

**„Funktionelle Zusammenhänge zwischen Expressionsveränderungen
des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens und dessen potentiellen
Zielgenen in sporadischen Nierenzellkarzinomen“**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Eberhard Weidt
geb. in Wiesbaden

Mainz, 2000

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2000

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das sporadische Nierenzellkarzinom	1
1.1.1 Ätiologie	1
1.1.2 Therapie	2
1.1.3 Prognose	2
1.1.4 Histologie	4
1.2 Das familiäre Nierenzellkarzinom	7
1.3 Das von Hippel-Lindau Syndrom	8
1.4 Tumorsuppressorgene	10
1.4.1 Das- <i>Two-Hit</i> -Modell	10
1.4.2 Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen	11
1.5 Das von Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgen	13
1.5.1 Klonierung des VHL-Gens	13
1.5.2 Molekulargenetik des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens	13
1.6 Angiogenese	16
1.7 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF)	18
1.8 Einfluß des VHL-Proteins auf zelluläre Mechanismen	20
1.8.1 Elongation	20
1.8.2 Translation	22
1.8.3 Intrazellulärer Proteintransport	22
1.8.4 mRNA-Stabilisierung	23
1.8.5 Interaktion von VHL mit Cullin-2	24
1.8.6 Interaktion von VHL mit VEGF	25
1.8.7 Zusammenfassung der möglichen VHL-Interaktionen	26
1.9 Aufklärung möglicher Targetgene von VHL durch Klonierung in GFP-exprimierende Vektoren	28
1.10 Das Xenograftmodell als biologischer <i>read out</i>	29
2. Problemstellung und Zielsetzung	30
3. Material und Methoden	31
3.1 Material	31
3.2 Nierenkarzinomzelllinien	35
3.2.1 Zelllinien	35
3.2.2 Zellkulturmedien	36
3.3 Vektoren	38
3.4 Primer und PCR-Protokolle	39
3.5 Lösungen	45
3.6 Methoden	49
3.6.1 Spektralphotometrische Messungen	49
3.6.2 Isolation von RNA, DNA und Proteinen	49
3.6.3 Zellkultur	50
3.6.4 SSCP-Analyse	52
3.6.5 Mutationsanalyse mit F-BESS	52
3.6.6 DNA-Sequenzierung	53
3.6.7 Vektorkonstrukte mit GFP als Reporter gen	53
3.6.8 Transformation	54
3.6.9 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	54

3.6.10	Transfektion	55
3.6.11	Klonierung stabil transfizierter Zelllinien	56
3.6.12	Xenotransplantationen	56
3.6.13	Reverse Transkription und PCR	57
3.6.14	Western Blot	58
3.6.15	Immunhistochemie	58
4.	<i>Ergebnisse</i>	59
4.1	Bestimmung des VHL-Status der verwendeten NZK-Linien	59
4.1.1	SSCP-Analyse	59
4.1.2	Base Excision Sequence Scanning	60
4.1.3	DNA-Sequenzierung	61
4.2	Kontrolle der Transfektionskonstrukte	62
4.3	Bestimmung der optimalen Antibiotikumkonzentration zur Generierung stabil transfizierter Zelllinien	63
4.4	Bestimmung der Transfektionseffizienz	64
4.5	<i>In vitro</i> Studien	68
4.5.1	Änderung des <i>in vitro</i> Wachstumsverhaltens der NZK Linien	68
4.5.2	Expressionsveränderung	71
4.5.3	Kotransfektionen	74
4.6	<i>In vivo</i> Studien	77
4.6.1	Änderung des <i>in vivo</i> Wachstumsverhaltens der NZK Linien in den Versuchstieren	78
4.6.2	Expressionsveränderungen	81
4.7	Proteindaten	83
4.7.1	Western Blots	83
4.7.2	Immunhistochemie	83
4.8	Histopathologie	85
4.9	Lokalisation des VHL Proteins	88
4.9.1	Nachweis des VHL-GFP Fusionsproteins	88
4.9.2	Immunhistochemischer Nachweis des VHL-Proteins	89
5.	<i>Diskussion</i>	90
5.1	Mechanismen der Genregulation	90
5.2	Transkription und VHL	93
5.3	Anmerkungen zur Methodik	95
5.3.1	RT-PCR	95
5.3.2	VHL-Mutationsanalyse der verwendeten NZK-Linien	95
5.3.3	Vorteile und Risiken des GFPs als Reporter-gen	96
5.4	<i>In vitro</i> Ergebnisse	98
5.5	<i>In vivo</i> Ergebnisse	100
5.6	Histopathologische Untersuchungen	102
5.7	Proteindaten	103
5.8	Potentielle Interaktionen von VHL mit potentiellen Targetgenen	104
5.9	Antiangiogenetische Forschungen als Perspektive für eine Krebstherapie	108
5.10	Ausblick	110
6.	<i>Zusammenfassung</i>	112
7.	<i>Literatur</i>	114

