



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
am 20.11.2003, gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. F. Czubayko

Korreferent: Prof. Dr. U. Wagner

Meinen Eltern

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Allgemeiner Teil.....</b>	<b>5</b>
1.1.1. Wachstumsfaktoren	
1.1.2. Angiogenese	
1.1.3. Therapeutische Ansätze	
1.1.4. Diagnostische Möglichkeiten	
<b>1.2. Spezieller Teil.....</b>	<b>7</b>
1.2.1. FGF-Wachstumsfaktoren	
1.2.2. FGF-1 und FGF-2	
1.2.2.1. Biologische Funktionen von FGF-1 und FGF-2	
1.2.2.2. Sekretion von FGF-1 und FGF-2	
1.2.3. Das FGF-Bindeprotein (FGF-BP)	
1.2.3.1. FGF-BP in proliferativen Geweben	
1.2.3.2. FGF-BP in Neoplasien	
1.2.3.3. Struktur und Eigenschaften von FGF-BP	
<b>1.3. Aufgabenstellung.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Materialien, Chemikalien und Laborgeräte.....</b>	<b>18</b>
2.1.1. Materialien und Chemikalien	
2.1.2. Laborgeräte	
2.1.3. Standardlösungen, Puffer und andere Rezepturen	

<b>2.2. Methoden in der Zellkultur.....</b>	<b>21</b>
2.2.1. Handhabung und Kultivierung von Sf-9 Zellen	
2.2.2. Transfektion von Sf-9 Zellen mit gereinigter FGF-2 Bacmid-DNA	
2.2.3. Infektion der Sf-9 Zellen mit Baculoviren	
2.2.4. Softagar-Wachstums-Assay	
2.2.5. Proliferations-Assay	
<b>2.3. Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.3.1. Affinitätsreinigung von rekombinalem Bv-(FGF-BP)/ Bv-(FGF-2) über Ni-Metallchelate-Affinitätschromatographie	
2.3.2. Bestimmung von Proteinkonzentrationen	
2.3.3. Deglykosylierung von rekombinatem FGF-BP	
2.3.4. Gießen von 12%-SDS-Gelen	
2.3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
2.3.6. Coomassie-Färbung	
<b>2.4. Immunchemische Methoden.....</b>	<b>31</b>
2.4.1. Reinigung polyklonaler Anti-FGF-BP IgGs durch Protein A - Sepharose	
2.4.2. Western-Blot	
2.4.3. Immunhistochemie	
2.4.3.1. Beurteilung der Färbeintensität der Prostata-Ca-Schnitte	
2.4.3.2. Korrelation der Färbeintensitäten der Prostata-Ca-Schnitte mit Patientendaten	
<b>2.5. Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>36</b>
2.5.1. Transformation von DH10Bac kompetenten Zellen mit HTa/FGF- 2-Plasmid	
2.5.2. Reinigung von rekombinanter Bacmid-DNA	
2.5.3. DNA-Konzentrationsmessung mittels Spektralphotometer	

2.5.4.	PCR mit gereinigter Bacmid-DNA	
2.5.5.	Agarose-Gelelektrophorese	
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1.</b>	<b>Etablierung der Suspensionskultur von Sf-9 Insektenzellen.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2.</b>	<b>Vergleich von Adhäsionskultur und Suspensionskultur.....</b>	<b>41</b>
<b>3.3.</b>	<b>Expression von FGF-2 durch Transfektion von Sf-9 Zellen.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4.</b>	<b>Doppelinfection von Sf-9 Zellen mit Bv-FGF-2 und Bv-(FGF-BP)..</b>	<b>46</b>
<b>3.5.</b>	<b>Deglykosilierung von Bv-(FGF-BP).....</b>	<b>48</b>
<b>3.6.</b>	<b>Parakrine Aktivität von Bv-(FGF-BP) auf Tumorzellen.....</b>	<b>50</b>
<b>3.7.</b>	<b>Proliferation von Endothelzellen durch Bv-(FGF-BP).....</b>	<b>52</b>
<b>3.8.</b>	<b>Immunhistochemische Anfärbung von FGF-BP auf Prostata-Ca-Schnitten.....</b>	<b>54</b>
<b>3.9.</b>	<b>Korrelation der Färbeintensitäten der Prostata-Ca-Schnitte mit Patientendaten.....</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1.</b>	<b>Vergleich von Adhäsions- und Suspensionskultur.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.</b>	<b>Untersuchung des Bindeverhaltens von Bv-(FGF-BP) und Bv-(FGF-2).....</b>	<b>59</b>
<b>4.3.</b>	<b>Deglykosilierung von Bv-(FGF-BP).....</b>	<b>61</b>

<b>4.4. Parakrine Aktivität von Bv-(FGF-BP) auf Tumorzellen.....</b>	<b>62</b>
<b>4.5. Proliferation von Endothelzellen durch Bv-(FGF-BP).....</b>	<b>63</b>
<b>4.6. Nachweis von FGF-BP auf Prostata-Ca-Schnitten.....</b>	<b>64</b>
<b>4.7. Korrelation der Färbeintensitäten der Prostata-Ca-Schnitte mit Patientendaten.....</b>	<b>65</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>8. Publikationsliste.....</b>	<b>85</b>
<b>9. Akademische Lehrer.....</b>	<b>86</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>87</b>

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1. Allgemeiner Teil**

Die maligne Entartung von Zellen und die daraus folgende Entstehung von Tumoren stellen eine akute Bedrohung des menschlichen Organismus dar. Durch Raumforderung, destruierendes Einwachsen in angrenzende Organsysteme und Metastasierung entwickeln bösartige Tumoren ein lebensbedrohliches Potential.

Die schlechte Prognose vieler Krebserkrankungen und die u.a. durch eine immer älter werdende Bevölkerung steigenden Inzidenzraten machen die Suche nach neuen Therapie- und Diagnoseverfahren besonders dringlich.

#### **1.1.1. Wachstumsfaktoren**

Ein möglicher Therapieansatz zielt auf die spezifische Hemmung bestimmter Polypeptide (sog. Wachstumsfaktoren) ab. Von Interesse sind in diesem Zusammenhang diejenigen malignen Erkrankungen, in deren Zellen die Expression dieser Wachstumsfaktoren abnorm hochreguliert ist, und die Identifikation limitierender Faktoren für den jeweiligen Tumortyp.

Die unterschiedlichen Faktoren stimulieren auf verschiedene Weise das ungehemmte Wachstum von Tumoren in vivo bzw. von Tumorzellkolonien in vitro.

#### **1.1.2. Angiogenese**

Neben der autokrinen/parakrinen Wachstumsstimulation der Tumorzellen fördern einige Wachstumsfaktoren, in diesem Zusammenhang auch Angiogenesefaktoren genannt, die Vaskularisierung von Tumoren. Dadurch machen sie ein Wachstum eines Tumors über eine bestimmte Größe hinaus überhaupt erst möglich.

Sobald eine Neoplasie einen Durchmesser von mehr als ca. 150  $\mu\text{m}$  erreicht hat, kann Diffusion allein diesen Tumor nicht mehr ernähren. Um weiteres Wachstum möglich zu machen, müssen zu seiner Versorgung neue Kapillaren und Gefäße gebildet werden (Jain, 1988; Folkman et al., 1989; Folkman, 1990).



Bei diesem Vorgang, Angiogenese genannt, handelt es sich um einen hochgradig regulierten Prozess, der u.a. in der Embryogenese und bei der Wundheilung physiologisch ist. Er erfordert ein koordiniertes Zusammenspiel von Proteasen, Angiogenesefaktoren und Angiogenesehemmern.

Um die Gefäßneubildung möglich zu machen, verschiebt sich zunächst das Gleichgewicht der beteiligten Faktoren zugunsten der Angiogenese. Proteasen degradieren lokal die Basalmembran der existierenden Gefäße und verdauen die extrazelluläre Matrix der umliegenden Zellen. Durch die Angiogenesefaktoren stimuliert, sprossen Endothelzellen in das Gewebe ein, bilden zunächst Lumen und Verzweigungen und schließlich komplette Gefäße mit Basalmembran.

Um ein krankhaftes Überschießen dieses Prozesses zu vermeiden, wird das Gleichgewicht wieder zugunsten der Anti-Angiogenese, also den Angiogenesehemmern verschoben (Folkman und Shing, 1992).

Durch die Vaskularisierung eines Tumors wird aber nicht nur die Voraussetzung für dessen weiteres Wachstum geschaffen, sondern auch die Grundlage für eine hämatogene Metastasierung gelegt (Weidner et al., 1991).

Die Ausbildung von Fernmetastasen im Körper verschlechtert die Prognose vieler Krebserkrankungen dramatisch, was die zentrale Rolle der Angiogenese in diesem Zusammenhang unterstreicht.

### **1.1.3. Therapeutische Ansätze**

Gelänge es nun, die Gefäßneubildung durch spezifisches Blockieren von geeigneten Wachstumsfaktoren mit angiogenetischen Eigenschaften zu hemmen, könnte das eine potente Therapie für maligne Erkrankungen darstellen.

Da im erwachsenen, gesunden Gewebe die Angiogenese kaum eine Rolle spielt, wäre mit gravierenden Nebenwirkungen wie bei bekannten Therapien wohl nicht zu rechnen.

Außerdem würden durch das Blockieren eines Wachstumsfaktors neben seinen angiogenetischen Eigenschaften auch seine möglichen anderen, direkt wachstumsfördernden Eigenschaften auf Tumorzellen blockiert werden.

Zur Zeit werden bereits verschiedene Inhibitoren der Angiogenese als Medikamente bei neoplastischen Erkrankungen in klinischen Studien der Phasen I-III erprobt wie z.B. Angiostatin, Thalidomid und VEGF-Inhibitoren (Soff,

2000; Thomas und Kantarjian, 2000; Griffioen und Molema, 2000). Eine regelmäßig aktualisierte Auflistung aller Angiogenese-Inhibitoren, die momentan Gegenstand klinischer Studien sind, findet sich auf der Internetseite des National Cancer Institute ([http://www.cancer.gov/clinical\\_trials](http://www.cancer.gov/clinical_trials)).

#### **1.1.4. Diagnostische Möglichkeiten**

Zudem könnte das bessere Verständnis der Prozesse und Faktoren, die zur Angiogenese und dem Wachstum von Tumoren führen, auch neue Möglichkeiten im diagnostischen Bereich eröffnen.

So sind bereits verschiedene zumeist im Serum gemessene Faktoren, sogenannte Tumormarker, im klinischen Alltag gebräuchlich, deren Nachweis und Kontrolle Aussagen über Existenz und Verlauf von bestimmten Tumorerkrankungen zulassen. Vor allem die Verlaufskontrolle spielt in diesem Zusammenhang in der Klinik eine wichtige Rolle.

Einige dieser Marker sind typisch für ein bestimmtes Gewebe wie PSA für Prostatakrebs oder AFP und HCG für Keimzelltumoren, andere wie CA 15.3, CA 125, CEA oder Cytokeratine sind weniger spezifisch, da Erhöhungen ihrer Serumlevel bei verschiedenen neoplastischen Erkrankungen gefunden werden (Ugrinska et al., 2002; Lamerz, 1999).

Könnte man nun einem oder mehreren Angiogenesefaktoren eine zentrale Rolle beim Wachstum eines bestimmten Tumors zuordnen, wäre man über den Nachweis dieser Faktoren wohlmöglich in der Lage, diese als Tumormarker zu verwenden.

## **1.2. Spezieller Teil**

### **1.2.1. FGF-Wachstumsfaktoren**

Unter den verschiedenen Angiogenesefaktoren ist die Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (fibroblast growth factors, FGFs) von großer Bedeutung.

Zurzeit sind über 20 verschiedene FGFs bekannt, FGF-1 – FGF-20, welche große Homologien in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen (Ago et al. 1991;

Zhang et al. 1991; Powers et al., 2000). Auch ist ihnen eine hohe Affinität zu Heparin und zu heparinähnlichen Glykosaminoglykanen gemeinsam (Burgess und Maciag 1989; Powers et al., 2000).

FGFs steuern verschiedene Entwicklungsprozesse, zeigen neurotrophe Aktivität und regen die Angiogenese in Tumoren und bei der Wundheilung an (Folkman und Klagsbrun, 1987; Burgess und Maciag, 1989; Baird und Böhlen, 1990; Compagni et al., 2000). Außerdem induzieren sie die Zellteilung und die chemotaktische und angiogenetische Aktivität von Zellen mesodermalen und neuroektodermalen Ursprungs (Basilico und Moscatelli, 1992).

Überexpression und Nachweisbarkeit von FGFs wurden bei verschiedenen Tumoren beobachtet. Neben FGF-1 und FGF-2 (s.u.) seien als Beispiel nur folgende genannt: FGF-3 findet sich in Kolonkarzinomen (Galdemard et al., 2000), FGF-4 in Prolaktinomen (Shimon et al., 1998). Erhöhte Level von FGF-5 wurden bei Pankreaskrebs (Kornmann et al., 1997), von FGF-6 und FGF-8 bei Prostatakrebs (Dorkin et al. 1999; Ropiquet et al. 2000) gezeigt. FGF-7 wurde in Ovarialkrebs (Parrott et al., 2000), FGF-8 in Brustkrebs (Ruohola et al., 2001) und FGF-9 in Hirntumoren (Todo et al., 1998) nachgewiesen.

### **1.2.2. FGF-1 und FGF-2**

FGF-1 (aFGF, acidic FGF) und FGF-2 (bFGF, basic FGF) sind die am besten untersuchten FGFs. Sie wurden erstmals aus Rinderhirnextrakten isoliert, nachdem beobachtet worden war, dass diese Extrakte das Wachstum von 3T3 Fibroblasten stimulierten (Armelin, 1973; Gospodarowicz, 1974).

FGF-1 und FGF-2 sind in vielen normalen Geweben, sowohl beim Embryo als auch beim Erwachsenen, nachgewiesen worden (Lobb und Fett, 1984; Maciag et al., 1984; Risau, 1986; Risau et al., 1988; Rifkin et al., 1989).

Auch konnten sie aus verschiedenen Tumoren, isoliert werden. So findet sich FGF-1 beispielsweise bei Brustkrebs (Zammit et al., 2001), Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Nacken (Shemirani und Crowe 2000), Adenokarzinomen des Ösophagus (Soslow et al., 1999) und Leberzellkarzinomen (Chow et al., 1998).

FGF-2 wurde unter anderem bei Gliomen (Takahashi et al., 1990), in Prostata- (Giri et al., 1999), Brust-, Nieren-, Ovarial- und Lungenkrebs, sowie bei Melanomen, Leukämie und Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Nacken nachgewiesen (Chandler et al., 1999; Ueno et al., 2001; Shemirani und Crowe 2000).

Bei Krebspatienten mit verschiedenen neoplastischen Erkrankungen (unter anderem Brust-, Prostata-, Hirn- und Lungentumoren) fanden sich erhöhte Werte von FGF-2 im Urin (Nguyen et al., 1994; Wellstein, 1994) und bei Patienten mit Hirntumoren im Liquor (Li et al., 1994).

### **1.2.2.1. Biologische Funktionen von FGF-1 und FGF-2**

FGF-1 und FGF-2 sind potente Wachstumsfaktoren für Fibroblasten und Endothelzellen (Folkman und Shing, 1992). Bei diabetischen Mäusen (C57BL/KsJ db/db), deren physiologischer Heilungsprozess gehemmt ist, fördert die exogene Anwendung von FGF-2 die Wundheilung von Hautwunden (Tsuboi und Rifkin, 1990). Ischämisch geschädigtes Herzmuskelgewebe von Hunden (Yanagisawa-Miwa et al., 1992) und Schweinen (Watanabe et al., 1998) erholt sich bei Behandlung mit FGF-2 schneller.

Bei der Wundheilung scheint FGF-2 die Migration von Endothelzellen zu erleichtern, indem es lokal die Fibrinolyse hochreguliert (Powers et al., 2000; Gualandris und Presta 1995, Besser et al., 1995; Werb, 1997) und die Expression des  $\alpha$ V $\beta$ 3 Integrin-Komplexes auf der Zelloberfläche erhöht (Sepp et al., 1994). Dieser Komplex bindet unter anderem Metalloproteinasen, welche ihrerseits zur Fibrinolyse beitragen und das zielgerichtete Einwandern von Zellen ermöglichen (Brooks et al., 1996).

Es finden sich hohe Level an FGF-1 in entzündeten arthritischen Gelenken (Sano et al., 1990) und an allogenen Transplantaten, welche die histologischen Zeichen einer chronischen Abstoßungsreaktion zeigen (Zhao et al., 1993, 1995).

FGF-1 und FGF-2 spielen auch bei verschiedenen malignen Prozessen eine Rolle.

So fördert FGF-1 beispielsweise das Wachstum von MCF-7 Brustkrebszellen in vitro und in vivo (Zhang et al., 1998).

Bei mit FGF-1 transfizierten NBT-II Zellen (Blasenkarzinomzellen der Ratte) wurde eine verstärkte Proliferation in vitro und in vivo, sowie ein höherer Vaskularisierungsgrad in vivo beobachtet (Jouanneau et al., 1995).

Bei HSY Adenokarzinomzellen der Speicheldrüse regen in vitro sowohl FGF-1 als auch FGF-2 das Wachstum an (Myoken et al., 1996).

Zudem korreliert die Expression von FGF-2 positiv mit der Malignität und dem Vaskularisierungsgrad von menschlichen Gliomen (Takahashi et al., 1992).

Auch in einigen Plattenepithelkarzinomen geht verstärkte FGF-2-Expression mit erhöhter Vaskularisierung einher (Huang et al., 1993; Schultz-Hector und Haghayegh, 1993). Andere Studien zeigen bei diesen Tumoren allerdings eine Korrelation der FGF-2-Expression mit ihrer Differenzierung, aber nicht mit ihrer Vaskularisierung (Janot et al., 1995).

#### **1.2.2.2. Sekretion von FGF-1 und FGF-2**

Um ihre Bioaktivität zu entfalten, ist es für FGF-1 und FGF-2 notwendig, an ihre extrazellulären Tyrosinkinase-Rezeptoren zu binden (Verner und Schatz, 1988). Zur Zeit sind vier verschiedene FGF-Rezeptoren bekannt, FGFR-1 – FGFR-4, welche auf Proteinebene zu 55% - 72% homolog sind (Johnson und Williams, 1993).

Da FGF-1 und FGF-2, im Gegensatz zu den meisten anderen FGFs, aber über keine typische Signalsequenz für die Sekretion verfügen (Folkman und Klagsbrun, 1987; Mason, 1994), müssen sie auf einem anderen Weg die Zelle verlassen.

FGF-1 wird beispielsweise an p40 Syn-1 (= extravesikuläre Domäne von Synaptotagmin-1) gebunden von NIH 3T3 Zellen sezerniert (Carreira et al., 1998; LaVallee et al., 1998; Tarantini et al., 1998). Ein solcher Weg ist für FGF-2 noch nicht bekannt. Allerdings wurde bereits beschrieben, dass der alternative Sekretionsweg von FGF-2 energieabhängig und nicht mit dem endoplasmatischen Retikulum bzw. Golgiapparat assoziiert ist (Florkiewicz et al., 1995).

Ein Auslöser für die Sekretion von FGF-2 ist mechanischer Stress, was eine Rolle bei der Wundheilung zu spielen scheint (McNeil et al., 1989).

Zusätzlich zu dem noch ungeklärten Sekretionsmechanismus von FGF-2 ist bekannt, dass FGF-1 und FGF-2 nach ihrer Sekretion aufgrund ihrer hohen Affinität zu Heparinsulfat-Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix immobilisiert werden.

Um zu ihren Rezeptoren zu gelangen zu können, müssen sie erst aus dieser nichtkovalenten Bindung freigesetzt werden (Saksela et al., 1988; Rogelj et al., 1989; Kiefer et al., 1990; Patterson et al., 1993).

Ein Mechanismus, um FGFs aus der extrazellulären Matrix zu lösen, ist der Verdau der Heparinsulfat-Proteoglykane durch Heparinasen (Vlodavsky et al., 1988; Bashkin et al., 1989; Vlodavsky et al., 1991; Moscatelli, 1992).

Beispielsweise lässt sich durch Transfektion niedrigmaligner Krebszelllinien mit Heparinase-Expressionsplasmiden deren metastatisches Potential in vivo erhöhen (Hulett et al., 1999; Vlodavsky et al., 1999).

### **1.2.3. Das FGF-Bindeprotein (FGF-BP)**

Eine andere Möglichkeit, um FGF-1 und FGF-2 zu mobilisieren, basiert auf einem FGF-Bindeprotein (FGF-BP). Dieses wurde ursprünglich aus Zellkulturmedium isoliert, welches zuvor von A431-Zellen (menschliche Epitheloidkarzinomzellen) konditioniert worden war. FGF-BP wurde beschrieben als 17 kD großes, heparinbindendes, sekretiertes Protein, welches reversibel und nicht-kovalent an FGF-1 und FGF-2 bindet und sie aus der extrazellulären Matrix löst. Außerdem verhindert FGF-BP ihre Degradation und ermöglicht ihnen letztendlich eine Interaktion mit ihren Rezeptoren (Wu et al., 1991).

Neben den A431-Zellen konnte FGF-BP auch in normalen Keratinozyten nachgewiesen werden (Wu et al., 1991; Vellucci et al., 1995).

Des weiteren wurde FGF-BP in zahlreichen malignen Zelllinien nachgewiesen. So kommt es in Plattenepithelkarzinom-Zelllinien (ME180, FaDu, A253, Kane und SCC-25) und den Kolonkarzinom-Zelllinien SKCO-1 und LS174T vor (Wu et al., 1991; Czubayko et al., 1997).

Man findet FGF-BP auch in einigen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien der Lunge (HTB59, HTB182, HTB178), der Blase (HTB3) und der Cervix (HTB35), sowie in der Epidermoidkarzinom-Zelllinie HTB33 (Czubayko et al., 1994).

