
vs.	versus
WHO	„World Health Organisation“
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1 Das lokale Angiotensin II System
- Abb. 2.1 Darstellung des Reporterplasmids pEGFP-N1
- Abb. 2.2 Darstellung des Vektorrückrads und der linearisierten MCS des Zielvektors pEF-DEST51 und der Expressionsvektoren pEF-DEST51/agtr1 bzw. pEF/GW-51/lacZ
- Abb. 3.1 Überprüfung der Plasmidaufreinigung
- Abb. 3.2 Linearisierung der Plasmide pEF-DEST51/agtr1 und pEF/GW-51/lacZ
- Abb. 3.3 Transiente Transfektion des Reporterplasmids pEGFP-N1 in MKN28 Zellen
- Abb. 3.4 AT1R mRNA Expression in AT1R transient transfizierten und untransfizierten MKN28 Zellen
- Abb. 3.5 Blasticidin-Wirkungskurve für MKN28 Zellen
- Abb. 3.6 RT-PCR zur Evaluation der AT1R mRNA Expression nach stabiler Transfektion mit dem Vektor pEF-DEST51/agtr1
- Abb. 3.7 Quantifizierung der AT1R mRNA Expression in stabil transfizierten Zellklonen
- Abb. 3.8 Quantifizierung der pEF mRNA Expression in stabil transfizierten Zellklonen
- Abb. 4.1 Der Einfluss der AT1R Überexpression auf die Proliferation
- Abb. 4.2 Der Einfluss der AT1R Überexpression auf die Proliferation
- Abb. 4.3 Der Einfluss der AT1R Überexpression auf die Invasion
- Abb. 4.4 Die Rolle der Angiotensinrezeptoren AT1R und AT2R in tumorassoziierten Prozessen

## 7.3 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1.1 klinische TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms
- Tabelle 1.2 UICC-Stadiengruppierung basierend auf der TNM-Klassifikation
- Tabelle 2.1 Primerdetails
- Tabelle 2.2 RT-PCR-Bedingungen
- Tabelle 2.3 *real-time* PCR-Bedingungen
- Tabelle 3.1 Transfektionsmatrix mit den entsprechenden Transfektionsraten
- Tabelle 3.2 Optimierte Transfektionsbedingungen
- Tabelle 4.1 Intra-Assay-Variabilität und Inter-Assay-Variabilität
- Tabelle 4.2 Mittelwerte und Standardabweichung der Proliferationsassays
- Tabelle 4.3 Mittelwerte und Standardabweichung der Invasionsassays
- Tabelle 4.4 Interpretation der Zellkulturassays hinsichtlich Hypertrophie vs. Proliferation

#### **7.4 Lebenslauf**

Ein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

**7.5 Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Maxi Wass, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Der Einfluss des Angiotensin II Rezeptor Typ I auf die Tumorzellproliferation und -invasion der Magenkarzinomzelllinie MKN28“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

## **7.6 Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin angefertigt. Herrn Prof. Dr. med. Manfred Dietel danke ich für die Möglichkeit, die Doktorarbeit an dem unter seiner Leitung stehenden Institut durchführen zu können.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christoph Röcken für die freundliche Überlassung des Themas und die jederzeit herzliche und interessierte Betreuung meiner Arbeit.

Diese Arbeit ist Teil eines Projektes, das von der Wilhelm Sander-Stiftung gefördert wird und für deren finanzielle Unterstützung ich mich gern bedanken möchte.

Weiterhin danke ich Stacy Carl-McGrath für die intensive, ausdauernde und freundliche Unterstützung bei allen methodischen und inhaltlichen Fragen sowie für die kritische Durcharbeitung meiner Arbeit.

Ein großer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Röcken für die freundliche Atmosphäre, die Hilfe und die Aufmunterungen während der praktischen Phase dieser Arbeit. Ganz besonderem Dank bin ich Sandra Krüger verpflichtet, die mich in die allgemeinen Labortechniken eingeführt hat und ohne deren große Hilfe und ständigen Anregungen diese Arbeit nicht denkbar gewesen wäre.

Mein ganz privater Dank gilt meinen Freunden, die mich in jeder Lebenslage unterstützt haben, für ihre Geduld und ihr großes Verständnis. Ein besonderes Dankeschön geht an Wilma Roth und Rosa Ritter für die Bearbeitung meiner Graphiken und Fotos sowie an meinen Freund Matthias Buhl für die stets liebevolle Unterstützung.