8.	<i>Anhang</i>	133
8.1	Abkürzungsverzeichnis	133
8.2	Abbildungsverzeichnis	137
8.3	Tabellenverzeichnis	138
8.4	VHL-Sequenz und verwendete Primer	139
8.4.1	SSCP-Analyse	139
8.4.2	F-BESS-Analyse	141
8.4.3	DNA-Sequenzierung	143
8.5	Danksagung	145
8.6	Lebenslauf	146
8.7	Publikationen	147

1. Einleitung

1.1 Das sporadische Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist mit einem Anteil von 85 bis 90% die häufigste bösartige Entartung der Niere. Es macht ca. 2 bis 3% aller malignen Tumoren aus (1; 2). Grawitz bezeichnete 1883 (3) das Nierenzellkarzinom als „Hypernephrom“, in der Annahme, daß sich das Nierenzellkarzinom nicht von der Niere selbst, sondern von dysontogenetisch in der Niere versprengten Keimen der Nebennierenrinde ableitet. Aufgrund neuer verbesserter Untersuchungstechniken ist diese Bezeichnung mittlerweile obsolet. Statt dessen spricht man heute vom Nierenadenokarzinom. Neben dem Adenokarzinom findet man in der Niere auch Transitionalzellkarzinome, Nephroblastome, Sarkome und Metastasen anderer Karzinome (4).

In den Industriestaaten wird über eine steigende Inzidenz des Nierenzellkarzinoms berichtet. Die höchste Erkrankungswahrscheinlichkeit liegt in Skandinavien und den Vereinigten Staaten. In Deutschland liegt die Inzidenz bei 10 bis 18 auf 100.000 Personen (5). 1996 starben in den Vereinigten Staaten 12.000 Personen an einem Nierentumor, bei etwa 31.600 Neuerkrankungen pro Jahr (1; 6; 7). Die Inzidenz steigt mit jeder Lebensdekade und erreicht ihr Maximum zwischen 60 und 70 Jahren. Männer sind 2 bis 3 mal häufiger betroffen als Frauen, in seltenen Fällen können auch Kinder betroffen sein (8-10).

1.1.1 Ätiologie

Die Ursachen des Nierenzellkarzinoms sind bisher wenig bekannt. Als multifaktorielle Erkrankung spielen neben genetischen Faktoren auch Rauchen, Übergewicht, hormonelle Einflüsse, Umweltfaktoren, und chronische Niereninsuffizienz (mögliche Inkorporation von Schwermetallen nach Dialyse) eine Rolle (5; 11-13). Das Nierenzellkarzinom hat keine eindeutige Symptomatik. Nur etwa 10% der Patienten klagen über Schmerzen, Hämaturie und Flankenschmerz. Weiterhin treten auch unspezifische Symptome wie Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsabnahme und Anämie auf. Aus diesem Grund wird der Tumor oft erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt. Bei bis zu 30% der Patienten haben sich zu diesem Zeitpunkt bereits Metastasen abgesiedelt (14). Die Überlebenschance hängt von der Ausbreitung des Tumors und eventueller Metastasenbildung ab.

1.1.2 Therapie

Die klassische Therapie des Nierenzellkarzinoms ist die radikale Nephrektomie. Durch verbesserte Diagnosetechniken werden Nierentumoren heute frühzeitiger erkannt und operiert. Die Behandlung von Patienten mit Metastasen gestaltet sich schwieriger, da Nierenzellkarzinome besonders strahlen- und chemotherapieresistent sind. Aus diesem Grund gibt es bis heute keine effektive Standardbehandlung für metastasierende Nierenzellkarzinome. Bei etwa 15% der Patienten führen Hormonbehandlungen zu einer Besserung, die Chemotherapie zeigt nur bei 9% der Betroffenen eine Wirkung (14). Eine weitere Therapieform ist die Behandlung mit Zytokinen. In zahlreichen Studien zeigten Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen eine Ansprechrate von ca. 10 bis 30% auf Interferon- α , Interferon- γ und Interleukin-2 (15-17). Auch unter einer Immuntherapie konnte bei einigen Patienten eine komplette Remission erzielt werden (15; 16; 18).