FGF-BP konnte auch in einer immunhistochemischen Studie im Drüsenepithel von Kolonkarzinomen gezeigt werden (Cabal-Manzano et al., 1999).

### **1.2.3.1. FGF-BP in proliferativen Geweben**

Die Rolle von FGF-BP in proliferativen Geweben wurde durch Studien an Mäusen und Ratten unterstrichen.

Bei Mäusen, deren FGF-BP DNA-Sequenz zu 63% homolog zum menschlichen ist, konnte die Expression von FGF-BP während der Embryogenese in Haut, Darm und Lunge nachgewiesen werden. Nach der Geburt wird die FGF-BP-Expression in Haut und Darm herunterreguliert, so dass die erwachsene Maus nur noch in Lunge und Ovarien hohe FGF-BP-Level exprimiert (Kurtz et al. 1997).

Eine weiterführende immunhistochemische Studie konnte die Expression von FGF-BP in Mäuseembryonen zusätzlich im Thymus, Haar-Follikeln, Zahnleiste, Respirationstrakt, verschiedenen Drüsengeweben, Niere, Leber sowie in bestimmten Arealen des ZNS und ebenfalls in Haut, Darm und Lunge nachweisen (Aigner et al., 2002). Dabei fiel außerdem auf, dass die FGF-BP-Expression in den verschiedenen Geweben nur zu bestimmten Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung hochreguliert wird.

Auch in vivo steigt bei Mäusen die FGF-BP mRNA-Expression in der frühen karzinogen-induzierten Transformation erwachsener Haut stark an. In Keratinocyten exprimiertes aktives ras resultiert ebenfalls in einer Hochregulation der FGF-BP mRNA (Kurtz et al., 1997).

In Ratten, deren Aminosäuresequenz von FGF-BP zu 70% homolog zum menschlichen ist, findet man FGF-BP im Normalgewebe der Retina, Lunge, Magen-Darm-Trakt, Haut, Plexus choroideus und den Purkinje-Zellen des Kleinhirns (Aigner et al., 2000).

### 1.2.3.2. FGF-BP in Neoplasien

Weitere Studien an Zelllinien mit verschiedenen endogenen FGF-BP-Expressionswerten geben Aufschluss über dessen wachstumsfördernde Rolle bei Tumoren.

Die Zelllinie SW-13 (menschliche Nebennieren-Karzinomzellen) exprimiert hohe Level an FGF-2, jedoch kein FGF-BP. In Soft-Agar ist sie nicht in der Lage, Kolonien zu bilden. In athymische Nacktmäuse transplantiert, bildet die Zelllinie keine Tumoren aus.

Transfiziert man SW-13 mit einem FGF-BP-Expressionsvektor, so zeigt sich die wachstumsrelevante Bedeutung von FGF-BP. Die Zelllinie bildet nun Kolonien in Softagar und gut vaskularisierte Tumoren in athymischen Nacktmäusen. Gibt man *in vitro* Antikörper gegen FGF-2 hinzu, so lässt sich der FGF-BP Effekt aufheben (Czubayko et al., 1994).

Benutzt man mit dem FGF-BP-Vektor ein tetrazyklin-empfindliches Promotersystem, so kann mittels Tetrazyklin der koloniebildende Effekt aufgehoben und das Tumorwachstum in den athymischen Nacktmäusen supprimiert werden (Liaudet-Coopman et al., 1996).

Deutliche Hinweise auf eine Schalterfunktion von FGF-BP beim Wachstum von Tumoren konnte in Zelllinien mit endogener FGF-BP Produktion gezeigt werden.

So wurde in einer Arbeit die endogene FGF-BP-Expression zweier Zelllinien ME-180 (humanes Plattenepithelkarzinom) und LS174T (humanes Kolonkarzinom), welche beide FGF-2 und FGF-BP produzieren, mittels spezifischer Ribozyme gehemmt.

*In vitro* führte diese FGF-BP-Reduktion zu einer erniedrigten Abgabe von biologisch aktivem FGF-2 der Zellen in Kultur bei einer Erhöhung des zellgebundenen FGF-2. Die Zellen wuchsen deutlich langsamer.

*In vivo* wurde die Vaskularisierung und das Wachstum von xenogenen Tumortransplantaten in Mäusen gehemmt (Czubayko et al., 1997).



Retinoide, welche potente Regulatoren für das Wachstum und die Differenzierung von Epithelien darstellen (Chambon, 1995), beeinflussen viele neoplastische Zellen. Sie unterdrücken die Karzinogenese in verschiedenen epithelialen Geweben und zeigen klinische Effekte als Chemotherapeutika bei einigen Plattenepithelkarzinomen (Khuri et al., 1997; Miller, 1998).

Die Expression des FGF-BP-Gens wird durch Retinoide in vitro sowohl durch transkriptionale als auch durch posttranskriptionale Mechanismen herunterreguliert (Liaudet-Coopman et al., 1996). In vivo wird die FGF-BP-Expression in Plattenepithelkarzinom-Xenotransplantaten reduziert und Wachstum und Angiogenese der Tumoren inhibiert (Liaudet-Coopman et al., 1997).

Erhöhte FGF-BP-Level wurden neben tumorbiologischen auch in anderen pathologischen Prozessen nachgewiesen.

So zeigt eine Studie über Nierenerkrankungen bei Kindern (Verletzungen der Nierentubuli, HIV-assoziierte Nephropathie, hämolytisch urämisches Syndrom) eine Hochregulation der FGF-BP-Expression in Nierentubulusepithelzellen. Außerdem konnte bei diesen Patienten FGF-BP im Urin nachgewiesen werden (Liu et al., 2001).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der oben genannten Arbeiten existiert aber auch eine Studie, deren Daten scheinbar auf eine weniger wichtige Rolle des FGF-BP in den angesprochenen Prozessen hinweist.

So zeigt diese Arbeit, dass FGF-BP-Level in normalen Keratinocyten höher sind als in Plattenepithelkarzinomen und dass die FGF-BP-Expression mit der Umwandlung von normalem Plattenepithel zum invasiven Karzinom sinkt (Sauter et al., 2001).

### 1.2.3.3. Struktur und Eigenschaften von FGF-BP

Die bislang erwähnten Arbeiten weisen, außer Sauter et al 2001., auf eine wichtige Rolle des FGF-BP in verschiedenen malignen Prozessen hin.

Um die Mechanismen aufzuklären, die hinter diesen biologischen Effekten stehen, wurde in anderen Studien Struktur und Eigenschaften von FGF-BP detaillierter untersucht.

Die humane cDNA von FGF-BP ist 1163 bp lang und kodiert für 234 Aminosäuren. Damit beträgt das rechnerisch zu erwartende Molekulargewicht 22,6 kDa. Die zunächst beobachtete Laufröhre von FGF-BP in der SDS-PAGE von 17 kDa basierte auf einer C-terminal-trunkierten Form (Wu et al., 1991).

FGF-BP verfügt über eine lipophile Signalsequenz zur Sekretion und eine einzelne potentielle N-Glykosylierungsstelle bei Asn-99 (Wu et al., 1991).

Die Fähigkeit zur Heparinbindung ist auf eine Heparinbindungsstelle bei Arg<sup>110</sup>-Phe<sup>143</sup> zurückzuführen (Wang et al., 1998).

Die FGF-BP-Sequenz von Mensch, Maus, Ratte und Rind ist hochgradig homolog und die konservierten Abstände der Cysteine lassen eine ebenfalls konservierte Tertiärstruktur vermuten (Kurtz et al., 1997; Aigner et al., 2000; Lametsch et al., 2000).

Diese Cysteine, von denen insgesamt zehn vorkommen, bilden untereinander fünf Disulfidbrücken (Lametsch et al., 2000).

Die Strukturanalyse von Rinder-FGF-BP ergab eine 1170 bp lange cDNA, kodierend für 234 Aminosäuren (wie beim Menschen). Die Aminosäuresequenz ist zu 60% homolog zu der des Menschen. Die berechnete Molekülmasse sollte 22,6 kDa betragen, wobei die Massenspektrometrie eine Masse von 28,5 kDa ergab und das Molekül bei 36 kDa in der SDS-PAGE lief.

Der Unterschied zwischen dem berechneten und beobachteten Molekulargewichten von FGF-BP konnte nicht abschließend erklärt werden (Lametsch et al., 2000).

Verschiedene Arbeiten kommen zu dem Schluss, dass FGF-BP wahrscheinlich in der Lage ist, Dimere zu bilden (Rak und Kerbel, 1997; Hoefen, bachelor thesis, Georgetown University 1997; Aigner et al., 2000; Aigner et al., 2001; Sauter et al., 2001).

### **1.3. Aufgabenstellung**

Auf Grund der wichtigen Rolle, die FGF-BP beim Wachstum von Tumoren spielt, sollte es in dieser Arbeit weiter untersucht werden. Um dessen biologische Funktion bei physiologischen und pathologischen Prozessen im Körper besser zu verstehen, wurden im einzelnen folgende Ziele verfolgt:

1. Für diese Arbeit wurden große Mengen an rekombinantem FGF-BP benötigt. Dieses wurde mittels eines Baculovirus-Expressions-Systems in adhärent wachsenden Insektenzellen gewonnen. Um höhere Ausbeuten zu erzielen, sollte die Herstellung von Bv-(FGF-BP) mittels Suspensionskultur etabliert werden.

2. Vordaten weisen darauf hin, dass es unter bestimmten Bedingungen zu einem kovalenten Komplex zwischen FGF-2 und FGF-BP kommt. Es sollte untersucht werden, ob dieser Komplex durch Koexpression der beiden Proteine in Insektenzellen dargestellt werden kann.

3. Da die vorausberechnete Größe des rekombinanten Bv-(FGF-BP) (26,8 kDa) von der späteren Laufhöhe in der SDS-PAGE (ca. 30 kDa) abwich, sollte untersucht werden, ob es sich hierbei um eine Glykosilierung handelt.

4. Die parakrine Bioaktivität des rekombinanten Bv-(FGF-BP) im Sinne einer Proliferations-Induktion sollte anhand des Koloniewachstums von SW-13-Nebennieren-Karzinom- und DU-145-Prostata-Karzinom-Zellen in Soft-Agar beurteilt werden.

5. Um die angiogenetischen Eigenschaften des rekombinanten Bv-(FGF-BP) zu zeigen, sollte die Proliferation von HUVEC-Zellen in Reaktion auf Bv-(FGF-BP) gezeigt werden..

6. Um eine mögliche Rolle von FGF-BP im Prostata-Ca zu beurteilen, wurde es mittels immunchemischer Methoden auf histologischen Prostata-Ca-Schnitten nachgewiesen. Dann wurde anhand von Patientendaten untersucht, ob die Intensitäten der immunhistochemischen Färbungen mit dem Krankheitsverlauf der Patienten korrelieren.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Materialien, Chemikalien und Laborgeräte

#### 2.1.1. Materialien und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen und Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- **Acros**, New Jersey (USA): Tween-20
- **Amersham-Pharmacia**, Uppsala (Schweden): ECL-Kit (RPN 2106), HRP-konjugierter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper von Ziege, Protein A-Sepharose CL-4B, Rainbow marker (RPN 756), Spezialfilm (Hyperfilm™ MP)
- **Amicon**, Beverly (USA): Centricon-Centrifugal Filter-Vorrichtungen
- **ATCC**, Manassas, VA (USA): Sf-9 Insektenzellen, SW-13-Zellen, DU-145-Zellen, HUVEC-Zellen
- **Biometra**, Göttingen (Deutschland): Anti-rabbit Ig, Whatman-Papier
- **DIFCO**, Detroit (USA): Hefeextrakt, Trypton
- **Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH**, Hamburg (Deutschland): 1,5 ml Reaktionsgefäße
- **Greiner Labortechnik**, Frickenhausen (Deutschland): Gewebekulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 182 cm<sup>2</sup>), Kryoröhrchen, Petrischalen, 50 ml Röhrchen, 6-Well-Platten, 24-Well-Platten, 96-Well-Platten
- **Heirler GmbH**, Radolfzell (Deutschland): Magermilchpulver
- **Life Technologies**, : 1 kb-DNA-Ladder, DH10Bac kompetente Zellen, HTa/FGF-2-Plasmid, FGF-2, Insektenzell-Medium (Sf-900 II Medium), Lipofectamin, M13-Forward Primer, M13-Rev Primer
- **Marienfeld**, Lauda-Königshofen (Deutschland): Neubauer-Zählkammer
- **Merck**, Darmstadt (Deutschland): β-Mercaptoethanol, Ethanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Methanol, Xylol
- **Nalge Nunc**, Wiesbaden (Deutschland): Zellschaber

- **Nestle (Carnation)**, Solon, Ohio (USA): Magermilchpulver
- **New England Biolabs GmbH**, Frankfurt a. M. (Deutschland): Bgl II, NEB 2, NEB 3, PNGase F Deglykosilierungs-Kit, Xba I
- **Novex**, Frankfurt/M. (Deutschland): SDS-Polyacrylamid-Gradientengele (4-20%)
- **PAA Laboratories**, Linz (Österreich): FCS, IMD-Medium
- **Promega**, Anti-FGF-2-Antikörper
- **Qiagen**, Hilden (Deutschland): Ni-NTA Agarose (Superflow), Säule (Qiagen-tip 500), Quiagen Plasmid Maxi Kit
- **Roche**, Grenzach-Wyhlen (Deutschland): Cell Proliferation Reagent WST-1, DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7), DNase Inhibitor, dNTP, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, NBT/BCIP, 10x PCR Puffer, Taq-Polymerase
- **Roth**, Karlsruhe (Deutschland): Agar-Agar, Agarose, EDTA, Glycin, Harnstoff, Tris-Base, Xylencyanol
- **SafeMed E.D. Ltd.**, Willishalten, (Schweiz): Einmalhandschuhe (Safe Ex<sup>®</sup>)
- **Sarstedt**, Nümbrecht (Deutschland): 15 ml Röhrchen, Pipettenspitzen
- **Schleicher und Schuell**, Dassel (Deutschland): Nitrozellulose-Membran (Protran BA 83)
- **Serva**, Heidelberg (Deutschland): Acrylamid, Coomassie Brilliant Blue R-250, Rinderalbuminserum (BSA) (Fraktion V), TEMED
- **Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH**, Seelze (Deutschland): Ampicillin, Anti-FGF-2 Antikörper (F-5537), APS, Bromphenolblau, Diaminobenzidin, DMSO, Ethidiumbromid, Gentamycin, Isopropanol, IPTG, Kanamycin, Levamisole, Phenolchloroform, Proteinase K, SDS, Tetracyclin, Triethanolamin, X-gal
- **Vector**, Burlingame, California (USA): Biotinylierter Anti-Kaninchen-Ig von Ziege, normal goat serum, normal horse serum

An Standardlaborchemikalien fanden Verwendung: Essigsäure, HCl, Kaliumacetat, NaCl, NaOH, Natriumacetat, MgCl<sub>2</sub>

### 2.1.2. Laborgeräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte wurden von folgenden Firmen bezogen:

- **Bandelin**, Berlin (Deutschland): Ultraschallfinger (UW 70)
- **Bio-Rad**, München (Deutschland): Gelelektrophorese/Gelgieß-Apparatur (Mini-Protean<sup>®</sup> II Cell), Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur (Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT), Spannungsgerät, UV-Bank (UV Transilluminator 2000)
- **Bio-Tek Instruments**, Winooski (USA): ELISA-Platten-Lesegerät (ELX800G)
- **Du Pont**, Bad Nauheim (Deutschland): Zentrifugen (Sorvall RC 5B)
- **H+P Labortechnik**, München (Deutschland): Autoklav (Varioklav<sup>®</sup>-Dampsterilisator), Magnetrührer (Variomag<sup>®</sup>)
- **Heraeus**, Osterode (Deutschland): Tischzentrifuge (Biofuge), Zentrifuge Zelllabor (Megafuge 1.0 R), Inkubationsschrank (Hera Cell), Reinraumwerkbank (Hera Safe)
- **Hund**, Wetzlar (Deutschland): Lichtmikroskop (Wilovert A), Zählkular (H10x)
- **Janke & Kunkel**, Staufen (Deutschland): Homogenisator (Ultra-Turrax)
- **Kodak** (Großbritannien): Digitale Kamera (Kodak Digital Science DC 120 Zoom Digital Camera), Expositionskassette
- **Novex**, Frankfurt/M. (Deutschland): Western-Blot Apparatur (X-Cell II<sup>™</sup>)
- **Perkin-Elmer**, Rodgau-Jügesheim (Deutschland): PCR-Maschine (Gene Amp PCR System 2400)
- **Pharmacia Biotech**, Cambridge (Großbritannien): Spektralphotometer (RNA/DNA Calculator)
- **Radiometer**, Copenhagen (Dänemark): pH-Messgerät
- **Scientific Industries**, Bohemia, New York (USA): Vortexer (Vortex Genie 2)
- **Sorvall**, Bad Homburg (Deutschland): Rotor (SS-34-Rotor), Zentrifuge (RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge)
- **Wheaton**, Millville, NJ (USA): Dounce-Glasschliff-Homogenisator

### 2.1.3. Standardlösungen, Puffer und andere Rezepturen

Folgende Rezepturen wurden verwandt:

**Einfriermedium:** 5% (v/v) DMSO und 20% (v/v) FCS in IMDM-Medium

**0,2 M EDTA, pH 8,0:** 37,2 g Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O in 700 ml Aqua dest., auf pH 8,0 mit 10 M NaOH, auf 1 l mit Aqua dest.

**3 M Kaliumacetat, pH 5,5:** 294,45 g Kaliumacetat, auf 1 l mit Aqua dest., auf pH 5,5 mit Essigsäure

**LB (Luria Bertani)-Medium:** 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, mit 1 N NaOH auf pH 7

**LB-Agar Platten:** 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, mit 1 N NaOH auf pH 7, 15 g/l Agar. Mischung autoklavieren, danach noch heiß (bei 50 °C) in Petrischalen gießen, abkühlen lassen.

**3 M Natriumacetat, pH 5,2 :** 246,13 g Natriumacetat, auf 1 l mit Aqua dest., auf pH 5,2 mit Essigsäure

Die Rezepte der Lösungen und Puffer, die nur für ein Experiment gebraucht wurden, finden sich bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen.

### 2.2. Methoden in der Zellkultur

Alle Arbeitsschritte fanden, falls nicht anders beschrieben, in der Reinraumwerkbank statt. Sämtliche Geräte, Materialien und Lösungen wurden vor Gebrauch entweder im Autoklaven für 20 min bei 121°C hitzesterilisiert oder mit 70 % Alkohol desinfiziert.

Lösungen, die mit den Sf-9-Zellen in Berührung kamen, wurden zuvor im Wasserbad auf 27 °C erwärmt. Lösungen, die mit SW-13-Zellen, DU-145-Zellen



oder HUVECs in Berührung kamen, wurden zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Es wurde mit Handschuhen gearbeitet, welche ebenfalls desinfiziert wurden.

Alle Inkubationen der Insektenzellen fanden, wenn nicht anders beschrieben, bei 27 °C im Inkubationsschrank statt.

Alle Inkubationen der SW-13-Zellen, DU-145-Zellen oder HUVECs fanden, wenn nicht anders beschrieben, bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und feuchter Luft im Inkubationsschrank statt.

### **2.2.1. Handhabung und Kultivierung von Sf-9 Zellen**

Die Sf-9-Zellen wurden entweder in Adhäsionskultur oder in Suspensionskultur kultiviert. Das Insektenzell-Medium wurde, wenn nicht anders beschrieben, mit 10 % v/v FCS versetzt.

In der Adhäsionskultur wurden die Zellen in Gewebszellkulturflaschen (25, 75 oder 182 cm<sup>2</sup>) kultiviert. Pro Flasche wurden, je nach Größe, 5, 10 oder 20 ml Insektenzell-Medium zugegeben und diese dann bei 27 °C inkubiert. Der Zustand und das Wachstum der Zellen wurde täglich im Lichtmikroskop kontrolliert und das Insektenzell-Medium, je nach Zelldichte, alle 3-6 Tage gewechselt. Sobald eine Konfluenz von 90-100 % erreicht war, wurden die Zellen passagiert. Zu diesem Zweck wurden sie zunächst in Suspension gebracht, indem man sie mit einem Zellschaber abschabte. Dann wurde das Insektenzell-Medium mit den Zellen auf mehrere Flaschen aufgeteilt und diese ihrer Größe entsprechend mit frischem Insektenzell-Medium aufgefüllt.

Die Zellen in Suspensionskultur wurden in Erlenmeyerkolben kultiviert. Die Erlenmeyerkolben wurden in einem Inkubationsschrank bei 27 °C geschüttelt und der Zustand bzw. die Dichte der Zellen täglich unter dem Lichtmikroskop (mittels Zählkammer) kontrolliert. Das Insektenzell-Medium wurde, je nach Zelldichte, alle 3-6 Tage gewechselt. Dies geschah, indem die Zellsuspension in 50 ml Röhrchen überführt und in einer Zentrifuge bei 1000 rpm 10 min zentrifugiert wurde. Nachdem das alte Insektenzell-Medium abpipettiert worden war, wurde das Zellsediment in frischem Insektenzell-Medium wieder aufgenommen.

Zur Lagerung wurde ein „Gefrierstock“ angelegt und dieser in Flüssigstickstoff gelagert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in Suspension gebracht und dann zentrifugiert (siehe oben). Nachdem der Überstand abpipettiert worden war, wurde das Zellsediment in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und die Zellsuspension in ein Kryoröhrchen pipettiert. Dieses wurde dann in einem wärmeisolierten Einfriercontainer zum langsamen Abkühlen in den  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Schrank gestellt. Am nächsten Tag wurde das Röhrchen dann in den Flüssigstickstofftank überführt.