1.1.3 Prognose

Als wichtigste prognostische Parameter gelten Staging und Grading. Beim Staging erfolgt eine Unterteilung der Tumoren nach Ausbreitungsgrad und Größe. Es existieren mehrere Staging-Systeme, wobei heute das Tumorstadium- und das TNM-System der AJCC/UICC (*American Joint Committee on Cancer* bzw. *Union Internationale Contre le Cancer*) allgemein anerkannt und am gebräuchlichsten sind. Mit dem TNM-System wird das Staging in drei Komponenten unterteilt: T (Tumorgröße), N (Lymphknotenbefall, *node*) und M (Metastasen) (19), d. h. es werden einerseits die Ausdehnung des Primärtumors und andererseits der Lymphknoten-Status und das Vorliegen von Fernmetastasen zur Klassifizierung der insgesamt vier verschiedenen Tumorstadiengruppen berücksichtigt.

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor auf die Niere begrenzt, größte Ausdehnung: 7 cm oder weniger
T2	Tumor auf die Niere begrenzt, größte Ausdehnung: >7 cm
T3	Tumor breitet sich in größeren Venen aus oder infiltriert die Nebenniere oder perirenales Gewebe, jedoch nicht jenseits der Gerota-Faszie
T3a	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe, aber nicht jenseits der Gerota-Faszie
T3b	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene(n) oder Vena cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Vena cava oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus
N	Regionäre Lymphknoten
	<ul style="list-style-type: none"> •Hilär •Abdominal paraaortal •Paracaval •Interaortocaval
	Lateralität beeinflusst die N-Klassifikation nicht.
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Solitär, 2 cm oder weniger / Metastase(n) in solitären regionären Lymphknoten
N2	Solitär oder multipel, Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten
N3	Multipel, mehr als 5 cm
M	Fernmetastasen
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab. 1: Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach dem TNM-System (nach AJCC/UICC, 1997)

Patienten, deren Tumor kleiner als 5 cm ist, haben eine 5 Jahres-Überlebensrate von 62%. Im Vergleich dazu liegt die Überlebenschance bei Patienten, deren Tumor größer als 10 cm ist, nur bei 37% (20). Die Überlebenschance hängt mehr vom Tumor-Staging als allein von der Tumorgöße ab. Die durchschnittliche 5 Jahres-Überlebensrate von Patienten ohne Metastasen mit Stadium I liegt bei 75%, während sie mit Stadium IV auf 11% sinkt. Der Nachweis von Metastasen ist ebenfalls ein wichtiger prognostischer Faktor. Die durchschnittliche 5 Jahres-Überlebensrate von Patienten ohne Metastasierung liegt zwischen 45% und 70%. Bei Metastasierung sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit auf 15 bis 20% (17).

Ein weiterer wichtiger Parameter ist das Grading und im Besonderen das Kerngrading. Das Kerngrading steht in guter Korrelation zum Staging und der Prognose. Es wird von G4 bis G1 eingestuft und beschreibt den Grad der Entartung anhand zytomorphologischer Kriterien. Eine höhere Gradingstufe korreliert mit schlechterer Prognose (19).

1.1.4 Histologie

Das Ziel histologischer Klassifizierung ist die Unterscheidung biologisch verschiedener Tumortypen aufgrund morphologischer Kriterien. Neuere Klassifizierungssysteme orientieren sich sowohl an zytologischen und histologischen Beobachtungen, wie auch an der Differenzierung des Tumors. Nach einer Einteilung durch die WHO werden Tumoren als benigne oder maligne bezeichnet. Benigne Tumoren und Tumoren mit Grading 1, deren Durchmesser weniger als 1cm betragen, werden Adenome genannt. Tumoren mit Grading 1, die größer als 3 cm sind und solche mit höherem Grading, werden als maligne Karzinome bezeichnet. Den Ausnahmefall für diese Nomenklatur bildet das Onkozytom, eine Proliferationsform der Niere, die unabhängig von ihrer Größe als gutartige Raumforderung eingestuft wird (19). Nach der Klassifikation von Thoenes et al., 1986 („Mainzer Klassifikation“) (21) werden Nierenzellkarzinome und das Onkozytom nach drei Hauptmerkmalen unterteilt: Zelltyp, Wachstumsmuster und Grading. Der Zelltyp wird als Primärmerkmal zur Subtypisierung (*Typing*) festgestellt. Das Wachstumsmuster und das Grading sind Sekundärmerkmale. Beim Zelltyp wird nach fünf Subtypen unterschieden: klarzelliges, papilläres oder chromophilzelliges und chromophobzelliges Karzinom, Onkozytom und das Ductus-Bellini-Karzinom. Durch elektronenmikroskopische und histochemische Untersuchungen konnten die Beziehungen der verschiedenen Subtypen zum Nephron-Sammelrohrsystem aufgezeigt