### **2.2.2. Transfektion von Sf-9-Zellen mit gereinigter FGF-2-Bacmid-DNA**

Die Vorschrift zu diesem Experiment ist, abgesehen von kleinen Änderungen, dem BAC-TO-BAC Baculovirus Expression System Instruction Manual (Life Technologies) entnommen.  $9 \times 10^5$  Sf-9-Zellen in 2 ml Sf-900 II SFM Medium (ohne FCS-Zusatz) wurden in einem 35 mm-Well einer Six-Well-Platte eingesät. Die Platte wurde dann für 1 h bei  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Währenddessen wurden zwei Lösungen in Eppendorfgefäßen vorbereitet: 5  $\mu\text{l}$  gereinigte FGF-2 Bacmid-DNA (siehe Punkt 2.5.2.) in 100  $\mu\text{l}$  Insektenzell-Medium (ebenfalls ohne FCS-Zusatz) und 6  $\mu\text{l}$  Lipofectamin in 100  $\mu\text{l}$  Insektenzell-Medium. Diese beiden Lösungen wurden dann zusammenpipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden noch 800  $\mu\text{l}$  Insektenzell-Medium (ohne FCS) hinzugefügt und das Ganze vorsichtig gemischt.

Dann wurde das Insektenzell-Medium aus dem Well der Six-Well-Platte abgezogen und 1 ml der Lösung mit den verdünnten Lipid-DNA-Komplexen auf die Zellen pipettiert. Nun wurde die Platte für 5 h bei  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurde die Transfektionsmischung ab- und 2 ml Insektenzell-Medium (ab jetzt wieder mit 10 % FCS) hinzupipettiert.

Nach 72 h wurden die Zellen geerntet und das Insektenzell-Medium für neue Infektionen aufbewahrt, wie unter Punkt 2.2.3. beschrieben. Je nach Menge des bisher gewonnenen infektiösen Insektenzell-Mediums wurden Six-Well-Platten (bis 3 ml) oder Gewebszellkulturflaschen der entsprechenden Größe (siehe oben) eingesetzt.

### 2.2.3. Infektion der Sf-9 Zellen mit Baculoviren

Die in Adhäsionskultur gehaltenen (siehe Punkt 2.2.1.) Sf-9 Zellen wurden, sobald sie eine Konfluenz von 90-100 % erreicht hatten, zunächst behandelt wie bei einem Medienwechsel (siehe Punkt 2.2.1.). Statt die Zellen jedoch mit frischem Insektenzell-Medium zu überschichten, wurden sie mit infektiösem und frischem Insektenzell-Medium im Verhältnis 1:1 überschichtet.

Bei der Suspensionskultur wurde folgendermaßen verfahren: Sobald die Zellen eine Dichte von ca. 10 Mio. Zellen/ml erreicht hatten, wurden sie in der Zentrifuge sedimentiert und in frischem und infektiösem Medium (ebenfalls im Verhältnis 1:1) resuspendiert.

Dann wurden die Zellen nach drei Tagen geerntet, indem man sie resuspendierte (nur Adhäsionskultur) und dann zentrifugierte (beide Kulturformen). Das nun infektiöse Insektenzell-Medium wurde abpipettiert und bei 4 °C (bei längerer Lagerung bei -80 °C), das Sediment bei -20 °C gelagert.

Für die Doppelinfektion mit BV-(FGF-BP) und Bv-(FGF-2), wurden zunächst auf einer 6-Well-Platte pro Well  $9 \times 10^5$  Zellen in 2,4 ml Insektenzell-Medium ausgesät. Pro Well wurden dann 600 µl Insektenzell-Medium zugegeben. Es wurden folgende Mischverhältnisse von infektiösem Insektenzell-Medium von Bv-(FGF-2) : Bv-(FGF-BP) gewählt: 1:0, 3:1, 1:1, 1:3, 0:1. Das sechste Well bekam als Kontrolle 600 µl normales Insektenzell-Medium. Nach fünf Tagen wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet und das infektiöse Insektenzell-Medium gelagert.

### 2.2.4. Softagar-Wachstums-Assay

Die Softagar-Wachstums-Assays wurden in 6-Well-Platten in Triplikaten durchgeführt. Als Kulturmedium wurde IMDM mit einem Zusatz von 10 % v/v FCS verwandt.

Als erstes wurde der Boden-Agar gegossen. Das hierzu verwandte Gemisch setzte sich wie folgt zusammen:

**Agarosegemisch:** 25 ml Agarose (2,4 %), 2,5 ml 10x Medium (IMDM), 75 ml Kulturmedium

Die Agarose wurde mittels einer Mikrowelle verflüssigt und auf ca. 55 °C abgekühlt, 10x Medium und Kulturmedium (auf 42 °C vorgewärmt) hinzugegeben und das Gemisch auf 42 °C temperiert. Pro Well wurde 1 ml Agarosegemisch verwandt.

Die Top Agar Ansätze wurden jeweils in einer Vertiefung einer 24-Well-Platte angemischt.

**Top-Agar:** 800 µl Kulturmedium inklusive der Zusätze (FGF-2, Bv-(FGF-BP) oder Kontrolle), 200 µl Kulturmedium mit 20000 Zellen (SW-13- oder DU-145-Zellen), 1,5 ml Agarosegemisch (42 °C)

FGF-2 oder Bv-(FGF-BP) wurden in verschiedenen Konzentrationen verwandt (siehe Punkt 3.6., Abb. 3.8.)

Je nach Versuch wurden den 800 µl Kulturmedium zudem noch 8,8 µg/ml (Antikörper 1, Sigma) oder 1 µg/ml (Antikörper 2, Promega ) Anti-FGF-2 Antikörper zugesetzt.

Alle zu testenden Medien wurden filtersterilisiert.

Mit einer 2 ml-Pipette wurde der Ansatz in der 24-Well-Platte gut durchmischt und jeweils 800 µl auf 3 Wells einer 6-Well-Platte pipettiert. Die Platten wurden 10-14 Tage bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert und die Kolonien am Abend vor dem Auszählen mit p-Iodonitrotetrazolium Violet (10 mg/ml in Aqua dest., 100 µl/Well) angefärbt.

Kolonien mit einem Durchmesser von mehr als 50 µm wurden von zwei unabhängigen Beobachtern mittels Mikroskop und Zählkular gezählt.

### **2.2.5. Proliferations-Assay**

HUVECs (humane venöse Nabelschnur-Endothelzellen) wurden in Triplikaten in 96-Well-Platten mit 200 Zellen pro Well angesetzt und für 48 h in IMDM (20 % FCS, 6 ng/ml FGF-2) inkubiert.

Dann wurden Bv-(FGF-BP), FGF-2 (in verschiedenen Konzentrationen, siehe Punkt 3.7., Abb. 3.9.) oder identische Volumen an Puffer als Kontrolle 200 µl IMDM (10 % FCS) zugesetzt und die HUVECs damit für drei Tage inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Proliferation der Zellen mittels des Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 (Roche) bestimmt. Dieses System basiert auf dem Abbau des Tetrazolium-Salzes WST-1 durch mitochondriale Dehydrogenasen in lebenden Zellen, wodurch ein Farbumschlag hervorgerufen wird, der spektralphotometrisch gemessen werden kann. Es wurde das Protokoll des Herstellers befolgt:

Nach der Aspiration des Inkubationsmediums wurden 100 µl/Well frisches Kulturmedium und 10 µl/Well WST-1 Reagenz hinzupipettiert und für zwei Stunden inkubiert.

Danach wurde die Absorption der Wells bei 450 nm und 630 nm (als Referenz) in einem ELISA-Platten-Lesegerät (Spektralphotometer) gemessen und gegen eine Hintergrundkontrolle (Well ohne WST-1 Reagenz wurde als Absorption = 0 definiert) abgeglichen.

Da die Stärke der Absorption direkt mit der Zahl der lebenden Zellen korreliert, konnte so die x-fache Induktion des Wachstums der Zellen durch Bv-(FGF-BP) bzw. FGF-2 bestimmt werden.

## **2.3. Proteinchemische Methoden**

### **2.3.1. Affinitätsreinigung von rekombinantem Bv-(FGF-BP) oder Bv-(FGF-2) über Ni-Metallchelate-Affinitätschromatographie**

Zunächst wurden die Sedimente (siehe Punkt 2.2.3.) in je 10-30 ml Puffer A (je nach Größe des Sedimente) aufgenommen, resuspendiert und bei 4 °C auf einem Schüttler für 20 min inkubiert. Dann wurde die Suspension mittels eines

Dounce-Glasschliff-Homogenisators durch je drei kräftige Hübe homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann auf Eis 5x10 sec mit je 10 sec Pause mit Ultraschall behandelt (Ultraschallfinger, bei 72 %) und übriggebliebene Zelltrümmer abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, 15 min, 4 °C, 10000 x g, SS-34 – Rotor).

**Puffer A (Lysepuffer):** 6 M Guanidiniumchlorid, 100 mM Na-Phosphat, 10 mM Tris/HCl, pH 8, auf 1 l Aqua dest.

In der Zwischenzeit wurde eine 10 ml Plastiksäule mit einer Suspension von 250 µl Ni-NTA in 2,5 ml Puffer A beschickt (je eine Säule pro 40 ml Zelllysate) und das Säulenmaterial mit 3 ml Puffer A äquilibriert. Dann wurde die Säule unten verschlossen und unter mehrmaligem Resuspendieren mit 10 ml vom gesamten Zelllysate beschickt.

Diese Mischung aus Zelllysate und Säulenmaterial wurde dann mit dem restlichen Zelllysate auf einem Schüttler für 20 min inkubiert. Danach wurde die Säule wieder geöffnet und mit dem Gesamtzelllysate und dem Säulenmaterial beschickt. Nun wurde das Säulenmaterial nacheinander mit folgenden Lösungen gewaschen: 2 ml Puffer A, 5 ml Puffer B, 10 ml Puffer C und 10 ml Puffer D, wobei der Durchlauf jedes Mal verworfen wurde.

**Puffer B, C, D, E (Elutionspuffer):** 8 M Harnstoff, 100 mM Na-Phosphat, 10 mM Tris/HCl, pH 8 (Puffer B), pH 6,3 (Puffer C), pH 5,9 (Puffer D), pH 4,5 (Puffer E), auf 1 l Aqua dest.

Dann wurde die Säule wieder verschlossen und das Säulenmaterial in 500 µl Puffer E resuspendiert und für 3 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Säule wieder geöffnet und das Eluat in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Es resultierten die Eluate E1-E3.

Um die Eluate zu konzentrieren, wurden diese mittels eines Centriconröhrchens eingeengt. Zu diesem Zweck wurden die Eluate zu je 500 µl in ein Centriconröhrchen pipettiert und dann bei 4 °C und 5000 x g (Sorvall-Zentrifuge, SS-34 – Rotor) solange zentrifugiert, bis ein Restvolumen von ca.

50 µl verblieb. Dieses wurde dann in ein Eppendorfgesäß pipettiert und bei 4 °C gelagert.

### **2.3.2. Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach einer Affinitätsreinigung (siehe Punkt 2.3.1.) wurde die Proben in einer Quarzküvette in einem Spektralphotometer bei 280 nm gemessen. Bei hohen und damit ungenauen Messwerten (Absorption > 0,8) wurden die Proben 1:10 verdünnt und erneut gemessen.

Die Proteinkonzentration wurde unter Standardbedingungen mittels der Gleichung:  $\text{Absorption} = \text{Extinktionskoeffizient} \cdot \text{Proteinkonzentration} \cdot \text{Küvettdicke}$  bestimmt. Der Extinktionskoeffizient von rekombinanten Bv-(FGF-BP) beträgt 0,56 ml/(mg · cm) (Siegel, 2000).

### **2.3.3. Deglykosylierung von rekombinatem FGF-BP**

Zur Deglykosylierung des rekombinanten FGF-BP wurde das PNGase F Deglykosylierungs-Kit von NEB eingesetzt. Das aus der Affinitätsreinigung gewonnene (siehe Punkt 2.3.1.), und somit in Puffer E (6 M Harnsäurepuffer) vorliegende, rekombinante FGF-BP wurde zunächst umgepuffert. Zu diesem Zweck wurden 20 µl Eluat (enthielt ca. 4 µg rekombinantes FGF-BP) mit 780 µl 1 % SDS versetzt und in einem Centriconröhrchen (siehe Punkt 2.3.1.) auf 50 µl eingeeengt.

Zu 30 µl dieser Probe wurden 3 µl 10x Denaturierungs-Puffer (aus dem PNGase F Deglykosylierungs-Kit) pipettiert und der Ansatz 10 min in den Hitzeblock gestellt (100 °C). Dann wurden nacheinander 4 µl G7 Puffer, 4 µl NP-40 und 2 µl PNGase F hinzupipettiert. Diese Lösung wurde für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

#### 2.3.4. Gießen von 12 %-SDS-Gelen

Zunächst wurde die BioRad-Gelgießapparatur nach der Vorschrift des Herstellers zusammengesetzt. Zu diesem Zweck wurden zwei Glasplatten (eine etwas höhere und eine etwas niedrigere) in die Apparatur eingespannt.

Da diese die spätere Gelkammer bilden sollten, wurden sie auf beiden Seiten von einem 1mm dicken Platzhalter (Spacer) auseinandergehalten und so auch abgedichtet. Nach unten verhinderte die Apparatur ein Auslaufen der Gelkammer nach oben blieb sie offen.

Dann wurden die Stammlösungen für Trenn- und Sammelgel angesetzt (Angaben reichen für ca. 10 Gele):

**Trenngel:** 15,75 ml Aqua dest., 18,75 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,5 ml 10 % SDS, 15 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid.

**Sammelgel:** 7,7 ml Aqua dest., 1,25 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 ml 10 % SDS, 0,975 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid.

Danach wurden beide Stammlösungen mittels einer Entgasungsapparatur und einer Wasserstrahlpumpe entgast. Zuerst wurde das Trenngel gegossen. Zu diesem Zweck wurden in einem 15 ml Röhrchen 4,725 ml der Trenngelstammlösung mit 250 µl 10 % APS und 25 µl TEMED versetzt, zweimal invertiert und mittels einer Pipette in die Gelkammer pipettiert.

Sobald das Trenngel polymerisiert war (nach ca. 15 min), wurde diesem das Sammelgel überlagert. Zunächst wurden 0,925 ml Sammelgelstammlösung in ein Eppendorfgefäß pipettiert, 50 µl 10 % APS und 25 µl TEMED hinzugegeben, zweimal invertiert und dann mit einer Pipette in die Gelkammer pipettiert. Nachdem das geschehen war, wurde möglichst schnell ein Kamm von oben in die Gelkammer geschoben, um so die nötigen Geltaschen zu formen.

Nachdem auch das Sammelgel polymerisiert war, wurde das Gel mit den beiden Glasplatten und Spacern aus der Apparatur genommen, in feuchte Tücher geschlagen und bei 4 °C gelagert.



### 2.3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die zu untersuchenden Proben wurden in SDS-Probenauftragspuffer und Wasser aufgenommen, so dass ein Endvolumen von 5-25  $\mu$ l (4-20 % Novex SDS-Gradientengele) bzw. 5-40  $\mu$ l (selbstgegossene 12 % SDS-Gele, siehe Punkt 2.3.4.) resultierte. Diese Mischungen wurden dann in einem Hitzeblock bei 100 °C für 3 min gekocht und dann bei 12000 rpm für 3 min zentrifugiert (Tischzentrifuge).

**5x SDS-Probenauftragspuffer:** 4 ml 10 % SDS, 4 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2 ml Glycerin, 1 mg Bromphenolblau

Derweil wurde das Gel (Fertig- bzw. selbstgegossenes Gel) in die Gel-Apparatur (Fertiggel: Novex-Apparatur, selbstgegossenes Gel: BioRad-Apparatur) eingespannt und in dieser die innere und äußere Kammer mit SDS-Laufpuffer gefüllt.

**10x SDS-Laufpuffer:** 29 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS, auf 1000 ml Aqua dest.

Dann wurden Marker (5  $\mu$ l Rainbowmarker) und Proben in die dafür vorgesehenen Geltaschen (nachdem diese mit einer 1 ml Pipette kräftig ausgespült wurden) pipettiert und die Gel-Apparatur mit dem entsprechenden Deckel verschlossen. Die Gel-Apparatur wurde nun an ein Spannungsgerät angeschlossen, wobei bei der Novexapparatur 125 V und 95 min und bei der BioRad-Apparatur 200 V und 45 min angelegt wurden.

### 2.3.6. Coomassie-Färbung

Zur Darstellung der Proteinbanden wurden die SDS-Gele für 15min auf einem Schüttler in Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung inkubiert. Danach wurden sie zur Entfärbung des Hintergrundes für ca. 2 h in Entfärbelösung inkubiert (ebenfalls auf einem Schüttler, die Entfärbelösung wurde mehrfach gewechselt). Das Gel wurde dann auf einen Leuchttisch gelegt, mit einer digitalen Kamera abfotografiert und dann verworfen.

**Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung:** 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 9,2 % (v/v) Essigsäure (technisch), 45,40 % Ethanol (technisch), 45,15 % Aqua dest.

**Entfärbelösung:** 10 % (v/v) Essigsäure (technisch), 30 % (v/v) Ethanol, 60 % (v/v) Aqua dest.

## **2.4. Immunchemische Methoden**

### **2.4.1. Reinigung polyklonaler Anti-FGF-BP IgGs durch Protein A - Sepharose**

Zunächst wurde das Serum (welches freundlicherweise von Dr. Achim Aigner zur Verfügung gestellt worden war) mit einem Zehntel seines Volumens 1 M Tris-HCl (pH 8,0) versetzt. Dann wurden diese Lösung und Protein A - Sepharose im Verhältnis (v/v) 1:1 gemischt und für 30 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.

Dieser Ansatz wurde nun auf eine Säule geladen und der Durchlauf verworfen. Nun wurde die Säule nacheinander mit 10 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 10ml 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen, wobei der Durchlauf jeweils wieder verworfen wurde.

Nun wurde in 10 Eppendorfgläsern jeweils 50 µl 1 M Tris-HCl (pH 8,0) vorgelegt. Die Säule wurde dann 10x mit 500 µl 100 mM Glycin (pH 3,0) beschickt und das Eluat in je einem der vorbereiteten Eppendorfgläser aufgefangen. Nun wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen mittels eines Spektralphotometers bestimmt (siehe Punkt 2.3.2.). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden bei 4 °C aufbewahrt.

### **2.4.2. Western-Blot**

Zunächst wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe Punkt 2.3.5.). Zur Herstellung des Blotting-Sandwiches wurden drei Schwämme ausgespült, in Transferpuffer eingeweicht und in die Novex-Blot-Kammer eingesetzt. Es folgten

ein Whatman-Papier, das SDS-Gel, ein Blatt Nitrocellulose, wieder ein Whatman-Papier und zum Schluss noch zwei Schwämme.

**20x Transferpuffer:** 29 g Tris, 144,2 g Glycin, auf 1 l Aqua dest.

Dazu ist noch anzumerken, dass alle Komponenten vorher in Transferpuffer eingeweicht und möglichst luftblasenfrei aufeinander gelegt wurden. Whatman-Papiere und Nitrocellulose wurden vorher auf die entsprechende Größe zurechtgeschnitten. Diese Arbeitsschritte wurden mit Handschuhen durchgeführt.

Nun wurde die Blot-Kammer zusammengesetzt und in die Novex-Blot-Apparatur eingespannt, welche dann mit Transferpuffer gefüllt wurde. Dann wurde ein Spannungsgerät an die Apparatur angeschlossen und für 30 min eine Spannung von 25 V angelegt.

Nach dem Blotten erfolgte die Blockierung von nicht besetzten Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulose durch 5 % Magermilch in TBST (1 h unter schütteln), dann wurde sie 2x5 min in TBST gewaschen. Nun wurde die Nitrocellulose mit dem 1. Antikörper (1:10.000 in TBST, gereinigte polyklonale Anti-BP-IgG's, siehe Punkt 2.4.1., bzw. Anti-FGF-IgG's) für 1 h inkubiert.

**10x TBST:** 100 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,0), 1,5 M NaCl, 0,5 % (v/v) Tween 20, auf 1 l Aqua dest.

Dann folgten drei weitere 5 min Waschräume in TBST, bevor die Inkubation mit dem 2. Antikörper (HRP-konjugierter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper von Ziege, 1:5000 in TBST) erfolgte. Danach wurde noch dreimal 5 min in TBST gewaschen. Diese Blockierungs-, Wasch- und Antikörperinkubations-Schritte wurden alle bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt.

Im Photolabor wurde der Blot mit Hilfe eines ECL-Kits entwickelt. Zu diesem Zweck wurden je 5 ml von Lösung 1 und 2 in eine Petrischale pipettiert. In dieser Lösung wurde die Nitrocellulose dann 1 min inkubiert, auf einem Spezialfilm in einer Filmbox für 30 sec-45 min (je nach Signalstärke) exponiert und dieser Film dann entwickelt.

### 2.4.3. Immunhistochemie

Alle Wasch- und Inkubationsschritte fanden in den sogenannten Waschbehältern statt. Die Prostata-Ca-Schnitte (freundlicherweise von Dr. H.Y. Leung, University of Newcastle, Scotland, UK zur Verfügung gestellt) wurden aufrecht in einen Schnitthalter gestellt und mit dessen Hilfe von einem Waschbehälter in den nächsten transportiert.

Wurden die Schnitte in der feuchten Kammer inkubiert, so wurden die entsprechenden Lösungen direkt auf den Objektträger getropft, so dass die Schnitte vollkommen bedeckt waren. Nach der Inkubation wurden die Lösungen mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden über Nacht bei 55 °C und am nächsten Tag für 1 h bei 65 °C gebacken. Dann folgte 3 min Backen auf Stufe 4 in der Mikrowelle.

Nun wurden die Schnitte mit Xylol deparaffinisiert (zwei Waschschrte á 5 min) und durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert (2x5 min 100 % EtOH, dann je 1 min 90, 80 und 70 % EtOH). Nach einer weiteren Minute in destilliertem Wasser wurden die Schnitte für 15 min in 88-95 °C warmen 10 mM Citratpuffer (pH 7,4) inkubiert und dann für 10 min abkühlen gelassen.

**Citratpuffer (500 ml):** 9 ml 100 mM Zitronensäure, 41 ml 100 mM Na-Citrat, 450 ml Aqua dest.

Dann folgte ein 20 min Inkubationsschritt bei 4 °C in 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBST. Nachdem die Schnitte nun 4x5 min mit PBST gewaschen worden waren, wurden sie für 1 h in 1 % BSA und 10 % normal goat serum in PBST inkubiert (feuchte Kammer).

**10x PBS:** 80 g NaCl, 2 g KCl, 5,7 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, auf 1 l Aqua dest.

**PBST:** 1 l PBS, 4 Tropfen Tween 20

Nun folgte ein weiterer Inkubationsschritt in der feuchten Kammer mit dem 1. Antikörper (gegen Bv-(FGF-BP) affinitätsgereinigter polyklonaler Antikörper, freundlicherweise von Dr. Achim Aigner zur Verfügung gestellt, 1:250 in 1 % BSA in PBST) über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurde die Lösung abgesaugt und die Schnitte erneut 4x5 min in PBST gewaschen. Nun wurden sie mit dem 2. Antikörper (biotinylierter Anti-Kaninchen IgG-Antikörper von Ziege, 1:500 in PBST, 1 % BSA) für 20 min in der feuchten Kammer inkubiert. Dann folgten wieder 4x5 min Waschschrte mit PBST, bevor die Schnitte mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-Kit, es wurde die Vorschrift des Herstellers befolgt) behandelt wurden (feuchte Kammer).

Danach folgte ein weiterer 4x5 min Waschschrte mit PBST, bevor die Schnitte mittels Diaminobenzidin entwickelt wurden. Dazu wurde zunächst 250 mg Diaminobenzidin in 50 ml Aqua dest. gelöst (15 min Magnetrührer). Dann wurden dieser Lösung 180 ml 1x PBS und 20 ml 1M Tris/HCl (pH 7,5) zugesetzt. Von dieser Mischung wurden 250 ml in einen Waschbehälter gegeben. Unmittelbar vor Gebrauch wurden noch 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) hinzupipettiert. In dieser Lösung wurden die Schnitte nun für 3-6 min inkubiert.

Die Reaktion wurde in Aqua dest. gestoppt und die Schnitte 5-15 sec mit Hämatoxilin gegengefärbt. Nun wurde die Alkoholreihe in entgegengesetzter Richtung wie oben beschrieben durchgeführt und die Schnitte schließlich eingebettet und versiegelt.

#### **2.4.3.1. Beurteilung der Färbeintensität der Prostata-Ca-Schnitte**

Die Färbeintensität der Prostata-Ca-Schnitte (als Maß für die Stärke der FGF-BP-Expression) sollte beurteilt werden. Dazu wurden zunächst einzelne Schnitte unter dem Mikroskop gesichtet. Danach wurden alle Schnitte komplett unter dem Mikroskop begutachtet und jedem Schnitt mittels drei verschiedener Verfahren ein Wert für seine Färbeintensität zugeordnet:

1. Es wurden für die verschiedenen beobachteten Färbeintensitäten fünf Abstufungen gewählt, die mit „sehr stark“, „stark“, „mittel“, „schwach“ und „gar nicht“ bezeichnet wurden. Dann wurde beurteilt, wie viel Fläche ungefähr

anteilig auf jedem Schnitt von den einzelnen Färbeintensitäten eingenommen wurde. Dieser anteiligen Fläche wurde dann der entsprechende prozentuale Wert zugeordnet.

Um die Färbeintensität jedes einzelnen Schnittes numerisch erfassen zu können, wurde folgendermaßen verfahren: Die prozentuale Fläche eines Schnittes die mit „sehr stark“ beurteilt worden war, wurde mit 4, „stark“ mit 3, „mittel“ mit 2, „schwach“ mit 1 und „sehr schwach“ mit 0 multipliziert. Die Resultate wurden dann addiert. Danach konnte jedem Schnitt ein Wert zwischen 0 und 400 zugeordnet werden.

2. Den Schnitten, deren Fläche zu mehr als 50 % mit „stark“ oder „sehr stark“ angefärbt beurteilt worden war, wurde der Wert 3 zugeordnet. Schnitte die zu mehr als 50 % „schwach“ oder „gar nicht“ angefärbt waren erhielten den Wert 1, alle anderen Schnitte den Wert 2 .

3. Eine zweite Person beurteilte die Schnitte, indem sie jedem Schnitt einen Wert von 1-3 zuteilte. Dabei stand 3 für eine starke, 2 für eine mittlere und 1 für eine schwache Färbeintensität

#### **2.4.3.2. Korrelation der Färbeintensitäten der Prostata-Ca-Schnitte mit den Patientendaten**

Die einzelnen Patientendaten der jeweiligen Schnitte (freundlicherweise von Dr. H.Y. Leung, University of Newcastle, Scotland, UK zur Verfügung gestellt) sollten mit den Färbeintensitäten der Schnitte korreliert werden.

Bei den Patienten waren folgende Daten erhoben worden: Der FGF-1-Spiegel im Serum, der FGF-8-Spiegel im Serum, das histologische Grading, die Gleason-Einteilung, der PSA-Spiegel im Serum, die Hormon-Sensibilität und das Tumor-Staging.

Leider standen nicht bei jedem Schnitt alle Parameter zur Verfügung. Von 88 Patienten, deren Prostata-Ca-Schnitte angefärbt worden waren, fehlten bei 45 der PSA-Spiegel, bei 43 war die Hormon-Sensibilität unbekannt, bei 24 fehlte der FGF-1-Spiegel, bei dreien das Tumor-Staging und bei einem die Gleason-Einteilung. Das histologische Grading und der FGF-8-Spiegel war bei allen Patienten erhoben worden.

Nun wurden die verschiedenen Parameter der Patientendaten mittels Computer mit den Werten der Farbeintensität der Schnitte (für alle drei Verfahren) korreliert.

## **2.5. Molekularbiologische Methoden**

### **2.5.1. Transformation von DH10Bac kompetenten Zellen mit HTa/FGF-2-Plasmid**

Die Transformation erfolgte nach der Vorschrift aus dem Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems Instruction Manual (Life Technologies). Zunächst wurden Agarplatten mit folgenden Antibiotikazusätzen vorbereitet: 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamycin, 10 µg/ml Tetracyclin, 40 µg/ml X-gal (weis/blau-Selektion) und 40 µg/ml IPTG.

Dann wurden die DH10Bac kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 100 µl der Zellen in ein 15 ml Röhrchen pipettiert. Nachdem 1 ng (in 5 µl) HTa/FGF-2-Plasmid hinzugegeben wurde, wurde die Suspension durch vorsichtiges Antippen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte ein 45 s Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C, wonach die Mischung wieder für 2 min auf Eis abgekühlt wurde. Nun wurden 900 µl LB-Medium hinzupipettiert und das Röhrchen bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator für 4 h inkubiert.

Nun wurden mit LB-Medium  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  Verdünnungen von dieser Mischung angefertigt. 100 µl von jeder Konzentration wurden dann auf Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert.

### **2.5.2. Reinigung von rekombinanter Bacmid-DNA**

Die Reinigung orientierte sich an der Vorschrift aus dem Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems Instruction Manual (Life Technologies). Nach der Transposition (siehe Punkt 2.5.1.) konnten am nächsten Tag weiße (Bakterien mit Plasmid) und blaue (Bakterien ohne Plasmid) Kolonien unterschieden werden. 15 ml-Röhrchen mit je 2 ml LB-Medium und 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamycin und 10 µg/ml Tetracyclin wurden vorbereitet und mittels einer sterilen Pipettenspitze mit je einer weißen (7 Ansätze), einer blauen (2 Ansätze,

Kontrolle) oder keiner (1 Ansatz, Kontrolle) Bakterienkolonie beimpft. Die Röhren wurden dann auf einem Schüttler bei 37°C für 24 h inkubiert.

1,5 ml jedes Ansatzes wurden in ein Eppendorfgefäß pipettiert und für 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden mit einer Pipette abgezogen und die Sedimente vorsichtig in 0,3 ml Puffer 1 (15 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Dann wurden jeweils 0,3 ml Puffer 2 (0,2 N NaOH, 1 % SDS) dazugegeben, vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nun wurden 0,3 ml 3 M Kaliumacetat (pH 5,5) dazu pipettiert und die Röhren für 10 min auf Eis inkubiert. Jetzt folgte eine 10 min Zentrifugation bei 12000 rpm. Währendessen wurden Eppendorfgefäße mit jeweils 0,8 ml Isopropanol vorbereitet, in welche dann der Überstand der Zentrifugation pipettiert wurde. Diese Eppendorfgefäße wurden dann vorsichtig invertiert und für 10 min auf Eis inkubiert.

Nun folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 min bei 12000 rpm, wonach die Überstände abpipettiert wurden und die Sedimente mit 0,5 ml 70 % Ethanol gewaschen wurden (Ethanol dazu pipettieren, mehrmals invertieren, bei 12000 rpm für 5 min zentrifugieren, Ethanol abpipettieren). Nachdem die Sedimente 10 min getrocknet waren, wurden sie in 50 µl Aqua dest. aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### **2.5.3. DNA-Konzentrationsmessung mittels Spektralphotometer**

Die Konzentrationsbestimmung der Bacmid-DNA nach ihrer Reinigung (siehe Punkt 2.5.2.), der FGF-BP-DNA nach der Maxi-Präparation, oder der FGF-BP-DNA nach Restriktion und Phenolextraktion (siehe Punkt 2.5.6., 2.5.7. u. 2.5.8.) erfolgte mittels eines Spektralphotometers. Die Proben wurden 1:10 verdünnt und in einer Quarzküvette unter Standardbedingungen bei 260 nm und 280 nm gemessen. Bei hohen Messwerten (Absorption > 0,8) wurde die Probe weiter verdünnt und erneut gemessen.

Der Reinheitsgrad wurde errechnet, indem die Absorption bei 260 nm durch die bei 280 nm geteilt wurde. Die DNA-Konzentration errechnete sich aus der Formel:  $\text{Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorption bei } 260 \text{ nm} / 0,02$ , wobei der Verdünnungsfaktor der Probe zu berücksichtigen war.



#### 2.5.4. PCR mit gereinigter Bacmid-DNA

Für eine PCR mit der gereinigten Bacmid-DNA (siehe Punkt 2.5.2.) wurde pro Probe (vier Proben, drei mit Bacmid-DNA, eine Negativ-Kontrolle) folgender Ansatz in ein PCR-Röhrchen pipettiert: 38,5 µl Aqua dest., 5 µl 10x PCR Puffer, 1 µl dNTP, 1,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 µl M13-Rev Primer, 1,25 µl M13-Forward Primer, 1 µl Probe, 0,5 µl Taq-Polymerase.

Folgende Einstellungen wurden an der PCR-Maschine gewählt: Zunächst eine Inkubation für 3 min bei 93 °C, dann 30 Zyklen á 45 s bei 94 °C, 45 s bei 55 °C und 5 min bei 72 °C. Danach wurden die Proben bei -20°C gelagert.

#### 2.5.5. Agarose-Gelelektrophorese

Zunächst wurde ein Agarose-Gel (0,5 % bzw. 0,7 %) gegossen. Dazu wurden in einem Erlenmeyerkolben Agarose (0,5 g bzw. 0,7 g) in 100 ml TAE-Puffer suspendiert und für 5 min in der Mikrowelle gekocht. Nun wurden 4 µl Ethidiumbromid hinzupipettiert und die Lösung in den Trog der Gelapparatur gegossen. Beim Hantieren mit dem Ethidiumbromid und dem weiteren Umgang mit dem Gel wurden besondere Schutzhandschuhe getragen. Ein Kamm wurde an der Gelapparatur befestigt, um die später nötigen Taschen in dem sich abkühlenden Gel zu formen.

**TAE-Puffer:** 40 mM Tris-Acetat, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O, pH ca. 8,5

Nachdem das Gel nach ca. 30 min abgekühlt war, wurde es in die Gel-Laufkammer eingesetzt und diese mit TAE-Puffer gefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. Die Proben wurden mit Probenauftragspuffer und TAE zusammenpipettiert, so dass ein gut aufzutragendes Volumen (5 µl-25 µl) resultierte. Diese wurden dann, ebenso wie der Marker (10 µl 1 kb-Ladder), in die Taschen des Gels pipettiert.

**10x Probenauftragspuffer:** 49,75 % Aqua dest., 49,75 % Glycerol, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylenocyanol

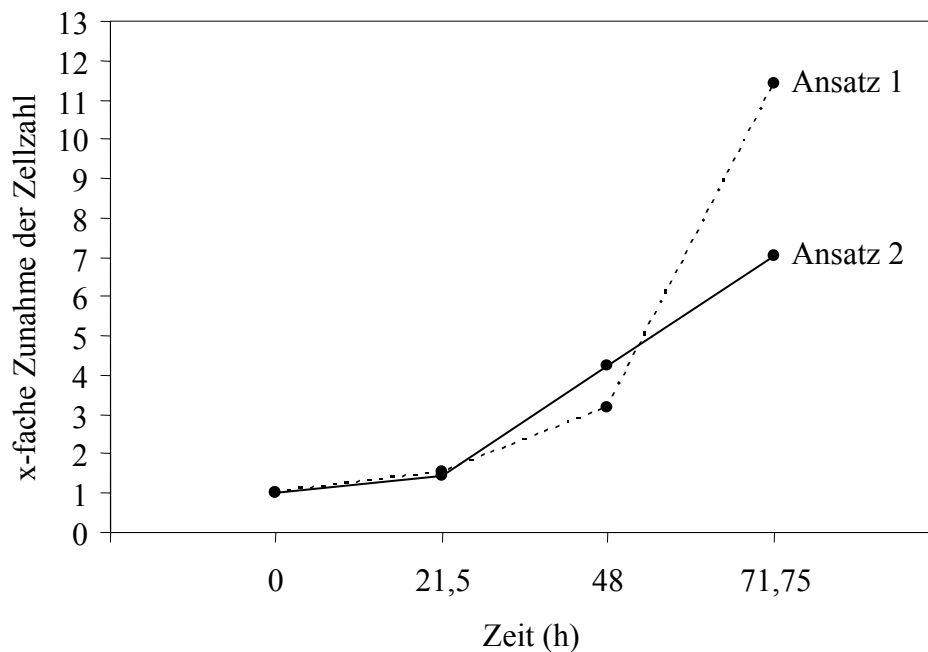
Je nach Proben- bzw. Gelart wurden dann verschiedene Spannungen über verschiedene Zeiträume mittels eines Spannungsgerätes angelegt. Für ein 0,5 % Übernachtgel mit den Ergebnissen der Bacmid-DNA-Reinigung wurden 23 V für 12 h angelegt. Um die Ergebnisse der PCR mit der gereinigten Bacmid-DNA zu überprüfen, wurden 100 V für 30 min angelegt und zur Überprüfung der Restriktion der FGF-BP-DNA wurden 100 V und 1,5 h gewählt.

Das fertige Gel wurde dann zur Beurteilung auf eine UV-Bank gelegt, zur Protokollierung mit einer digitalen Kamera abfotografiert und dann verworfen (spezieller Ethidium-Bromid Abfallbehälter).

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Etablierung der Suspensionskultur von Sf-9 Insektenzellen

Eine Wachstumskinetik der Sf-9 Zellen in Suspensionskultur wurde durch das Auszählen der Zellen (siehe Punkt 2.2.1.) zu verschiedenen Zeitpunkten erstellt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.1. zu sehen.



**Abb. 3.1.:** Wachstumskinetik der Sf-9 Zellen in Suspensionskultur in zwei verschiedenen Ansätzen. Vervielfachung der Zellzahl (absolute Zellzahl auf 1 normiert) gemessen ab dem Beginn der Kultivierung der Sf-9 Zellen in Suspension.

Dieses Diagramm zeigt, dass die Verdopplungsgeschwindigkeit der Sf-9 Zellen in Suspensionskultur im Schnitt 23 h beträgt (graphisch ermittelt). Betrachtet man die absolute Zellzahl, so ist auch bei 12 Mio. Zellen/ml noch kein Plateau erreicht (Daten nicht gezeigt).

### 3.2. Vergleich von Adhäsionskultur und Suspensionskultur

Die Ausbeute an rekombinatem Bv-(FGF-BP) aus Sf-9 Zellen, die entweder in Zellkulturflaschen (Adhäsionskultur) oder in Erlenmeyerkolben (Suspensionskultur, siehe Punkt 2.2.1.) kultiviert worden waren, sollte verglichen werden.

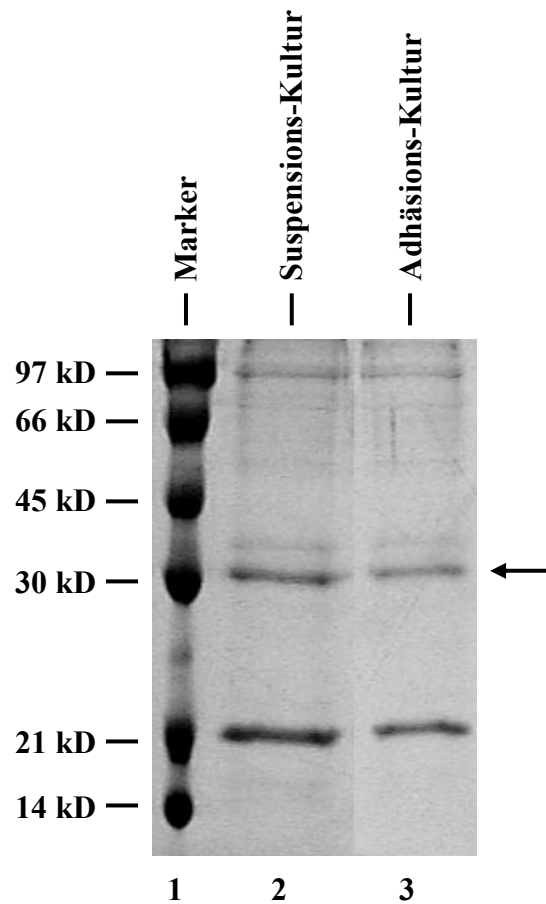
Zu diesem Zweck wurde zunächst eine gleich große Menge an Zellsediment (mit Baculoviren infizierte und dann geerntete Zellen, siehe Punkt 2.2.3.) abgewogen und mit diesen Proben eine Bv-(FGF-BP)-Affinitätsreinigung (siehe Punkt 2.3.1.) durchgeführt. Dann wurde die Absorption bei 280 nm der jeweiligen Eluate E<sub>1</sub>-E<sub>3</sub> mittels eines Spektralphotometers bestimmt und die Proteinkonzentration berechnet (siehe Punkt 2.3.2.). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1. dargestellt.

**Tabelle 3.1.:** Ergebnisse der Proteinkonzentrationsmessungen

	Adhäsionskultur			Suspensionskultur		
Eluat	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>
A <sub>280 nm</sub>	0,08	0,03	0,034	0,079	0,051	0,016
C (mg/ml)	0,14	0,05	0,06	0,14	0,09	0,03

Alle Proben wurden vor der Messung 1:10 verdünnt, was bei der Bestimmung der Konzentration berücksichtigt wurde.

Nun wurden die beiden Eluate E<sub>1</sub> in einem Centriconröhrchen von 500 µl auf 50 µl eingengt (siehe Punkt 2.3.1.). Mit den eingengten Proben wurde dann eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe Punkt 2.3.5.) und das Gel hinterher mit Coomassie-Färbelösung angefärbt (siehe Punkt 2.3.6.). Das abfotografierte Gel ist in Abbildung 3.2. zu sehen.



**Abb. 3.2.:** Nachweis der Bv-(FGF-BP)-Expression über SDS-PAGE, Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel. Bv-(FGF-BP) (siehe Bande auf Höhe des Pfeils) aus Suspensions- und Adhäsionskultur.

Auf dem Gel sind drei Spuren zu erkennen, eine mit dem Marker und zwei mit den Proben. In den beiden Spuren mit den Proben sind verschiedene Banden zu sehen, von denen, bei identischem Bandenmuster, die drei stärksten auf der Höhe von ca. 97 kD, 30 kD und 21 kD laufen. Bei der mit dem Pfeil markierten 30 kD-Bande handelt es sich um das gereinigte Bv-(FGF-BP). Bei den starken Banden bei 21 kD handelt es sich um akzidentiell mitgereinigtes Protein, im späteren Western-Blot ist die Bande nicht mehr zu sehen.

Die Banden der Suspensionskultur sind ein wenig stärker als die der Adhäsionskultur.

### 3.3. Expression von FGF-2 durch Transfektion von Sf-9 Zellen

Zunächst wurden DH10Bac kompetente Zellen transformiert und kultiviert (siehe Punkt 2.5.1.). Aus diesen Bakterien wurde nun die Plasmid-DNA gereinigt (siehe Punkt 2.5.2.). Mittels eines Spektralphotometers wurde die Absorption der Proben bei 260 nm und 280 nm gemessen und aus diesen Werten die DNA-Konzentration und der Reinheitsfaktor der Ansätze berechnet (siehe Punkt 2.5.3.). Als Negativ-Kontrolle wurde eine Probe mit Bakterien ohne die Plasmid-DNA mitgeführt.