werden. So entstehen das klarzellige und das papilläre Nierenzellkarzinom aus dem proximalen Tubulus des Nephrons, das chromophobzellige Karzinom und Onkozytom aus dem distalen Tubulus oder Schaltzellen des corticalen Sammelrohrs und das Ductus-Bellini-Karzinom aus dem Sammelgang oder Sammelrohr der Niere. Beim Wachstumsmuster werden kompakt acinär, tubulo-papillär und zystisch unterschieden.

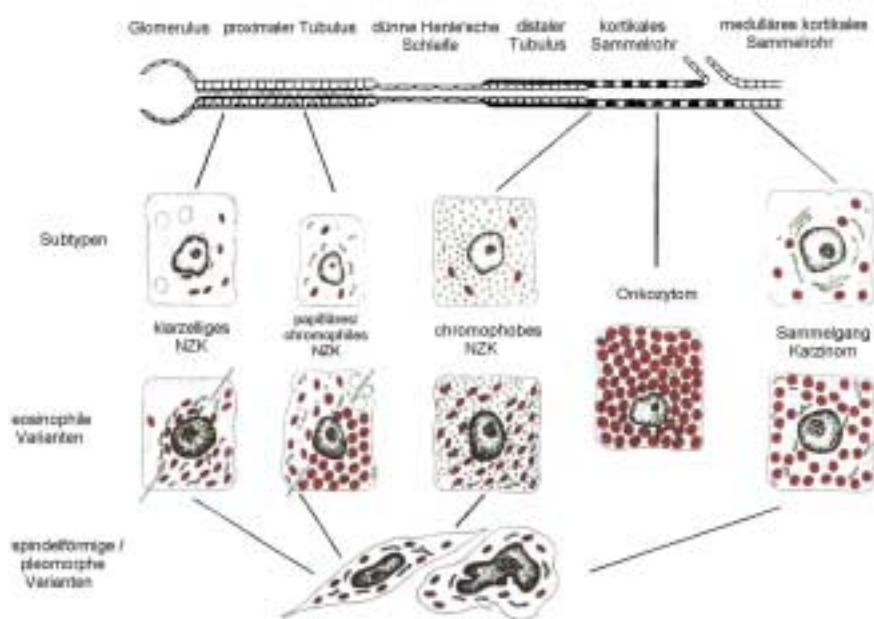


Abb. 1: Die Subtypen epithelialer Nierentumoren, klassifiziert nach ihrer Ursprungszelle im Nephron, (nach Thoenes und Störkel, 1986)

Die neue pathologische Klassifikation entsprechend der internationalen *Workgroup on Renal Tumors* von 1997 (22) unterteilt die Nierentumoren in zwei Gruppen: benigne Neoplasmen und maligne Neoplasmen. Zu den benignen Neoplasmen zählen papilläre Adenome, Onkozytome, metanephridische Adenome und metanephridische Adenofibrome. Die malignen Neoplasmen unterteilen sich in fünf Subtypen:

1. Klarzelliges Nierenzellkarzinom: Häufigkeit ca. 70%

Dieser Subtyp besteht aus transparenten zytoplasmatischen Zellen mit z. T. eosinophilem Zytoplasma. Das klarzellige NZK ist durch eine massive zytoplasmatische Akkumulation von Glykogen und Neutralfett als Ausdruck eines gestörten, tumortypischen Glykogen- und Lipidmetabolismus charakterisiert. Das Wachstumsmuster ist kompakt oder zystisch.

2. Papilläres Karzinom (chromophilzelliges NZK): Häufigkeit ca. 10 bis 15%

Dieser Subtyp wurde in der „Mainzer Klassifikation“ entsprechend seinem Wachstumsmuster „tubulo-papilläres“ Karzinom genannt. Das papilläre Karzinom zeichnet sich durch kleine Zellen mit gefärbtem Zytoplasma und wenigen Mitochondrien aus. Durch Lipideinlagerungen bildet sich ein helles, feinvaskularisiertes Zytoplasma.

3. Chromophobzelliges Nierenzellkarzinom : Häufigkeit ca. 5%

Dieser Subtyp kann durch die positive Reaktion mit Hale'schem Eisenkolloid erkannt werden. Die Zellen zeichnen sich durch einen geringen Glykogen- und Lipidgehalt aus. Das Wachstumsmuster ist kompakt.