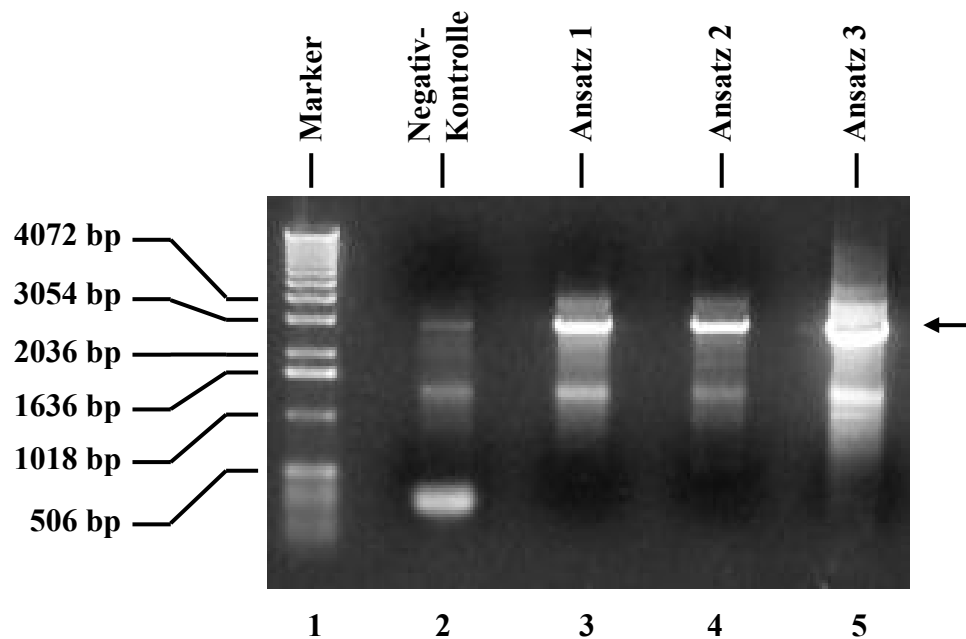
Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2. dargestellt.

**Tabelle 3.2.:** Ergebnisse der DNA-Konzentrations- und Reinheitsmessung

	Verdünnung	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	R	c
Negativ-Kontr.	1:20	0,297	0,175	1,7	29,7 µg/ml
Ansatz 1	1:20	0,203	0,104	1,95	20,3 µg/ml
Ansatz 2	1:10	0,068	0,045	1,5	3,4 µg/ml
Ansatz 3	1:10	0,636	0,411	1,55	31,8 µg/ml

R = Reinheitsfaktor, c = Konzentration

Zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion wurde nun mit den drei Ansätzen eine PCR durchgeführt (siehe Punkt 2.5.4.). Die Ergebnisse dieses Experimentes wurden dann mit einem 0,7% Agarosegel überprüft (siehe Punkt 2.5.5.). Das abfotografierte Gel ist in Abbildung 3.3. zu sehen.

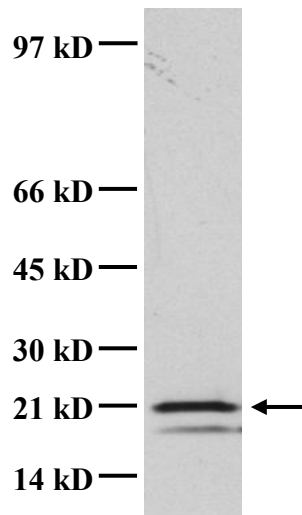


**Abb. 3.3.:** Analyse der PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese, abfotografiertes Gel. Mit dem Pfeil markiert: Bande der Bacmid-DNA bestehend aus HTa-Vektor und FGF-2-Insert.

Auf dem Gel sind fünf Spuren zu erkennen. In der ersten Spur sieht man den Marker, in den anderen vier Spuren die Negativ-Kontrolle (Spur 2) und die Ansätze (Spur 3-5). Spur 2 (Negativ-Kontrolle) weist drei Banden auf. Sie laufen bei ca. 2900 bp, 1400 bp und unterhalb von 506 bp, wobei die letzte am stärksten ist. Hierbei handelt es sich um das PCR-Produkt ohne Vektor, das laut Vorschrift (Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems Instruktion Manual) bei 300 bp läuft.

Die Ansätze 1-3 weisen zwei Banden bei ca. 2900 bp (stärker) und ca. 1400 bp (schwächer) auf. Ansatz 3 zeigt stärkere Signale als Ansatz 1 und diese wiederum stärkere als Ansatz 2. Die mit dem Pfeil markierte Bande bei ca. 2900 bp (Ansatz 1-3) ist die Bacmid-DNA mit dem HTa-Vektor und der FGF-2-Insertion. Laut Vorschrift läuft die Bacmid-DNA mit HTa-Vektor bei 2430 bp. Mit der 470 bp großen FGF-2-Insertion kommt man auf 2900 bp.

Die Sf-9 Zellen wurden jetzt mit der gereinigten FGF-2 Bacmid-DNA transfiziert (siehe Punkt 2.2.2.). Um nachzuprüfen, ob die Transfektion erfolgreich war und die Sf-9 Zellen nun FGF-2 exprimierten, wurde ein Western-Blot (siehe Punkt 2.4.2.) mit geernteten Zellen (siehe Punkt 2.2.3.) durchgeführt. Das Ergebnis des Western-Blots ist in Abbildung 3.4. zu sehen.

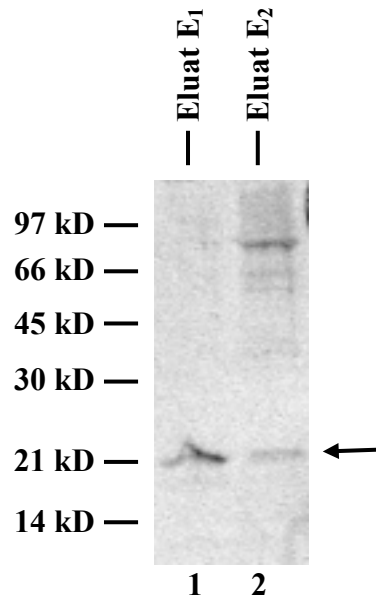


**Abb. 3.4.:** Nachweis der FGF-2-Expression (siehe Pfeil) durch transfizierte Sf-9 Zellen über Western-Blot.

Auf der Abbildung ist eine Spur mit zwei Banden, einer starken und einer schwachen, zu sehen. Die starke Bande läuft bei ca. 21 kD, die schwache bei ca. 18 kD. Die mit dem Pfeil markierte Bande bei ca. 21 kD zeigt das gereinigte Bv- (FGF-2).

Mit den Lysaten der geernteten Zellen (siehe Punkt 2.2.3.) wurde eine Affinitätsreinigung (siehe Punkt 2.3.1.) durchgeführt. Die resultierenden Eluate E<sub>1</sub> und E<sub>2</sub> wurden dann mittels eines Centriconröhrchens von 500 µl auf 50 µl eingengt (siehe Punkt 2.3.1.). Mit den eingengten Proben wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe Punkt 2.3.5.) und das Gel hinterher mit Coomassie-Färbelösung angefärbt (siehe Punkt 2.3.6.). Das abfotografierte Gel ist in Abbildung 3.5. zu sehen.





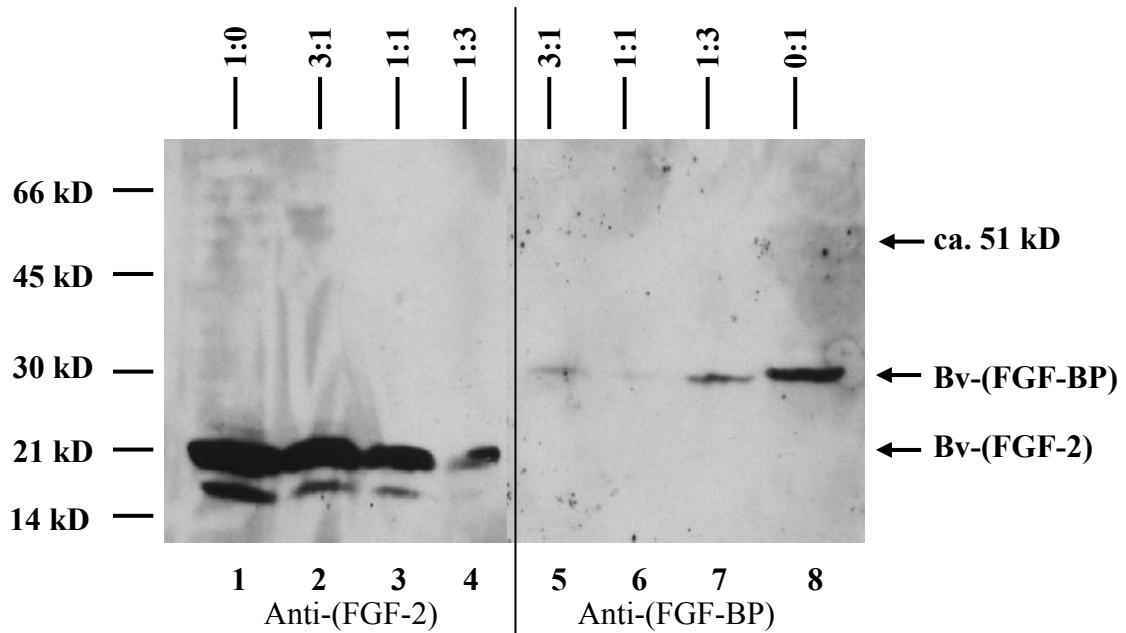
**Abb. 3.5.:** Nachweis des gereinigten Bv-(FGF-2) (siehe Pfeil) über SDS-PAGE. Abfotografiertes Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel.

Auf der Abbildung ist in beiden Spuren eine Bande bei ca. 21 kD (mit Pfeil markiert) erkennbar, bei der es sich um das Bv-(FGF-2) handelt. In der ersten Spur (Eluat E<sub>1</sub>) ist die Bande stärker als in der zweiten (Eluat E<sub>2</sub>). Die zweite Spur weist zudem noch eine Bande bei ca. 85 kD auf.

### 3.4. Doppelinfektion von Sf-9 Zellen mit Bv-(FGF-2) und Bv-(FGF-BP)

Sf-9 Zellen wurden gleichzeitig mit Bv-(FGF-2) und Bv-(FGF-BP) in vier verschiedenen Verhältnissen (Bv-(FGF-2) : Bv-(FGF-BP)) infiziert (siehe Punkt 2.2.3.). Mittels eines Western-Blots (siehe Punkt 2.4.2.) wurde überprüft, ob die Zellen nun sowohl FGF-2 als auch FGF-BP produzieren und ob die beiden Proteine unter den gegebenen Bedingungen einen Komplex bilden.

Dazu wurde bei der SDS-PAGE in die Spuren 1-4 und 5-8 jeweils die vier verschiedenen Proben geladen und die resultierende Nitrocellulosemembran in der Mitte durchgeschnitten. Die Membranhälfte mit den Spuren 1-4 wurde mit einem Antikörper gegen FGF-2, die mit den Spuren 5-8 mit einem Antikörper gegen FGF-BP (siehe Punkt 2.4.1.) inkubiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.6. zu sehen.



**Abb. 3.6.:** Nachweis von Bv-(FGF-2) und Bv-(FGF-BP) über Western-Blot, jedoch kein Komplex (z.B. bei 51 kD denkbar, siehe Pfeil) sichtbar.

In der Abbildung sind 8 Spuren zu erkennen. Oben wurde markiert, welche Spur mit welcher Probe beladen wurde. In den Spuren 1-4 sind jeweils zwei Banden bei ca. 21 kD (kräftige Bande) und ca. 18 kD (schwächere Bande) zu erkennen, wobei die Signale von Spur eins bis Spur vier abnehmen. Die mit dem Pfeil markierten 21 kD-Banden sind die Bv-(FGF-2)-Signale.

In den Spuren 5-8 ist jeweils eine Bande bei ca. 30 kD zu erkennen. Das Signal ist in Spur 8 am stärksten und nimmt bis Spur 5 stetig ab (Ausnahme: die Bande fehlt in Spur 6). Die Banden zeigen das Bv-(FGF-BP).

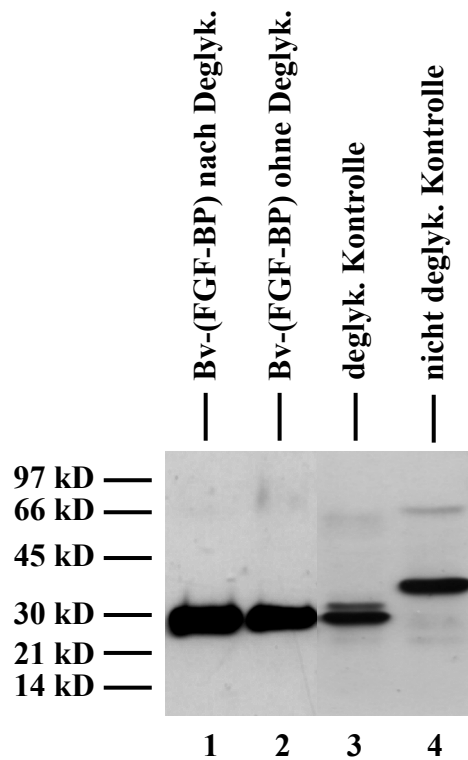
Ein Komplex aus Bv-(FGF-2) (läuft bei ca. 21 kD) und Bv-(FGF-BP) (läuft bei ca. 30 kD) ist bei ca. 51 kD zu erwarten. Auf dieser Höhe ist auf beiden Hälften keine Bande sichtbar und auch sonst ist unter diesen denaturierenden Bedingungen keine weitere Bande zu erkennen.

### **3.5. Deglykosilierung von Bv-(FGF-BP)**

Das rekombinante Bv-(FGF-BP) sollte besser charakterisiert und seine Laufhöhe in den Gelen, welche von der berechneten Höhe abweicht, erklärt werden.

Dazu wurde zunächst eine Probe des rekombinanten Proteins deglykosyliert (siehe Punkt 2.3.3.). Diese Probe wurde dann gemeinsam mit einer anderen Probe (ebenfalls Bv-(FGF-BP) auch umgepuffert, aber nicht deglykosyliert) mittels eines Western-Blots untersucht. Es wurden jeweils gleich große Mengen an Bv-(FGF-BP) geladen. Das Ergebnis des Western-Blots ist in Abbildung 3.7., Spur 1 und 2 zu sehen.

Um zu überprüfen, ob die Deglykosilierung unter den gegebenen Pufferbedingungen überhaupt funktioniert, wurde eine Positivkontrolle mit Vergleichsproteinen (diese wurden mir freundlicherweise von Dr. Hans-Jörg Martin zur Verfügung gestellt) durchgeführt. Bei der Untersuchung durch einen Western-Blot wurden eine deglykosylierte und eine nicht deglykosylierte Probe unter gleichen Pufferbedingungen geladen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.7., Spur 3 und 4 zu sehen.



*Abb. 3.7.:* Nachweis von Bv-(FGF-BP) nach Deglykosilierung/ohne Deglykosilierung bzw. eines Kontrollproteins im Western-Blot mittels der jeweiligen spezifischen Antikörper.

In Spur 1 und 2 dieser Abbildung erkennt man jeweils zwei starke Banden bei ca. 30 kD. Diese Signale rühren vom behandelten und nicht behandelten Bv-(FGF-BP) her, die beide auf gleicher Höhe laufen.

In den Spuren 3 und 4 ist jeweils eine starke Bande zu erkennen. In Spur 3 läuft sie bei ca. 30 kD (Signal der deglykosylierten Probe) und in Spur 4 bei ca. 34 kD (Signal der nicht deglykosylierten Probe).

### 3.6. Parakrine Aktivität von Bv-(FGF-BP) auf Tumorzellen

Um die Bioaktivität von Bv-(FGF-BP) weiter zu charakterisieren, wurde untersucht, ob die externe Zugabe von Bv-(FGF-BP) und FGF-2 das Wachstum von Tumorzellen stimuliert.

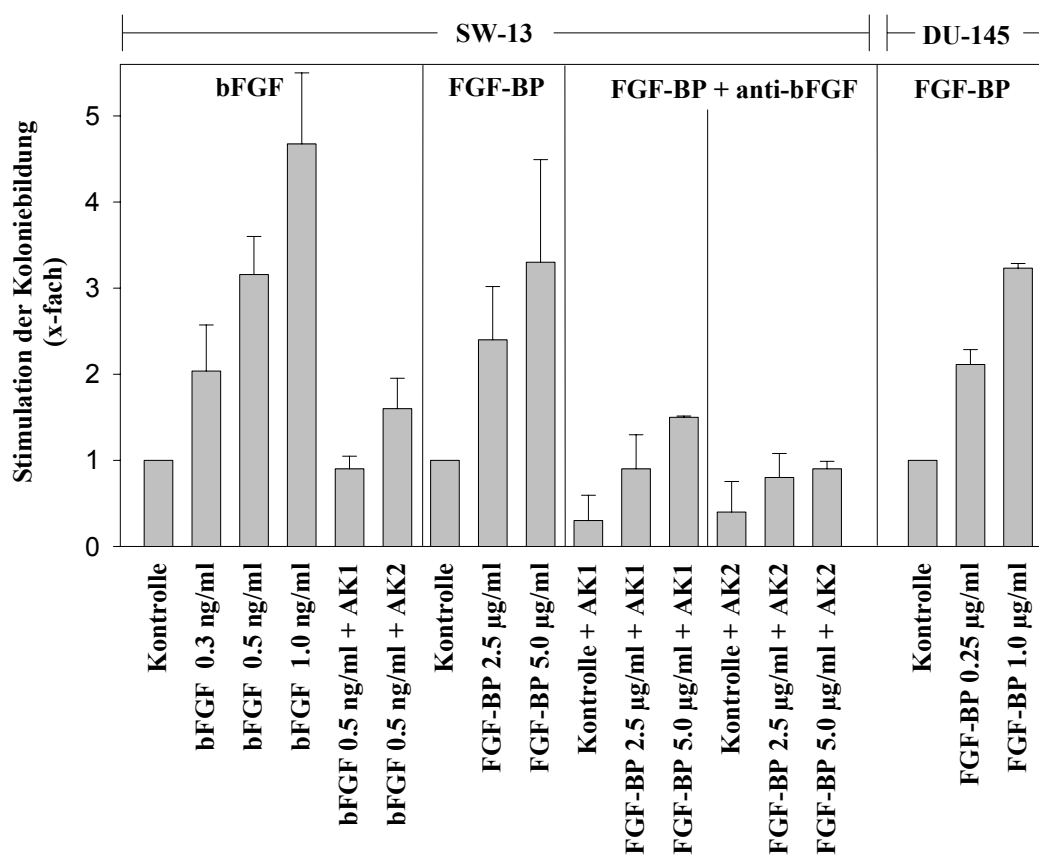
Zu diesem Zweck wurden Softagar-Assays mit SW-13-Nebennieren-Karzinom- und DU-145-Prostata-Karzinom-Zellen durchgeführt (siehe Punkt 2.2.4.).

Durch die Softagar-Technik war es möglich, das Wachstum der Tumorzellen *in vivo* besser zu simulieren als in der herkömmlichen adhärennten Zellkultur, da die Zellen ohne Anheftung an eine Oberfläche dreidimensional wachsen konnten. Zudem lässt sich im Softagar eine Aussage über die Fähigkeit einzelner Zellen treffen, frei von interzellulärer Stimulation Kolonien bilden zu können.

Bei den SW-13-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die zwar FGF-2 exprimiert, aber kein FGF-BP. Im Softagar bildet diese Zelllinie ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren keine Kolonien aus (Czubayko et al., 1994; Wellstein et al., 1990).

Im Gegensatz dazu exprimieren DU-145-Zellen sowohl FGF-2 (Nakamoto et al., 1992) als auch FGF-BP (Aigner et al., 2002) und bilden auch ohne exogene Stimulation im Soft-Agar Kolonien.

Die Ergebnisse der Softagar-Assays sind in Abbildung 3.8. dargestellt.



**Abb. 3.8.:** Induktion von SW-13/DU-145-Zellwachstum im Softagar (n = 3). Die Stimulation der Koloniebildung durch FGF-2 und FGF-BP im Softagar-Assay bei SW-13-Zellen wurde mit und ohne Zusatz zweier verschiedener FGF-2 Antikörper untersucht. FGF-BP stimulierte die Koloniebildung dosisabhängig (SW-13, Mitte), ebenso FGF-2 (SW-13, links). Der Zusatz von Anti-FGF-2-Antikörper AK1 (Sigma, 8,8 µg/ml) und AK2 (Promega, 1 µg/ml) hob diese Effekte auf (in der Abbildung jeweils rechts neben dem jeweiligen Experiment ohne Antikörper). FGF-BP regte ebenfalls die Ausbildung großer Kolonien der Zelllinie DU-145 an (rechts). Fehlerbalken = Standardabweichung.

Ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren bildeten die SW-13-Zellen wie vorherbeschrieben (s.o.) nur vereinzelt oder gar keine Kolonien aus.

Wie erwartet wurde die Koloniebildung der SW-13-Zellen durch die Zugabe von FGF-2 dosisabhängig stimuliert. Dieser Effekt konnte durch zwei verschiedene Anti-(FGF-2)-Antikörper aufgehoben werden.

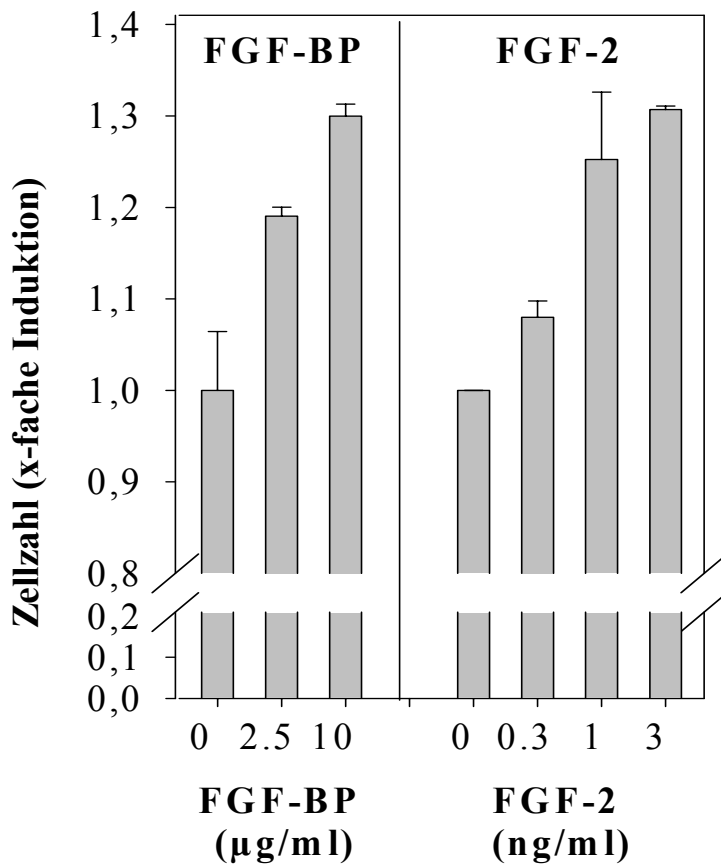
Ein vergleichbares Ergebnis konnte mit FGF-BP erzielt werden. Bei einer Konzentration von 5 µg/ml induzierte FGF-BP eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ), mehr als dreifach höhere Koloniebildung (vergleichbar mit FGF-2 bei einer Konzentration von 0.5 ng/ml) der SW-13-Zellen. Beide FGF-2-Antikörper blockierten diesen dosisabhängigen Effekt nahezu komplett (siehe Abb. 3.8.,  $p < 0,05$  für beide Antikörper).