4. Ductus-Bellini Typ : Häufigkeit weniger als 1%

Dieser Subtyp ist bezüglich Kernform, Zellgröße und Wachstumsmuster sehr variabel. Häufig kommt es zu einem Übergreifen auf das Nierenbecken.

5. Unklassifizierte Nierenzellkarzinome: Häufigkeit ca. 4 bis 5%

In dieser Gruppe fallen alle renalen Karzinome, die sich nicht in die zuvor genannten Gruppen einordnen lassen.

1.2 Das familiäre Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom tritt sporadisch sowie familiär auf. Die familiären Formen machen etwa 1 bis 2% aller Nierentumoren aus (23-25). Es sind hier mindestens zwei Unterformen zu unterscheiden: erstens die mit dem von Hippel-Lindau Syndrom (VHLS) gekoppelte und zweitens eine ausschließlich auf die Niere beschränkte Form. Sehr häufig findet man bei Chromosomenanalysen aus Tumorgewebe in der zweiten Gruppe Deletionen, bzw. Translokationen des Chromosoms 3 (3p14), sowie weitere unspezifische Aberrationen. Bei nahezu allen Patienten der ersten Gruppe mit VHLS ist ein Funktionsverlust des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens in Tumorzellen nachweisbar.

Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt bei betroffenen Familien mit 43 Jahren etwa 15 Jahre niedriger als beim sporadischen NZK, häufiger treten bilaterale und multifokale Tumoren auf (26).

1.3 Das von Hippel-Lindau Syndrom

Das von Hippel-Lindau Syndrom (VHLS) ist eine seltene, autosomal dominant vererbte Erkrankung, die durch multiple gutartige und bösartige Tumoren in den verschiedensten Organen charakterisiert ist. Die namensgebenden und häufigsten Läsionen sind die Angiomatosis retinae, die als „von Hippelsche Krankheit“ bekannt ist und Hämangioblastome des Zentralnervensystems, die als „Lindautumoren“ bezeichnet werden. Beide Läsionen sind in bis zu zwei Dritteln der Patienten mit einem VHLS nachweisbar.

Vor über 100 Jahren beschrieb Ernst von Hippel erstmalig die Angiomatosis retinae als „eigenständig vererbtes Leiden“ (27). Arvid Lindau beschrieb 1926 den Zusammenhang zwischen den von ihm beobachteten Kleinhirnzysten und der Angiomatosis retinae (28). Weitere mögliche Läsionen sind Tumoren der Medulla oblongata und des Rückenmarks. Häufig werden diese Manifestationen von multiplen, vor allem viszeralen Tumoren wie Nierenzellkarzinomen und Phäochromozytomen, aber auch Nierenzysten und Pankreaszysten begleitet (29; 30). Eine häufige Todesursache dieser Krankheit ist das Nierenzellkarzinom, an dem bis zu 40% der Patienten sterben (17). Es tritt sowohl bilateral, als auch multifokal auf.

Klinisch wird von einem VHL Syndrom immer dann gesprochen, wenn mindestens zwei der typischen Manifestationsformen gemeinsam bei einem Patienten auftreten, aber auch dann, wenn nur ein VHL-„spezifischer“ Tumor bei zwei Blutsverwandten auftritt (31). Die Krankheit bricht zwischen dem 20. und 30., meistens aber bis zum 60. Lebensjahr aus. Die Penetranz ist nahezu vollständig, die Expressivität jedoch in höchstem Maße variabel (32). Während die Inzidenz vor 30 Jahren noch mit 1:230.000 (33) angegeben wurde, wird sie heute aufgrund umfangreicherer epidemiologischer Studien mit 1:36.000 bis 1:39.000 beziffert (30; 34; 35). Der überwiegende Teil der Tumoren weist ein rein zystisches oder zystisch-solides Wachstum auf. Die rein solide Form macht mit etwa 4% nur einen Bruchteil der Tumoren aus (35). Mit computertomographischen Untersuchungen können inzwischen Läsionen von weniger als 10 mm Größe entdeckt werden. Das ermöglicht eine frühe Diagnose und macht eine Behandlung erfolgversprechender.

Der molekulare Pathomechanismus, der dieser Krankheit zugrunde liegt, wurde in den vergangenen Jahren mit verschiedenen Hypothesen diskutiert (36-39). So findet man beispielsweise somatische Mutationen und/ oder eine Hypermethylierung des von

Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens bei mehr als 85% der sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinome (36; 40). Für eine Regulierung des VHL-Gens durch epigenetische Faktoren spricht vor allem die in immerhin fast 20% der sporadischen Nierenzellkarzinome und familiären VHL-Tumoren auftretende Hypermethylierung der Promotorregion (36) und das transkriptionelle *silencing* des VHL-Gens. Der funktionelle Mechanismus der Interaktionen des VHL-Genproduktes und seinen molekularen Partnern ist bislang noch nicht aufgeklärt. In der Literatur werden zur Zeit eine Wirkung des VHL-Genproduktes auf den Mechanismus der Elongation, ein regulatorischer Einfluß auf die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), sowie eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus diskutiert (38; 41-48).

Man unterteilt die Erscheinungsformen des VHL-Syndroms in VHL-Typ 1, der ohne Phäochromozytomen auftritt, und VHL-Typ 2, der mit Phäochromozytomen einhergeht. Obwohl das Phäochromozytom als gutartig gilt, wurden auch Fälle beschrieben, in denen dieses die Todesursache der Patienten war (49). Eine weitere Unterteilung des VHL-Typs 2 erfolgt in Typ 2A ohne NZK und Typ 2B mit NZK. Bislang sind nur wenige Familien mit Typ 2B bekannt. Angehörige von VHL-Familien des Typs 2 weisen zu 96% *missense* Mutationen im VHL-Gen auf und haben eine bessere Prognose, während in Familien mit Typ 1 fast ausschließlich *nonsense* Mutationen oder Deletionen im VHL-Gen, verbunden mit einer ungünstigen Prognose, gefunden werden (34).

Heute werden im Rahmen klinischer Vorsorgeuntersuchungen für Risikopatienten auch molekulargenetische Diagnoseverfahren durchgeführt. Hierbei kommen die SSCP-Analyse und vor allem die direkte DNA-Sequenzierung zur Anwendung. Sofern für einzelne Familienmitglieder mittels Sequenzanalyse eine Punktmutation im VHL-Gen nachgewiesen wird, sollte ein vollständiges Vorsorgeprogramm durchlaufen werden.

1.4 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene (TSG) sind rezessive Gene. Erst der Funktionsverlust beider Allele führt zu unkontrollierter Zellteilung und Tumorwachstum. Häufig unterdrücken Tumorsuppressorgene die Zellproliferation und wirken sich regulierend auf das Zellwachstum aus. Sie sind Antagonisten der dominanten Onkogene, deren Genprodukte Zellteilung und -wachstum fördern. Man spricht deshalb bei Tumorsuppressorgenen auch von Anti-Onkogenen.

1.4.1 Das-*Two-Hit*-Modell

Die Existenz von Tumorsuppressorgenen wurde 1971 von Knudson nach Vererbungsstudien an familiären Tumorsyndromen postuliert und von Comings erweitert (50; 51). Nach diesem als „Knudson Modell“ vorgeschlagenen Mechanismus erfolgt eine primäre Mutation spontan in einer somatischen Zelle (sporadische Form) oder bereits während der Keimzellentwicklung (familiäre Form). Diese Mutation bleibt aufgrund der Rezessivität gegenüber dem Wildtypallel ohne phänotypische Ausprägung. Solche Mutationen sind häufig kleine Veränderungen, wie Transversionen, Transitionen, Punktmutationen oder Mikrodeletionen. Die Tumorentstehung erfolgt nach einer zweiten, somatischen Mutation im Wildtypallel. Diese Mutationen können durch äußere Einflüsse (Rauchen, Umweltbelastungen) verstärkt werden. Sehr häufig handelt es sich hierbei um Verluste größerer Chromosomenabschnitte oder des kompletten Chromosoms (52). Das Tumorsuppressorgen-Modell wurde ursprünglich für das Retinoblastom entwickelt und wird inzwischen allgemein anerkannt. Bekannte Tumorsuppressorgene neben VHL sind RB-1 (Retinoblastome u.a.), p53 (Karzinome der Brust, Lunge, Dickdarm) und WT1 (Wilms Tumor).