Um diesen wachstumsstimulierenden Effekt von FGF-BP zu bestätigen, wurde das Experiment mit FGF-2- und FGF-BP-positiven DU-145-Prostata-Karzinom-Zellen wiederholt. Auch ohne Behandlung bildeten diese im Softagar Kolonien aus, wobei die Zugabe von FGF-BP in deutlich größeren Kolonien resultierte (>100 µm im Durchmesser). In diesem Experiment konnte eine 3-fache Stimulation der Ausbildung großer Kolonien schon bei 1 µg/ml beobachtet werden (siehe Abb. 3.8.,  $p < 0,01$ ). Als Ergebnis wurde festgehalten, dass FGF-BP das Tumorzellwachstum in verschiedenen Zelllinien parakrin und FGF-2-abhängig stimuliert.

### **3.7. Proliferation von Endothelzellen durch Bv-(FGF-BP)**

Um die angiogenetischen Eigenschaften von Bv-(FGF-BP) zu untersuchen, wurden mit HUVECs, humanen venösen Nabelschnur-Endothelzellen, Proliferations-Assays durchgeführt (siehe Punkt 2.2.5.).

Die Zellen wurden drei Tage lang mit einer einmaligen Gabe von Bv-(FGF-BP) (2,5 µg/ml oder 10 µg/ml) behandelt und die lebenden Zellen mittels WST-1 quantifiziert. Zum Vergleich wurde dasselbe Experiment mit FGF-2 (0,3 ng/ml, 1 ng/ml oder 3 ng/ml) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.9. dargestellt.



**Abb. 3.9.:** Stimulation des Wachstums von HUVECs in adhärenter Zellkultur ( $n = 3$ ). Die Zellzahlen wurden drei Tage nach einer einmaligen Dosis von Bv-(FGF-BP) bzw. FGF-2 erhoben. Fehlerbalken = Standardabweichung.

Das Experiment zeigte eine signifikant höhere Zellzahl in den mit Bv-(FGF-BP) behandelten Wells im Vergleich zu den Kontroll-Wells ( $p < 0,01$ ) und eine Dosisabhängigkeit dieses Effekts.

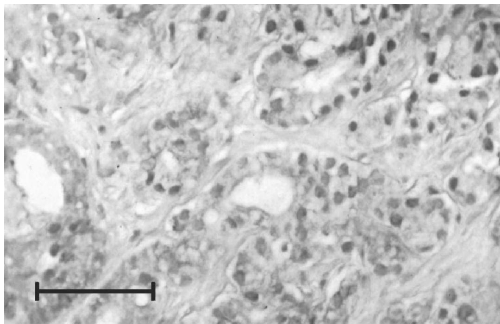
Der Vergleich mit exogen zugeführtem FGF-2 zeigt, dass maximale Induktion von Bv-(FGF-BP) dem Effekt von 3 ng/ml FGF-2 gleichkommt. Eine höher Induktion der Zellzahl konnte in diesem Experiment auch durch Zugabe von mehr als 3 ng/ml FGF-2 nicht erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Experimente zeigen, dass Bv-(FGF-BP) das Wachstum von endothelialen Zellen anregt.

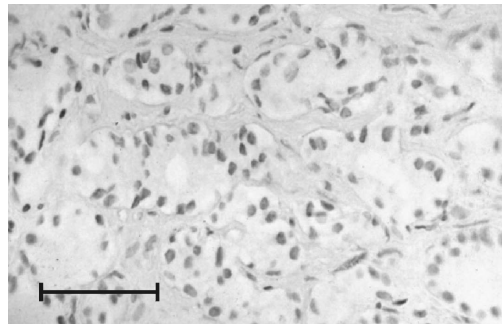


### 3.8. Immunhistochemische Anfärbung von FGF-BP auf Prostata-Ca-Schnitten

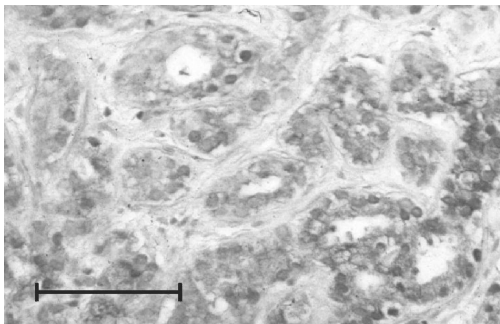
Zum Nachweis von FGF-BP in Prostata-Ca-Schnitten wurden immunhistochemische Färbungen vorgenommen (siehe Punkt 2.4.3.). Die Schnitte wurden mit FGF-BP-spezifischen Antikörpern behandelt (bis auf die Negativkontrollen) und mit Diaminobenzidin entwickelt (gelblich-braune Farbe, siehe Punkt 2.4.3.). Dann wurden sie mit Hämatoxylin gegengefärbt (blaue Farbe, bindet an saure Moleküle). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.10.-3.16. zu sehen.



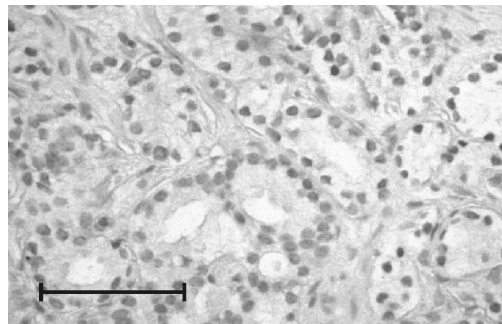
*Abb. 3.10.:* FGF-BP-spezifische Färbung.



*Abb. 3.11.:* Negativkontrolle.



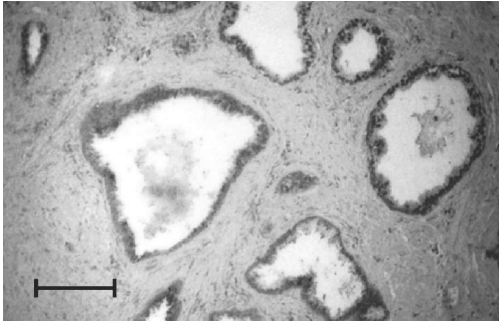
*Abb. 3.12.:* FGF-BP-spezifische Färbung.



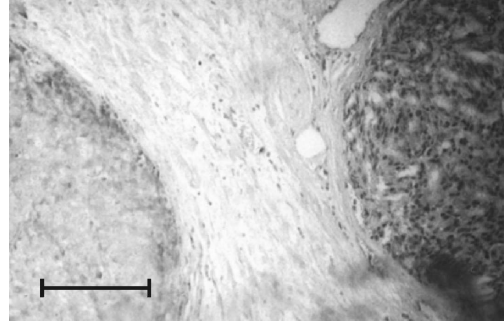
*Abb. 3.13.:* Negativkontrolle.

Die Abbildungen 3.10.-3.13. (jeweils eine spezifische Färbung mit Negativkontrolle) zeigen in zwei verschiedenen Vergrößerungen (die Balken entsprechen jeweils 100  $\mu\text{m}$ ) Gewebe von Prostatakarzinomen. Zu sehen sind angeschnittene Prostatadrüsen-Acini (Lumen und Drüsenepithel), Ausführungsgänge und Kapillaren umgeben von fibromuskulärem Stroma. Die Drüsenacini sind, typisch für differenzierte Prostataneoplasien, uniform, rund und dicht zusammengedrängt mit einer einzelnen Schicht von quadratisch anmutenden Epithelzellen. Die mit Anti-(FGF-BP)-Antikörpern behandelten Schnitte zeigen,

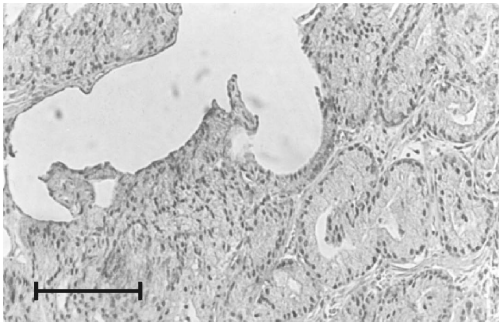
im Gegensatz zu den Negativkontrollen (welche nur die Hämatoxilin-Färbung aufweisen), eine kräftige gelblich-braune Anfärbung des Drüsenepithelzell-Zytosols sowie derer Zellkerne.



**Abb. 3.14.:** FGF-BP-spezifische Färbung. Drüsenacini, Ausführungsgänge, Stroma. Im Lumen: Prostatasekret.



**Abb. 3.15.:** FGF-BP-spezifische Färbung. Für Prostata-Adenokarzinome typische knotige Ansammlung von runden Drüsenacini. Bemerkenswert: Die Zellkerne des rechten Knotens sind angefärbt, die des linken nicht.



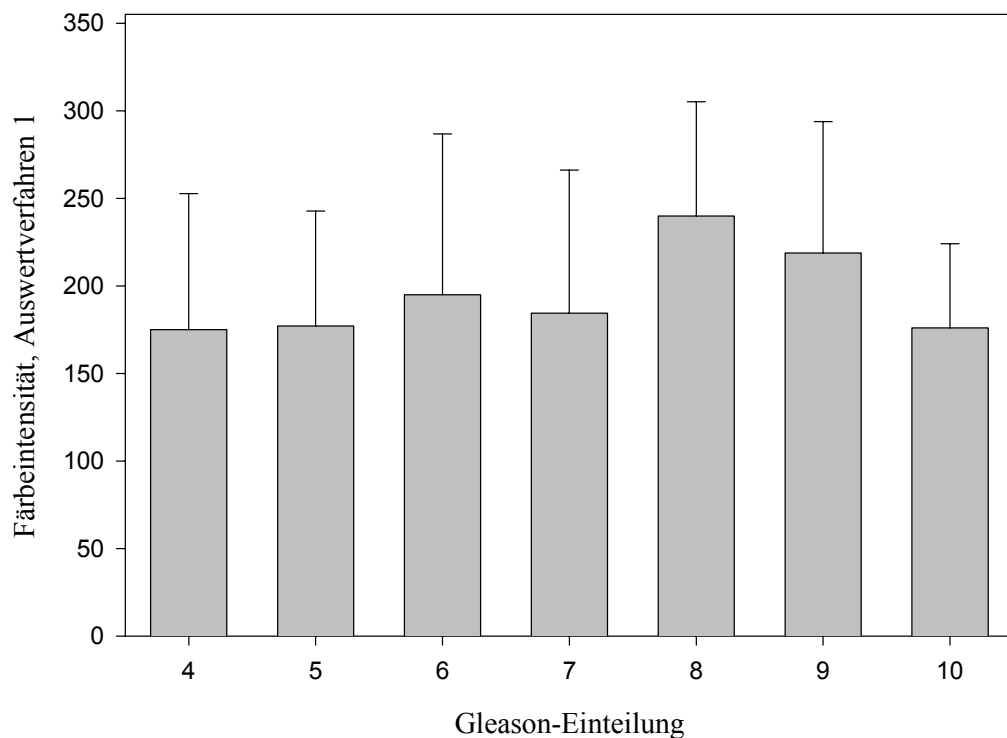
**Abb. 3.16.:** FGF-BP-spezifische Färbung. Schnitt einer anderen Charge von Färbungen.

Die Abbildungen 3.14.-3.16. zeigen zusätzlich zur Hämatoxilin-färbung deutliche Färbungen der Drüsenepithelien der Prostata (die Balken entsprechen jeweils 100  $\mu\text{m}$ ).

### 3.9. Korrelation der Färbeintensitäten der Prostata-Ca-Schnitte mit Patientendaten

Um einen Zusammenhang zwischen der Färbeintensität der Prostata-Ca-Schnitte (als Maß für die Stärke der FGF-BP-Expression) und dem klinischen Verlauf der einzelnen Fälle zu zeigen, wurden diese miteinander korreliert (siehe Punkt 2.4.3.2.).

Es zeigte sich, dass die gewählten Datensätze keine signifikante Korrelation aufwiesen. Der Graph in Abbildung 3.17. ist beispielhaft für die anderen, nicht gezeigten Ergebnisse.



**Abb. 3.17.:** Färbeintensität (Auswertverfahren 1) vs. Gleason-Einteilung (n = 87). Die Gleason-Einteilung der Prostatakarzinome korreliert nicht mit der beobachteten Färbeintensität der Schnitte. Fehlerbalken = Standardabweichung.

## 4. DISKUSSION

FGF-BP ist durch die Freisetzung und Aktivierung von FGF-1 und FGF-2 aus der extrazellulären Matrix ein wichtiger Faktor beim Wachstum verschiedener Tumoren. Es gibt Hinweise darauf, dass FGF-BP in diesen Fällen sogar eine „Schalterfunktion“ zukommt. Das würde bedeuten, dass diese Tumoren ohne FGF-BP nicht in der Lage wären zu wachsen.

Durch das spezifische Blockieren von FGF-BP könnte das Fortschreiten dieser malignen Erkrankungen gehemmt bzw. gestoppt werden. Daher liegt der Gedanke nahe, dass sich FGF-BP im Rahmen eines neuen Therapieansatzes als Ziel eignen könnte.

Da FGF-BP in solchen Fällen überexprimiert wird, kommt es auch als potentieller Tumor-Marker in Frage.

Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften sollte FGF-BP in dieser Arbeit weiter untersucht werden.

### 4.1. Vergleich von Adhäsions- und Suspensionskultur

In dieser Arbeit wurden große Mengen an rekombinatem Bv-(FGF-BP) benötigt. Deshalb wurde neben der bisher üblichen Adhäsionskultur die Suspensionskultur etabliert.

Die Sf-9 Zellen zeigen in der geschüttelten Suspensionskultur (siehe Abbildung 3.1.) gutes Wachstum. Ihre Verdopplungsgeschwindigkeit liegt bei ca. 23 h.

Außerdem bildet die Wachstumskinetik der Sf-9 Zellen in der Suspensionskultur auch bei 12 Mio. Zellen/ml noch kein Plateau. Da die Infektion der Zellen mit den Baculoviren in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen geschehen sollte, wurde der Zeitpunkt dafür auf ein Zelldichte von 10 Mio. Zellen/ml festgelegt.

Die Suspensionskultur wurde in Hinsicht auf die Effektivität der Bv-(FGF-BP)-Produktion mit der herkömmlichen Adhäsionskultur verglichen.

Die zu diesem Zweck durchgeführten Versuche zeigten, dass die Ausbeute an Bv-(FGF-BP) pro Zellzahl bei beiden Verfahren vergleichbar war. So wurde aus Zellysaten von gleich großen Zellsedimenten mittels Adhäsionskultur in 1,5 ml Eluat der Affinitätsreinigung eine Bv-(FGF-BP)-Konzentration von 83,3 µg/ml erzielt. Bei der Suspensionskultur lag die Konzentration bei 86,6 µg/ml.

Der Materialaufwand war jedoch bei den Insektenzellen in Adhäsionskultur ungleich größer. Aus einer einzigen großen Gewebzellkulturflasche konnten im Endeffekt 20 ml Medium mit infizierten Zellen geerntet werden. In der selben Zeit konnten mittels Suspensionskultur in einem einzigen Erlenmeyerkolben 200 ml erzielt werden.

Zusätzlich zur größeren Mediummenge wurde in Suspensionskultur auch eine höhere Zellzahl/ml erreicht. Eine überkonfluente Gewebzellkulturflasche, also ein Ansatz, der den geeigneten Infektionszeitpunkt sogar schon überschritten hatte, enthielt 9 Mio. Zellen/ml. In der Suspensionskultur zeigten die Zellen selbst bei 12 Mio. Zellen/ml noch ein exponentielles Wachstum. Man kann also mindestens noch einmal einen Faktor von 1,3 dazurechnen.

Damit würde man also 13 Gewebzellkulturflaschen benötigen, um das gleiche Ergebnis wie mit einer Suspensionskulturflasche zu erreichen.

Abgesehen von dem höheren Materialaufwand ist das Versorgen von 13 Gewebzellkulturflaschen auch ungleich zeitaufwendiger als das Versorgen einer einzigen Suspensionskulturflasche.

Die Verlaufskontrolle der Experimente gestaltete sich allerdings bei der Suspensionskultur schwieriger. In Adhäsionskultur war es nicht nur möglich, das Aussehen der Zellen unter dem Mikroskop besser zu beurteilen, sondern es konnte auch das Adhäsionsverhalten beobachtet werden. So war das Ablösen der Zellen vom Gewebzellkulturflaschenboden das erste Zeichen für die voranschreitende Infektion der Zellen durch die Baculoviren.

Trotzdem überwog der Vorteil der effizienteren Bv-(FGF-BP)-Produktion in Suspensionskultur gegenüber der besseren Kontrollierbarkeit der Insektenzellen in Adhäsionskultur. Daher wurde die Suspensionskultur von nun an der Adhäsionskultur vorgezogen.

#### 4.2. Untersuchung des Bindevhaltens von Bv-(FGF-BP) und Bv-(FGF-2)

Ursprünglich wurde postuliert, dass FGF-BP lediglich nicht-kovalent an FGF-2 bindet (Wu et al., 1991). Spätere Arbeiten wiesen aber auf die Existenz eines kovalenten und unter denaturierenden Bedingungen stabilen Komplexes hin, wobei zum Teil Di- und Trimere des FGF-BP an dem Komplex mit FGF-2 beteiligt zu sein schienen (Hoefen, bachelor thesis, Georgetown University 1997; Siegel, 2000).

Hier sollte dieser kovalente Komplex zwischen Bv-(FGF-2) und Bv-(FGF-BP) in einem intakten Zellsystem, das frei ist von dem endogenen Komplex, durch Koexpression dargestellt werden.

Zu diesem Zweck bot sich die Expression dieser beiden Proteine in Sf-9 Zellen (Insektenzellen) an, da diese weder FGF-BP noch FGF-1 und FGF-2 (zur Zeit die einzigen bekannten Bindungspartner von FGF-BP) exprimieren.

Zusätzlich zu einem bereits existierenden BAC-TO-BAC Baculovirus Expressionssystem für FGF-BP in Sf-9 Zellen wurde in dieser Arbeit die Expression von FGF-2 in einem System derselben Art etabliert.

Im Westernblot (siehe Punkt 3.3., Abb. 3.4.) wurde mittels spezifischer Antikörper gezeigt, dass die mit dem FGF-2-Expressionsvektor transfizierten Sf-9 Zellen auch tatsächlich FGF-2 produzieren.

Die Bande bei 21 kDa entspricht der erwarteten Größe des Bv-(FGF-2).

Um eine mögliche Komplexbildung aus Bv-(FGF-2) und Bv-(FGF-BP) zu untersuchen, wurden die beiden Proteine in Sf-9 Zellen koexprimiert. Im Zelllysats sollte mittels Westernblot der gesuchte Komplex nachgewiesen werden (siehe Punkt 3.4., Abb. 3.6.). Es resultierten die für Bv-(FGF-2) und Bv-(FGF-BP) spezifischen Banden bei 21 kDa und 30 kDa, was beweist, dass die Koexpression erfolgreich war.

Geht man von einer 1:1 Stöchiometrie zwischen Bv-(FGF-2) und Bv-(FGF-BP) aus, so wäre der Komplex bei 51 kDa zu erwarten gewesen. Auf dieser

Höhe war jedoch keine Bande sichtbar. Auch höher laufende Banden, resultierend aus einer von 1:1 abweichenden Stöchiometrie, existierten nicht.

Entweder wurde der Komplex unter den gewählten Bedingungen nicht ausgebildet, oder die Sensitivität des Westernblots war für einen Nachweis nicht ausreichend.

Man könnte spekulieren, dass Komplexe zwar ausgebildet wurden, aber aufgrund der stark denaturierenden Bedingungen bei der Probenvorbereitung für die SDS-PAGE (siehe Punkt 2.3.5.) wieder zerstört wurden.

Da in den früheren Arbeiten, die den Komplex gezeigt hatten, jedoch unter sehr ähnlichen Bedingungen gearbeitet worden war (Hoefen, 1997; Siegel, 2000), scheint diese Erklärung unwahrscheinlich.

Diesen Studien kann man allerdings auch entnehmen, dass die Komplexbildung nicht über Disulfidbrücken erfolgt. Die Proben wurden dort, wie in dieser Arbeit auch, zuvor in  $\beta$ -Mercaptoethanol inkubiert, was Disulfidbrücken zerstört.

Es müssen also andere Gründe vorliegen, warum es unter den gewählten Bedingungen nicht zur Komplexbildung kommt. Zu bedenken ist in jedem Fall, dass die rekombinanten Proteine beide mit His-Tags exprimiert wurden, was normalerweise nicht der Fall ist.

Zudem findet die Expression in Insektenzellen statt. Unter Umständen kommt es in den Sf-9 Zellen zu untypischen Glykosilierungen von Bv-(FGF-BP) und Bv-(FGF-2), welche ein Interagieren der beiden Partner verhindern könnten.

Auch die unterschiedliche Enzymausstattung der Insektenzellen ist ein potentiell Hindernis, da diese bestimmten Enzyme unter physiologischen Bedingungen im Menschen nicht vorliegen. Unter Umständen fehlt es in den Sf-9-Zellen auch einfach an Enzymen, die die Bindung von Bv-(FGF-2) und Bv-(FGF-BP) normalerweise katalysieren.