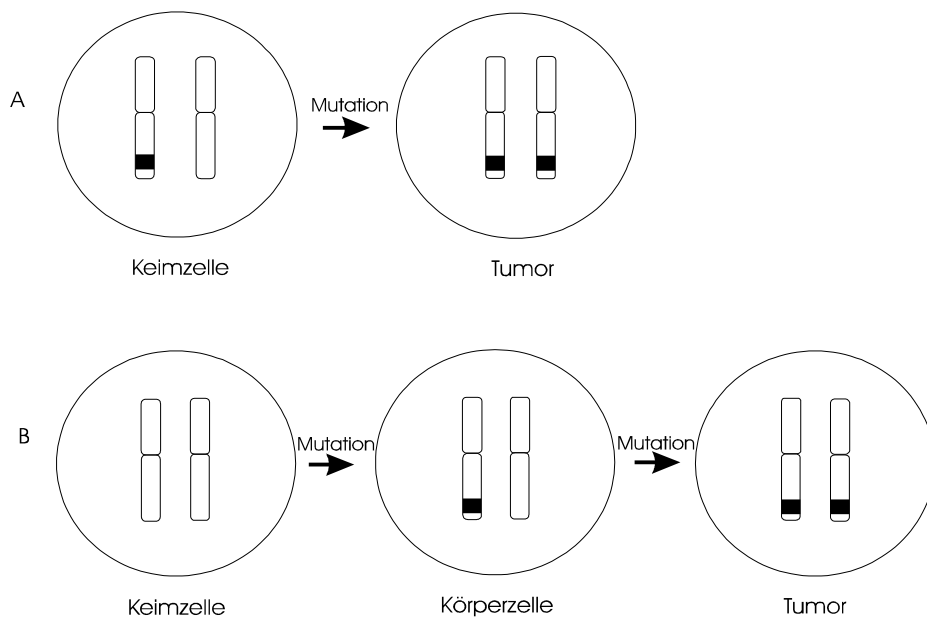


Abb. 2: Modell der „Zwei-Schritt-Hypothese“ zur Tumorentstehung durch Inaktivierung rezessiver Tumorsuppressorgene. A) Die erste Mutation erfolgt in der Keimbahn, die zweite ist eine somatische Mutation. B) Beide Mutation erfolgen nacheinander in einer somatischen Zelle.

1.4.2 Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen

Verschiedene Inaktivierungsmechanismen von Tumorsuppressorgenen auf genomischer Ebene werden diskutiert (52). Dazu gehören Fehlverteilungen von Chromosomen während der Mitose (*non-disjunction*) mit und ohne endomitotischer Reduplikation oder mitotischer Rekombination.

Neben diesen gibt es noch weitere Aberrationen, die auf bestimmte Chromosomenregionen beschränkt sind, wie Deletionen, Punktmutationen oder Genkonversionen. Liegt zum Zeitpunkt dieser Ereignisse bereits eine somatische Mutation des zweiten Allels vor, so haben diese den vollständigen Verlust der Genfunktion zur Folge.

Bevor die cDNA des VHL-TSG 1993 kloniert wurde (53), bediente man sich zytogenetischer und molekulargenetischer Methoden, mit deren Hilfe das VHL-Gen bereits als Tumorsuppressorgen definiert werden konnte. Chromosomenanalysen zeigten häufig Verluste bestimmter Chromosomenabschnitte vor allem des distalen

Abschnittes des kurzen Arms von Chromosom 3 (3p). Umfangreiche RFLP-Studien (*restriction fragment length polymorphism*) zeigten Veränderungen der untersuchten Genomabschnitte. Daraufhin durchgeführte Transfektionen von 3p-Chromosomenmaterial in 3p-defiziente Nierenzellkarzinomzelllinien führte zu einer signifikanten Reduktion der *in vitro* Proliferationsrate (54; 55). Nach der Klonierung des VHL-Gens gelang 1995 der direkte Nachweis der Tumorsuppression. Die cDNA des VHL-Gens wurde dazu in eine Nierenkarzinomzelllinie mit fehlender VHL-Genexpression transfiziert. Das Tumorwachstum wurde effizient supprimiert, was definitionsgemäß der Funktion eines Tumorsuppressorgens entspricht (56). In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, daß bereits eine Punktmutation die Funktion des Gens stören kann, bzw. seine suppressive Wirkung vollständig verhindern kann (57).

1.5 Das von Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgen

1.5.1 Klonierung des VHL-Gens

Es erfolgten zunächst zytogenetische Untersuchungen (58-60), die eine Eingrenzung des Genlokus auf einen bestimmten Chromosomenabschnitt ermöglichten. Im weiteren Verlauf wurden Kopplungsanalysen und physikalische Kartierungen, danach LOH-Studien (61; 62) und abschließend die Isolation der cDNA durch Ermittlung der transkribierten Sequenzen in verschiedenen konstitutionellen Deletionen von Betroffenen durchgeführt (53). Man spricht bei dieser Verfahrensweise vom *positional cloning*.