Es bedarf also noch weiterer Versuche, um die Eigenschaften des Komplexes aus FGF-BP und FGF-2 genauer zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck erscheint es sinnvoll, diesen zunächst einmal aus Gewebeproben oder geeigneten Zellkulturen zu isolieren und zu reinigen. Der

gereinigte Komplex selbst könnte dann genauer untersucht werden. Beispielsweise wäre man mittels Massenspektrometrie in der Lage, die Art der kovalenten Interaktion zwischen FGF-BP und FGF-2 aufzuklären. Auch könnten die hierfür relevanten Domänen auf den Proteinen lokalisiert werden.

#### **4.3. Deglykosilierung von Bv-(FGF-BP)**

Das in den Sf-9 Insektenzellen mittels Bv-Expressionssystem exprimierte, gereinigte Bv-(FGF-BP) wurde in der SDS-PAGE bei ca. 30 kDa nachgewiesen. Die vorausberechnete Molekülmasse lag allerdings bei 26,8 kDa.

Diese Diskrepanz zwischen rechnerisch vorhergesagter Größe von Bv-(FGF-BP) und dessen letztendlicher Laufhöhe in der SDS-PAGE wurde schon in anderen Arbeiten beschrieben (Lametsch et al., 2000; Aigner et al., 2001). Dabei ist allerdings zu bemerken, dass es sich in der Arbeit von Lametsch et al. um gereinigtes Rinder-FGF-BP handelte. Dieses sollte rechnerisch eine Größe von 22,5 kDa haben. Massenspektrometrie ergab ein Masse von 28,6 kDa und in Gelen lief es bei 36 kDa.

Sowohl das rekombinante Bv-(FGF-BP) als auch das native Rinder-FGF-BP laufen in der Gelelektrophorese also höher als erwartet.

Um als Ursache für die abweichende Laufhöhe eine mögliche Glykosilierung des Proteins an der beschriebenen einzigen N-Glykosilierungsstelle bei Asn-99 (Wu et al., 1991) zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine Deglykosilierung durchgeführt (siehe Punkt 3.5.). Der anschließende Westernblot mit der deglykosilierten Probe zeigt allerdings, dass offensichtlich keine, die Laufhöhe des Proteins beeinflussende Glykosilierung existiert (siehe Punkt 3.5., Abb. 3.7.).

Die abnorme Laufhöhe muss also andere Ursachen haben. Eine Möglichkeit bestünde in einem Verdau des Proteins durch Proteasen. In diesem Fall läge nicht mehr Bv-(FGF-BP) in seiner vollen Länge vor, würde dann allerdings zu tief und nicht zu hoch im Gel laufen. Außerdem konnte mittels Massenspektrometrie gezeigt werden, dass es sich in der Tat um das vollständige Protein handelt (Aigner et al., 2001).



Denkbar wäre auch, dass das beobachtete Phänomen in den physikalischen Eigenschaften des FGF-BP begründet liegt. Zur Diskussion stünden hier vor allem die Raumstruktur, eine besonders positive Ladung des Proteins bzw. der pK-Wert.

Warum Bv-(FGF-BP) eine abnorme Laufhöhe aufweist, bleibt unklar. Da jedoch gezeigt wurde, dass es sich um das vollständige Protein handelt, ist die dieses Phänomen für die weiterführenden Versuche zunächst irrelevant.

#### **4.4. Parakrine Aktivität von Bv-(FGF-BP) auf Tumorzellen**

Um die Bioaktivität des rekombinanten Bv-(FGF-BP)-Monomers im Sinne einer Wachstumsstimulation von Tumorzellen nachzuweisen, wurde dessen Wirkung auf SW-13-Nebennieren-Karzinom- und DU-145-Prostata-Karzinom-Zellen in Soft-Agar untersucht.

SW-13 Zellen benötigen exogenes FGF-2, um Soft-Agar-Kolonien auszubilden, und sind nicht dazu in der Lage, ihr endogenes FGF-2 zu nutzen (Czubayko et al., 1994; Wellstein et al., 1990).

Durch den Zusatz von rekombinantem Bv-(FGF-BP) konnte eine dosisabhängige, wachstumsstimulierende Wirkung auf die SW-13 Zellen beobachtet werden, vergleichbar der Zugabe von FGF-2.

Das rekombinante Bv-(FGF-BP) löste offensichtlich das in der extrazellulären Matrix gebundene endogene FGF-2 und ließ es so seine Rezeptoren erreichen und aktivieren. Diese Schlussfolgerung basiert auf der Tatsache, dass der beschriebene Effekt des Bv-(FGF-BP) durch die Zugabe zweier verschiedener FGF-2-Antikörpern unterdrückt werden konnte.

Da es bisher keine Hinweise dafür gibt, dass exogen zugeführtes Bv-(FGF-BP) von den Zellen internalisiert wird, scheint sich seine Wirkung auf die extrazelluläre Matrix zu beschränken.

Um den beobachteten wachstumsstimulierenden Effekt von Bv-(FGF-BP) zu sichern und eingehender zu untersuchen, wurde eine weitere Zelllinie mit anderen Eigenschaften ausgewählt. Die bei den folgenden Experimenten verwandten DU-145 Prostata-Karzinom-Zellen exprimieren ähnlich wie SW-13 Zellen FGF-2 und können durch exogenes FGF-2 zum Wachstum angeregt werden (Nakamoto et al., 1992).

Allerdings exprimieren DU-145 Zellen, im Gegensatz zu SW-13 Zellen, endogenes FGF-BP (Aigner et al., 2002) und sind in der Lage, im Soft-Agar Kolonien auszubilden. Trotz dieser basalen FGF-BP-Produktion und Koloniebildungs-Aktivität konnte durch den Zusatz von exogenem Bv-(FGF-BP) ein deutlicher Zuwachs an großen Kolonien erzielt werden, ähnlich dem Effekt von Bv-(FGF-BP) auf SW-13 Zellen.

Interessanterweise benötige man zur Stimulation der DU-145 Zellen, im Vergleich zu SW-13 Zellen, weniger Bv-(FGF-BP), was auf eine zelltypische Empfindlichkeit für FGF-BP hinweisen könnte.

In beiden Versuchsreihen wurden die Soft-Agar-Assays mit niedrigen Zelldichten durchgeführt, um den Effekt der Stimulation auf einzelne Zellen beurteilen zu können – unabhängig von interzellulären Interaktionen.

Im Vergleich zu FGF-2 waren wesentlich höhere Konzentrationen an Bv-(FGF-BP) nötig, um die Koloniebildung zu stimulieren, und es wurde ein Maximum einer 3-fachen Induktion erzielt. Dieser Sachverhalt kann durch den indirekten Mechanismus, durch den FGF-BP wirkt, erklärt werden. Dieser beinhaltet mindestens vier Schritte: 1) Diffusion von FGF-BP zum immobilisiertem FGF-2 in der EZM, 2) Binden von FGF-BP an FGF-2, 3) Loslösung des FGF-BP/FGF-2 Komplexes aus der EZM und 4) Diffusion dieses Komplexes zu dem FGF-2-Rezeptor.

Bei diesem Vorgang darf man nicht vergessen, dass FGF-2 in den meisten Geweben vorkommt und dass die Aktivierung dieses potenten Wachstumsfaktors streng reguliert erfolgen muss, um potentiell gefährlichen Effekten vorzubeugen. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die FGF-BP-vermittelte Aktivierung von FGF-2 Teil eines wichtigen physiologischen Mechanismus ist, da FGF-2 nur dann aktiviert wird, wenn das sekretierte FGF-BP eine hohe lokale Konzentration erreicht. Trotzdem ist zu bedenken, dass das von uns benutzte Bv-(FGF-BP) unter stark denaturierenden Bedingungen gereinigt worden ist und deshalb vielleicht keine volle biologische Wirkung entfaltet.

#### **4.5. Proliferation von Endothelzellen durch Bv-(FGF-BP)**

Um die schon in früheren Arbeiten gezeigte angiogenetische Wirkung von FGF-BP (Czubayko et al., 1997; Liaudet-Coopman et al., 1997) beim

rekombinanten Bv-(FGF-BP) zu untersuchen, wurde dessen Wirkung auf das Wachstumsverhalten von HUVECs (humane venöse Nabelschnur-Endothelzellen) untersucht.

Es konnte mittels Proliferations-Assays gezeigt werden, dass rekombinantes Bv-(FGF-BP) das Wachstum dieser Zellen dosisabhängig stimuliert. Ein ähnlicher Effekt konnte durch die Zugabe von FGF-2 erreicht werden.

Ein weiteres Ergebnis aus derselben Studie, welches in Kollaboration mit Frau Dr. Lamszus vom Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg entstand und damit kein Teil dieser Doktorarbeit ist, zeigt, dass Bv-(FGF-BP) auch einen chemotaktischen Effekt auf HUVECs hat (Aigner et al., 2001). Hierbei konnte mittels eines modifizierten Boyden-Chamber-Assays und nachfolgender „Checkerboard“-Analyse eine zielgerichtete Bewegung der Endothelzellen nachgewiesen werden. Diese Bv-(FGF-BP)-Wirkung war sowohl dosis- als auch FGF-2-abhängig. Des Weiteren gilt chemotaktische Aktivität *in vitro* als ein gutes Korrelat für angiogenetische Aktivität *in vivo* (Folkman et al., 1987; Zetter, 1987).

Diese Ergebnisse sind außerdem konkordant mit einer anderen Studie, in der die Wirkung von Bv-(FGF-BP) und FGF-2 auf die Blutgefäßneubildung in CAM (chorioallantoic membrane)-Assays bei Hühner-Embryonen untersucht wurde (Tassi et al., 2001). Auch hier zeigte sich eine durch Zugabe von Bv-(FGF-BP) und FGF-2 induzierte verstärkte Angiogenese. Ein ähnlicher, aber wesentlich schwächerer Effekt konnte auch mit FGF-2 allein ausgelöst werden.

Diese positiv-angiogenetischen Eigenschaften von Bv-(FGF-BP) zeigen neben der zuvor diskutierten parakrinen Aktivität auf Tumorzellen einen zweiten Mechanismus zur Unterstützung einer malignen Erkrankung auf: Die Förderung der Einsprossung von Blutgefäßen zur Versorgung eines wachsenden Tumors und dadurch gleichzeitig die Erhöhung des Risikos einer hämatogenen Metastasierung.

#### **4.6. Nachweis von FGF-BP auf Prostata-Ca-Schnitten**

In Sondierungsexperimenten war vor dieser Arbeit gezeigt worden, dass FGF-BP von zumindest einigen Prostata-Tumorzelllinien exprimiert wird (DU-145, Aigner et al., 2001, s.o.). Dieses Ergebnis legte es nahe auch histologische Schnitte von Prostatakarzinomen auf FGF-BP zu untersuchen.

Mittels Immunhistochemie konnte FGF-BP in dieser Arbeit erstmals spezifisch im Prostata-Karzinom nachgewiesen werden. Die Prostata-Ca-Schnitte zeigen deutlich, dass die Acini der Drüsen und die Epithelien der Ausführungsgänge eine starke Färbung aufweisen (siehe Punkt 3.8., Abbildung 3.10.-3.16.), was die Anwesenheit von FGF-BP belegt. Die Negativkontrollen beweisen die Spezifität dieser Färbungen.

Prostatakarzinome gehören zu den am häufigsten auftretenden Tumoren von älteren männlichen Patienten. Die Krankheit ist im fortgeschrittenen Stadium praktisch unheilbar. Der Nachweis von FGF-BP als ein möglicherweise als Zielmolekül für zukünftige Therapeutika verwendbaren Proteins in Prostatakarzinomen ist daher von großem Interesse.

#### **4.7. Korrelation der Färbeintensitäten der Prostata-Ca-Schnitte mit Patientendaten**

Bei der Auswertung wurde mittels verschiedener Systeme versucht, die Färbungsintensität der Schnitte als Maß für die Expression von FGF-BP zu benutzen (siehe Punkt 2.4.3.2.). Die unterschiedlichen Ansätze wurden gewählt, da es nicht gewährleistet war, dass die der Färbeintensität zugeordneten Werte in Relation zueinander stimmig waren.

Da die Beurteilung der Stärke der Färbungen rein subjektiv geschah, wurden die Schnitte von zwei Personen unabhängig von einander beurteilt. Dadurch sollten mögliche individuellen Eigenarten eines Auswerters ausgeglichen werden.

Allerdings zeigte sich keine Korrelation zwischen den klinischen Daten der Patienten und den Ergebnissen dieser Einteilungen.

Da die Prostatakarzinome von insgesamt 88 Patienten untersucht wurden, scheint die Fallzahl ausreichend groß gewesen zu sein, um einen Effekt sehen zu können.

Zudem wurden insgesamt 129 Schnitte angefärbt und ausgewertet. Das bedeutet von manchen Patienten sogar zwei oder drei Schnitte. Dieses Vorgehen macht ein Ausbleiben der Korrelation aufgrund von Färbefehlern unwahrscheinlicher.

Wohlmöglich ist es notwendig, die Einteilung der Färbungen der Schnitte unter histologischen Aspekten vorzunehmen und/oder die Ergebnisse mit anderen Parametern bei den Patienten zu korrelieren wie z.B. dem FGF-2 Serumspiegel.

Diese Arbeit kommt allerdings zu dem Schluss, dass keine Korrelation zwischen immunhistochemisch nachweisbarer FGF-BP-Expression in Prostatakarzinomen und den vorliegenden, klinisch messbaren Parametern existiert.

Allerdings zeigt eine weiterführende Arbeit schon, dass FGF-BP im Wachstum von Prostatakarzinomen eine wichtige, wenn nicht gar zentrale Rolle einnimmt. Durch das Hemmen der Expression von FGF-BP in PC-3 und DU-145 Prostata-Ca-Zellen durch spezifische Ribozyme konnte deren Wachstum in vitro deutlich gehemmt werden. In athymische Nacktmäuse transplantiert zeigte sich, dass die PC-3 Zellen mit herabregulierter Expression von FGF-BP ihre Fähigkeit verloren hatten, in vivo Tumoren auszubilden (Aigner et al., 2002).

Diese hier gezeigte Schalterfunktion von FGF-BP für das Wachstum von Prostatakarzinom-Zellen unterstreicht das Potential, das FGF-BP bei neuen therapeutischen Ansätzen zukommt.

Um diesen Ansatz weiter zu verfolgen, sind allerdings noch weitere Experimente vonnöten.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die nahezu ubiquitär vorkommenden Wachstumsfaktoren FGF-1 und FGF-2 spielen neben ihren physiologischen Funktionen auch eine wichtige Rolle beim Wachstum vieler neoplastischer Erkrankungen. Allerdings werden FGF-1 und FGF-2 nach ihrer Sekretion aus der Zelle in der extrazellulären Matrix immobilisiert und dadurch daran gehindert, ihre Wirkung durch das Binden an spezifische extrazelluläre Rezeptoren zu entfalten.

Ein sekretiertes Protein, FGF-Bindeprotein (FGF-BP), bindet reversibel und nicht-kovalent an FGF-1 und FGF-2, löst sie aus der extrazellulären Matrix und ermöglicht ihnen so, mit ihren Rezeptoren zu interagieren.

Gerade bei neoplastischen Erkrankungen kommt dieser FGF-BP-vermittelten Aktivität von FGF-1 und FGF-2 eine Schalterfunktion bei der Wachstumsförderung von Tumoren, auch bedingt durch die Induktion der Angiogenese, zu. Diese zentrale regulierende Rolle von FGF-BP in malignen Erkrankungen macht es zu einem eventuell vielversprechenden therapeutischen bzw. diagnostischen Ansatzpunkt in der Krebsbehandlung.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die biologische Aktivität von exogen zugesetztem rekombinantem FGF-BP auf Tumor- bzw. Endothel-Zelllinien näher definiert werden.

Hierzu wurde rekombinantes, gereinigtes FGF-BP mittels eines Baculovirus-Expressions-System in Insektenzellen gewonnen (Bv-(FGF-BP)), die Suspensionskultur für dieses System etabliert und gezeigt, dass diese der Adhäsionskultur in Bezug auf Effizienz und Aufwand überlegen ist.

Die parakrine, FGF-2-abhängige Bioaktivität des rekombinanten Bv-(FGF-BP) wurde mittels eines Softagar-Assays mit SW-13-Nebennieren-Karzinom- und DU-145-Prostata-Karzinom-Zellen nachgewiesen. Durch den Zusatz von Bv-(FGF-BP) konnte eine deutliche Steigerung der Wachstumsaktivität dieser Tumorzellen erreicht werden, welche sich durch den Zusatz von FGF-2-Antikörpern komplett blockieren ließ.

Auch das Wachstum von HUVECs, humanen venösen Nabelschnur-Endothelzellen, konnte in Proliferations-Assays durch Bv-(FGF-BP) beschleunigt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass FGF-BP das Wachstum von Tumoren auf zwei verschiedene Arten anregt: direkt durch Stimulation der Tumorzellen und indirekt durch die Förderung der Blutversorgung des Tumors.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die abnorme Molmasse des vollständigen, rekombinanten Bv-(FGF-BP) und das Auftreten höhermolekularer kovalenter FGF-BP-Komplexe, die auch schon in anderen Arbeiten beschrieben worden waren, untersucht werden.

Nachdem eine mögliche Glykosylierung als Ursache für die zu hohe Molmasse ausgeschlossen werden konnte, wurden FGF-BP und FGF-2 in Insektenzellen koexprimiert, um Hinweise auf eine eventuelle intrazelluläre Komplexbildung zu erhalten. Trotz erfolgreicher Koexpression wurde unter den gewählten Bedingungen keine Komplexbildung beobachtet.

Im dritten Teil gelang es erstmals, endogen exprimiertes FGF-BP mittels Immunhistochemie auf Prostata-Karzinom-Schnitten nachzuweisen und zu quantifizieren. Hierbei wurde bei allen 129 Schnitten von 88 Patienten eine immunhistochemische Reaktion beobachtet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben weiteren Aufschluss über die biologische Wirkung von FGF-BP, zeigen seine FGF-2-vermittelte, duale wachstumssteigernde Wirkung auf Tumoren und beweisen dessen Expression im Prostatakarzinom. Diese Erkenntnisse unterstreichen die mögliche Bedeutung dieses Proteins als therapeutisches Zielmolekül.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

**Ago, H., Kitagawa, Y., Fujishima A., Matsuura Y. und Katsube Y. (1991):** Crystal structure of basic fibroblast growth factor at 1.6 Å resolution. *Journal of Biochemistry* **110**, 360-363

**Aigner, A., Malerczyk, C., Houghtling, R. und Wellstein, A. (2000):** Tissue distribution and retinoid-mediated downregulation of an FGF-binding protein (FGF-BP) in the rat. *Growth Factors* **18**, 51-62

**Aigner, A., Butscheid, M., Kunkel, P., Krause, E., Lamszus, K., Wellstein, A. und Czubayko, F. (2001):** An FGF-binding protein (FGF-BP) exerts its biological function by parallel paracrine stimulation of tumor cell and endothelial cell proliferation through FGF-2 release. *Int. J. Cancer* **92**, 510-517

**Aigner, A., Renneberg, H., Bojunga, J., Apel, J., Nelson, P.S. und Czubayko F. (2002):** Ribozyme-targeting of a secreted FGF-binding protein (FGF-BP) inhibits proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene* **22**; 21(37):5733-42

**Aigner, A., Ray, P.E., Czubayko, F. und Wellstein, A. (2002):** Immunolocalization of an FGF-binding protein reveals a widespread expression pattern during different stages of mouse embryo development. *Histochem. Cell. Biol.* **117**, 1-11

**Armelin, H.A. (1973):** Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *PNAS* **70**, 2702-2706

**Baird, A. und Böhlen, P. (1990)** in *Handbook of Experimental Pharmacology* (Sporn, M.B. und Roberts, A.B., eds) Vol. 95/I, 369-418, Springer-Verlag New York Inc., New York

**Bashkin, P., Doctrow, S., Klagsbrun, M., Svahn, C.M., Folkman J. und Vlodavsky, I. (1989):** Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry* **28**, 1737-1743



**Basilico**, C. und Moscatelli, D. (1992): The family of growth factors and oncogenes. *Advances in Cancer Research* **59**, 115-165

**Besser**, D., Presta, M. und Nagamine, Y. (1995): Elucidation of a signaling pathway induced by FGF-2 leading to uPa gene expression in NIH 3T3 fibroblasts. *Cell Growth and differentiation* **6**, 1009-1017

**Brooks**, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P. und Cheresch, D.A. (1996): Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3. *Cell* **85**, 683-693

**Burgess**, W.H. und Maciag, T. (1989): The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 557

**Cabal-Manzano**, R., Aigner, A. und Wellstein, A. (1999): Increased expression of an FGF-binding protein (FGF-BP) during malignant progression of colorectal carcinoma. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* **40**, 557

**Carreira**, C.M., LaVallee, T.M., Tarantini, F., Jackson, A., Lathrop, J.T., Hampton, B., Burgess, W.H. und Maciag, T. (1998): S100A13 is involved in the regulation of fibroblast growth factor-1 and p40 synaptotagmin-1 release in vitro. *J. Biol. Chem.* **273**, 22224-22231

**Chambon**, P. (1995): The molecular and genetic dissection of the retinoid signaling pathway. *Recent Prog. Horm. Res.* **50**, 317-332

**Chandler**, L.A., Sosnowski, B.A., Greenlees, L., Aukerman, S.L., Baird, A. und Pierce, G.F. (1999): Prevalent expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors and FGF2 in human tumor cell lines. *Int. J. Cancer* **81**, 451-458

**Chow, N.H., Cheng, K.S., Lin, P.W., Chan, S.H., Su, W.C., Sun, Y.N. und Lin, X.Z. (1998):** Expression of fibroblast growth factor-1 and fibroblast growth factor-2 in normal liver and hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis. Sci.* **43**, 2261-2266

**Compagni, A., Wilgenbus, P., Impagnatiello, M.A., Cotton, M. und Christofori, G. (2000):** Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer. Res.* **60**, 7163-7169

**Czubayko, F., Smith, R. V., Chung, H. C. und Wellstein, A. (1994):** Tumor growth and angiogenesis induced by a secreted binding protein for fibroblast growth factors. *J. Biol. Chem.* **269**, 28243-28248

**Czubayko, F., Liaudet-Coopman, E.D., Aigner, A., Tuveson, A.T., Berchem, G.J. und Wellstein, A. (1997):** A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch in human cancer. *Nat. Med.* **3**, 1137-1140

**Dorkin, T.J., Robinson, M.C., Marsh, C., Bjartell, A., Neal, D.E. und Leung, H.Y. (1999):** FGF8 over-expression in prostate cancer is associated with decreased patient survival and persists in androgen independent disease. *Oncogene* **18**, 2755-2761

**Florkiewicz, R.Z., Majack, R.A., Buechler, R.D. und Florkiewicz, E. (1995):** Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J. Cell. Physiol.* **162**, 388-399

**Folkman, J. und Klagsbrun, M. (1987):** Angiogenic factors. *Science* **235**, 442-447

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

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

**Folkman, J. und Shing, Y. (1992):** Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 10931-10934

**Galdemard, C., Yamagata, H., Brison, O. und Laviolle, C. (2000):** Regulation of FGF-3 gene expression in tumorigenic and non-tumorigenic clones of a human colon carcinoma cell line. *J. Biol. Chem.* **275**, 17364-17373

**Giri, D., Ropiquet, F. und Ittmann, M. (1999):** Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1063-1071

**Gospodarowicz, D. (1974):** Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* **249**, 123-127

**Griffioen, A.W. und Molema, G. (2000):** Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol. Rev.* **52**, 237-268

**Gualandris, A. und Presta, M. (1995):** Transcriptional and posttranscriptional regulation of urokinase-type plasminogen activator expression in endothelial cells by basic fibroblast growth factor. *Journal of Cell Physiology* **162**, 400-409

**Huang, Y.Q., Li, J.J., Moscatelli, D., Basilico, C., Nicolaides, A., Zang, W.G., Poiesz, B.J.**

**und Fridman-Kien, A.E. (1993):** Expression of int-2 oncogene in Kaposi's sarcoma lesions. *J. Clin. Invest.* **91**, 1191-1197

**Jain, R.K. (1988):** Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res.* **48**, 2641-2658

**Janot, B., el-Naggar, K., Morrison, R.S., Liu, T.J., Tayler, D.L. und Clayman, G.L. (1995):** Expression of basic fibroblast growth factor in squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with degree of histologic differentiation. *Int. J. Cancer* **64**, 117-123

**Johnson**, C.L. und Williams, L.T. (1993): Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Advances in Cancer Research* **60**, 1-41

**Jouanneau**, J., Moens, G., Montesano, R. und Thiery, J.P. (1995): FGF-1 but not FGF-4 secreted by carcinoma cells promotes in vitro and in vivo angiogenesis and rapid tumor proliferation. *Growth Factors* **12**, 37-47

**Kiefer**, M.C., Ishihara, M., Swiedler, S.J., Crawford, K., Stephans, J.C. und Barr, P.J. (1990): The molecular biology of heparan sulfate fibroblast growth factor receptors. *Proc. Natl. Aca. Sci.* **87**, 6985-6989

**Khuri**, F.R., Lippman, S.M., Spitz, M.R., Lotan, R. und Hong, W.K. (1997): Molecular epidemiology and retinoid chemoprevention of head and neck cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 199-211

**Kornmann**, M., Ishiwata, T., Beger, H.G. und Korc, M. (1997): Fibroblast growth factor-5 stimulates mitogenic signaling and is overexpressed in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine actions. *Oncogene* **15**, 1417-1424

**Kurtz**, A., Darwiche, N., Harris, V., Wang, H.L. und Wellstein, A. (1997): Expression of a binding protein for FGF is associated with epithelial development and skin carcinogenesis. *Oncogene* **14**, 2671-2681

**Lamerz**, R. (1999): Role of tumour markers, cytogenetics. *Ann. Oncol.* **10**, 145-149

**Lametsch**, R., Rasmussen, J.T., Johnsen, L.B., Purup, S., Sejrsen, K., Petersen, T.E. und Heegaard, C.W. (2000): Structural characterization of the fibroblast growth factor-binding protein purified from bovine prepartum mammary gland secretion. *J. Biol. Chem.* **275**, 19469-19474

**LaVallee**, T.M., Tarantini, F., Gamble, S., Carreira, C.M., Jackson, A. und

**Maciag, T.** (1998): Synaptotagmin-1 is required for fibroblast growth factor-1 release. *J. Biol. Chem.* **273**, 22217-22223

**Li, V.W., Folkerth, R.D., Watanabe, H., Yu, C., Rupnick, M., Barnes, P., Scott, R.M., Black, P.M., Sallan, S.E. und Folkman, J.** (1994): Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumors. *Lancet* **344**, 82-86

**Liaudet-Coopman, E.D. und Wellstein, A.** (1996): Regulation of gene expression of a binding protein for fibroblast growth factor by retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **271**, 21303-21308

**Liaudet-Coopman, E.D., Schulte, A.M., Cardillo, M. und Wellstein, A.** (1996): A tetracycline-responsive promoter system reveals the role of a secreted binding protein for FGFs during the early phase of tumor growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 930-937

**Liaudet-Coopman, E.D., Berchem, G.J. und Wellstein, A.** (1997): In vivo inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis by retinoic acid in squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **3**, 179-184

**Liu, X.-H., Aigner, A., Wellstein, A. und Ray, P.E.** (2001): Up-regulation of a fibroblast growth factor binding protein in children with renal diseases. *Kidney International* **59**, 1717-1728

**Lobb, R. und Fett, J.** (1984): Purification of two distinct growth factors from bovine neural tissue by heparin affinity chromatography. *Biochemistry* **23**, 6295-6299

**Maciag, T., Tevie, M. und Friesel, R.** (1984): Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal endothelial cell mitogen in bovine brain. *Science* **225**, 932-935

**Mason, I.J.** (1994): The ins and outs of fibroblast growth factors. *Cell* **78**, 547-552

**McNeil**, P.L., Muthukrishnan, L., Warder, E. und D`Amore, P.A. (1989): Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *Journal of Cell Biology* **109**, 811-822

**Miller**, W.H. Jr. (1998): The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer* 1998 **83**, 1471-1482

**Moscatelli**, D. (1992): Basic fibroblast growth factor (bFGF) dissociates rapidly from heparan sulfates but slowly from receptors. Implications for mechanisms of bFGF release from pericellular matrix. *J. Biol. Chem* **267**, 25803-25809

**Myoken**, Y., Myoken, Y., Okamoto, T., Kan, M., McKeehan, W.L., Sato, J.D. und Takada, K. (1996): Expression of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2 and FGF receptor-1 in a human salivary-gland adenocarcinoma cell line: evidence of growth. *Int. J. Cancer* **65**, 650-657

**Nakamoto**, T., Chang, C.S., Li, A.K. und Chodak, G.W. (1992): Basic fibroblast growth factor in human prostate cancer cells. *Cancer Res* **52**, 571-7

**Nguyen**, M., Watanabe, H., Budson, A.E., Richie, J.P., Hayes, D.F., und Folkman, J. (1994): Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 356-360

**Parrott**, J.A., Kim, G., Mosher, R. und Skinner, M.K. (2000): Expression and action of keratinocyte growth factor (KGF) in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **167**, 77-87

**Patterson**, S.L., Grady, M.S. und Bothwell, M. (1993): Nerve growth factor and a fibroblast growth factor-like neurotrophic activity in cerebrospinal fluid of brain injured human patients. *Brain Res.* **605**, 43-49

**Powers**, C.J., McLeskey, S.W., Wellstein, A. (2000): Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer* **7**, 165-197

**Rak, J.** und Kerbel, R.S. (1997): bFGF and tumor angiogenesis--back in the limelight? *Nat. Med.* **3**, 1083-1084

**Rifkin, D.B.**, Moscatelli, D. (1989): Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.* **109**, 1-6

**Risau, W.** (1986): Developing brain produces an angiogenesis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3855-3859

**Risau, W.**, Gautschi-Sova, P. und Böhlen, P. (1988): Endothelial cell growth factors in embryonic and adult chick brain are related to human acidic fibroblast growth factor. *EMBO J.* **7**, 959-962

**Rogelj, S.**, Klagsbrun, M., Atzmon, R., Kurokawa, M., Haimovitz, A., Fuks, Z. und Vlodavsky, I. (1989): Basic fibroblast growth factor is an extracellular matrix component required for supporting the proliferation of vascular endothelial cells and the differentiation of PC12 cells. *J. Cell Biol.* **109**, 823-831

**Ropiquet, F.**, Giri, D., Kwabi-Addo, B., Mansukhani, A., Ittmann, M. (2000): Increased expression of fibroblast growth factor 6 in human prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Cancer Res.* **60**, 4245-4250

**Ruohola, J.K.**, Viitanen, T.P., Valve, E.M., Seppanen, J.A., Lopenen, N.T., Keskitalo, J.J., Lakkakorpi, P.T. und Harkonen, P.L. (2001): Enhanced invasion and tumor growth of fibroblast growth factor 8b-overexpressing mcf-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* **61**, 4229-4237

**Saksela, O.**, Moscatelli, D., Sommer, A. und Rifkin, D.B. (1988): Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J. Cell Biol.* **107**, 743-751

**Sano, H.**, Forough, R., Maier, J.A.M., Case, J.P., Jackson, A., Engleka, K., Maciag, T. und Wilder, R.L. (1990): Detection of high levels of heparin binding

growth factor-1 (acidic fibroblast growth factor) in inflammatory arthritic joints. *Journal of Cell Biology* **110**, 1417-1426

**Sauter**, E.R., Nesbit, M., Tichansky, D., Liu, Z.J., Shirakawa, T., Palazzo, J. und Herlyn, M. (2001): Fibroblast growth factor-binding protein expression changes with disease progression in clinical and experimental human squamous epithelium. *Int. J. Cancer* **92**, 374-381

**Schultz-Hector**, S. und Haghayegh, S. (1993): Beta-fibroblast growth factor expression in human and murine squamous cell carcinomas and its relationship to regional endothelial cell proliferation. *Cancer Res.* **53**, 1444-1449

**Sepp**, N.T., Li, L.-J., Lee, K.H., Brown, E.J., Caughman, S.W., Lawley, T.J. und Swerlick, R.A. (1994): Basic fibroblast growth factor-2 increases expression of the  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin complex on human microvascular endothelial cells. *Journal of Investigative Dermatology* **103**, 295-299

**Shemirani**, B. und Crowe, D.L. (2000): Head and neck squamous cell carcinoma lines produce biologically active angiogenic factors. *Oral Oncol.* **36**, 61-66

**Shimon**, I., Hinton, D.R., Weiss, M.H. und Melmed, S. (1998): Prolactinomas express human heparin-binding secretory transforming gene (hst) protein product: marker of tumour invasiveness. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **48**, 23-29

**Siegel**, B. (2000): Qualitative und quantitative Analyse eine „Fibroblast growth factor“- bindenden Proteins (FGF-BP) in Hirntumoren und Prostatakarzinomen. Dissertation. Philipps-Universität Marburg

**Soff**, G.A. (2000): Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer Metastasis* **19**, 97-107

**Soslow**, R.A., Nabeya, Y., Ying, L., Blundell, M. und Altorki, N.K. (1999): Acidic fibroblast growth factor is progressively increased in the development of oesophageal glandular dysplasia and adenocarcinoma. *Histopathology* **35**, 31-37



**Tarantini**, F., LaVallee, T., Jackson, A., Gamble, S., Carreira, C.M., Garfinkel, S., Burgess, W.H. und Maciag, T. (1998): The extravesicular domain of synaptotagmin-1 is released with the latent fibroblast growth factor-1 homodimer in response to heat shock. *J. Biol. Chem.* **273**, 22209-22216

**Tassi**, E., Al-Attar, A., Aigner, A., Swift, M.R., McDonnell, K., Karavanov, A., und Wellstein, A. (2001): Enhancement of fibroblast growth factor (FGF) activity by an FGF-binding protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 40247-40253

**Takahashi**, J.A., Mori, H., Fukumoto, M., Igarashi, K., Jaye, M., Oda, Y., Kikuchi, H. und Hatanaka, M. (1990): Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 5710-5714

**Takahashi**, J.A., Fukumoto, M., Igarashi, K., Oda, Y., Kikuchi, H. und Hatanaka, M. (1992): Correlation of basic fibroblast growth factor expression levels with the degree of malignancy and vascularity in human gliomas. *J. Neurosurg.* **76**, 792-798

**Thomas**, D.A., Kantarjian H.M. (2000): Current role of thalidomide in cancer treatment. *Curr. Opin. Oncol.* **12**, 564-573

**Todo**, T., Kondo, T., Kirino, T., Asai, A., Adams, E.F., Nakamura, S., Ikeda, K. und Kurokawa, T. (1998): Expression and growth stimulatory effect of fibroblast growth factor 9 in human brain tumors. *Neurosurgery* **43**, 337-346

**Tsuboi**, R. und Rifkin, D.B. (1990): Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing-impaired db/db mice. *Journal of Experimental Medicine* **172**, 245-251

**Ueno**, K., Inoue, Y., Kawaguchi, T., Hosoe, S. und Kawahara, M. (2001): Increased serum levels of basic fibroblast growth factor in lung cancer patients: relevance to response of therapy and prognosis. *Lung Cancer* **31**, 213-219

**Ugrinska, A.,** Bombardieri, E., Stokkel, M.P., Crippa, F. und Pauwels, E.K. (2002): Circulating tumor markers and nuclear medicine imaging modalities: breast, prostate and ovarian cancer. *Q. J. Nucl. Med.* **46**, 88-104

**Vellucci, V.F.,** Germino, F.J. und Reiss, M. (1995): Cloning of putative growth regulatory genes from primary human keratinocytes by subtractive hybridization. *Gene* **166**, 213-320

**Verner, K. und** Schatz, G. (1988): Protein translocation across membranes. *Science* **241**, 1307-1313

**Vlodavsky, I.,** Eldor, A., Bar-Ner, M., Fridman, R., Cohen, I.R. und Klagsbrun, M. (1988): Heparan sulfate degradation in tumor cell invasion and angiogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **233**, 201-210

**Vlodavsky, I.,** Bashkin, P., Ishai-Michaeli, R. und Chajek-Shaul, T. (1991): Sequestration and release of basic fibroblast growth factor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **638**, 207-220

**Wang, X.C.,** Chen, J.H., Crab, J.W. und Sato, J.D. (1998): Purification of heparin-binding protein HBp17 and identification of HBp17 heparin binding site. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **46**, 81-87

**Watanabe, E.,** Smith, D.M., Sun, J., Smart, F.W., Delcarpio, J.B., Roberts, T.B., Van Meter, C.H. und Claycomb, W.C. (1998): Effect of basic fibroblast growth factor on angiogenesis in the infarcted porcine heart. *Basic research in Cardiology* **93**, 30-37

**Weidner, N.,** Semple, J.P., Welch, W. R., und Folkmann, J. (1991): Tumor angiogenesis and metastasis – Correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **324**, 1-8

**Wellstein, A.,** Lupu, R., Zugmaier, G., Flamm, S.L., Cheville, A.L., Delli Bovi, P., Basilico, C., Lippman, M.E., Kern, F.G. (1990): Autocrine growth stimulation

by secreted Kaposi fibroblast growth factor but not by endogenous basic fibroblast growth factor. *Cell Growth Differ* **1**, 63-71

**Wellstein, A.** (1994): Why monitor angiogenic factors in patients' urine? *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 328-329

**Werb, Z.** (1997): ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* **91**, 439-442

**Wu, D., Kan, M., Sato, G.H., Okamoto, T. und Sato, J.D.** (1991): Characterization and molecular cloning of a putative binding protein for heparin-binding growth factors. *J. Biol. Chem.* **266**, 16778-16785

**Yanagisawa-Miwa, A., Uchida, Y., Nakamura, F., Tomaru, T., Kido, H., Kamijo, T., Sugimoto T., Kaji, K., Utsuyama, M., Kurashima, C. und Ito, H.** (1992): Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* **257**, 1401-1403

**Zammit, C., Barnard, R., Gomm, J., Coope, R., Shousha, S., Coombes, C. und Johnston, C.** (2001): Altered intracellular localization of fibroblast growth factor receptor 3 in human breast cancer. *J. Pathol.* **194**, 27-34

**Zetter, B.R.** (1987): Assay of capillary endothelial cell migration. *Methods Enzymol* **147**:135-44

**Zhao, X.-M., Yeoh, T.-K., Hiebert, M., Frist, W.H. und Miller, G.G.** (1993): The expression of acidic fibroblast growth factor (heparin-binding growth factor-1) and cytokine genes in human cardiac allografts and T cells. *Transplantation* **56**, 1177-1182

**Zhao, X.-M., Citrin, B.S., Miller, G.G., Frist, W.H., Merrill, W.H., Fischell, T.A., Atkinson, J.B. und Yeoh, T.-K.** (1995): Association of acidic fibroblast growth factor and untreated low grade rejection with cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation* **59**, 1005-1010

**Zhang, J.**, Cousens, L.S., Barr, P.J. und Sprang, S.R. (1991): Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin 1 $\beta$ . *PNAS* **88**, 3446-3450

**Zhang, L.**, Kharbanda, S., Hanfelt, J. und Kern, F.G. (1998): Both autocrine and paracrine effects of transfected acidic fibroblast growth factor are involved in the estrogen-independent and antiestrogen-resistant growth of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* **58**, 352-361

**7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A <sub>280</sub>	Absorption bei 280 nm
ABC-Kit	Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex-Kit
AFP	α-Feto-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	bovine serum albumine (Rinderalbumin-Serum)
BP	binding protein (Bindeprotein)
bp	base pairs (Basenpaare)
Bv	Baculovirus
c	Konzentration
Ca	Karzinom
cDNA	copy DNA
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
E	Extinktion
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FGF	fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
g	Gramm
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

HCl	Salzsäure
HUVEC	human umbilical venal endothelial cell (humane venöse Nabelschnur-Endothelzelle)
IMD-Medium	Iscoves modifiziertes Dulbeccos Medium
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immun-histo-chemie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalakto-pyranosid
ISH	in situ-Hybridisierung
kDa	Kilodalton
M	molar
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA (Boten RNA)
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
NaCl	Kochsalz
NaOH	
NBT	4-Nitro-blue-tetrazolium-chlorid
NEB	New England Biolabs
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid (Nickel-Nitriloessigsäure)
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PSA	Prostataspezifisches Antigen

R	Reinheitsfaktor
RNA	Ribonucleinacid (Ribonukleinsäure)
rpm	revolutions per minute (Umdrehung pro Minute)
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
SSC	Sodium Chloride/Sodium Citrate
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TAE	Tris Acetat EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin

## 8. PUBLIKATIONSLISTE

Aigner, A., **Butscheid, M.**, Kunkel, P., Krause, E., Lamszus, K., Wellstein, A. und Czubayko, F. (2001): An FGF-binding protein (FGF-BP) exerts its biological function by parallel paracrine stimulation of tumor cell and endothelial cell proliferation through FGF-2 release. *Int. J. Cancer* **92**, 510-517

Aigner, A., Hsieh, S.S., Malerczyk, C., Wüstenhagen, A., **Butscheid, M.**, Apel, J. und Czubayko, F. (2000): Effects of HER-2 expression levels on drug resistance of breast and ovarian cancer cells. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **41**

**Butscheid, M.**, Aigner, A., Apel, J., Malerczyk, C., und Czubayko, F. (2000): Ribozym-vermittelte Verringerung der HER-2-Expression in Ovarial- und Brustkrebs-Zellen beeinflusst die Cytostatika-Resistenz. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol. Suppl.* Vol. **361**, #53



## 9. AKADEMISCHE LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Arnold, Aumüller, Austermann, Barth, Basler, Bauhofer, Baum, Bien, Boudriot, Celik, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Eissele, Elsässer Engel, Feuser, Fruhstorfer, Gemsa, Geus, Gotzen, Griss, Grzeschik, Happle, Hasilik, Hellinger, Herzum, Hesse, Himmelmann, Hoffmann, Hofmann, Hörsch, Joseph, Junge, Kaiser, Katschinski, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Krieg, Lang, Lennartz, Leppek, Löffler, Lorenz, Maisch, Mc Gregor, Moll, Moosdorf, Mueller, Oertel, Petermann, Pfab, Pfeiffer, Radsak, Ramaswamy, Renneberg, Rechzeh, Reichardt, Renschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schneyer, Schuermann, Schulz, Schurek, Steiniger, Stief, Stiletto, Sturm, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wichert, von, Wille, Wirth, Wulf und Zwiorek.

In Wien:

Bauer, Kunze und Wedrich.

In Mexiko:

Galindo Gonzáles.

## 10. DANKSAGUNG

Ich danke meinem Doktorvater Professor Frank Czubayko für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und für seine Unterstützung bei deren Entstehen, meinem Betreuer Privatdozent Achim Aigner für seine unerschöpfliche Geduld und seinen freundschaftlichen, kompetenten und stets ausführlichen Rat, Privatdozent Hubert Johannes Stöppler und Doktor Claudius Malerczyk für manchen Hinweis und die vielen unterhaltsamen Mittagessen, Andrea Wüstenhagen für eine gründliche und nette Einarbeitung, Helga Radler, Tanja Pfeffer-Eckel und Waltraud Siegel, Professor Horst-Wilhelm Vohland der stets ein freundliches Wort fand, Professor Horst Franz Kern für seinen richtungsweisenden Rat, Doktor Hans-Jörg Martin und Doktor H.Y. Leung für die zur Verfügung gestellten Materialien und den oben genannten Personen zusammen sowie den anderen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg für die kollegiale und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.