Anhand der erwähnten LOH-Studien fand man schnell heraus, daß die zweite somatische Mutation im Tumor immer das Allel betraf, welches der Patient von dem gesunden Elter geerbt hatte, also die Wildtypform. Diese Beobachtungen ließen erstmals konkret auf ein Tumorsuppressorgen schließen (61; 63; 64).

Zur Klonierung des VHL-Gens wurden bei einer Reihe von betroffenen Familien mit familiärem VHL-Syndrom molekulargenetische Analysen durchgeführt. Bei 3 Familien fanden sich Mikrodeletionen und Rearrangements in diesem Abschnitt von Chromosom 3, die bewiesen, daß hier ein verantwortliches Gen lokalisiert war, welches an der Entstehung des von Hippel-Lindau Syndroms beteiligt ist (65; 66). Durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen konnte man das VHL-Gen auf diesem Lokus identifizieren. Bei anschließenden RFLP-Studien mit der als g7 bezeichneten cDNA des putativen VHL-Gens fand man bei 13% der untersuchten VHL-Familien eine Keimbahnmutation, was als Hinweis auf eine gelungene Genklonierung anzusehen war (53; 67). Dieser Befund weist auf die Involvierung von dort lokalisierten Tumorsuppressorgen bei der Karzinogenese hin. 1993 konnte das von Hippel-Lindau-Gen im Chromosomenabschnitt 3p25-26 als ein Tumorsuppressorgen eingegrenzt werden (53).

1.5.2 Molekulargenetik des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens

Die 642 bp lange cDNA des VHL-Gens beinhaltet 3 Exons. Durch alternatives Spleißen kann Exon 2 herausfallen, wodurch zwei mRNA-Transkripte von 6,0 kb und 6,5 kb (53; 68), bzw. bei anderen Autoren 4,5 kb und 5,0 kb (69; 70), entstehen können. Die alternativen Spleißprodukte treten in Abhängigkeit von Gewebe und Alter in unterschiedlicher Verteilung auf (53); in fetalem Hirn findet man das kürzere, in fetaler

Niere das längere Transkript. In adultem Gewebe werden beide mRNAs exprimiert, wobei das längere Transkript im Vergleich zum kürzeren im Verhältnis 2:1 auftritt. Weitere adulte Gewebe, in denen die VHL-mRNA gefunden wird, sind Nebenniere, Milz, Prostata, Lunge und Herz.

Die Promotorregion enthält keine typischen Sequenzen, wie eine TATA oder CCAAT-Box. Die Transkription startet an einer SP1 Bindungsstelle etwa 60 Basenpaare *upstream* des ersten AUG-Codons der VHL-mRNA (71; 72).

In der VHL-cDNA liegt jedoch noch ein zweites *in frame*-Start Codon. Das erste AUG im offenen Leseraster (*open reading frame*, ORF) des humanen VHL wird als Translationsinitiationsstelle, beginnend mit Aminosäure 1, bezeichnet (40). Diese erste Initiationsstelle weist Sequenzhomologien zur Startstelle der VHL cDNA der Maus und der Ratte auf. Im Vergleich zu der internen Initiationsstelle (2. AUG) weist die 1. Startregion eine suboptimale Kozaksequenz auf. Die Sequenz ab dem 1. AUG codiert für ein 213 AS-langes VHL-Protein (69). An Codon Nr. 54 befindet sich die interne Initiationsstelle im *open reading frame* des VHL-Gens (40). Vor diesem Triplet befindet sich eine konserviertere Kozaksequenz. Die Bedeutung dieser zweiten Translationsstartstelle wird dadurch hervorgehoben, daß keine Mutationen zwischen der ersten Initiationsstelle und der internen Initiationsstelle, sowohl im sporadischen, als auch im VHL-assoziierten Nierenzellkarzinom, nachgewiesen werden. Dies weist daraufhin, daß Mutationen in diesem Bereich zu keiner Inaktivierung des VHL-Gens führen, da im Falle einer Mutation im vorderen Bereich des Gens die Translation an der internen Startstelle initiiert und ein funktionsfähiges VHL-Protein gebildet werden kann (40). Der Sequenzabschnitt, welcher die tumorsuppressive Funktion des VHL-Gens ausmacht, scheint demnach im hinteren Bereich des Gens lokalisiert zu sein.

Durch die zwei verschiedenen Translationsinitiationsstellen ergeben sich die bereits erwähnten beiden mRNA Transkripte, welche für zwei unterschiedliche Proteine mit einem Molekulargewicht von 24 und 18 Kilodalton kodieren (40). Das kleinere der beiden Proteine ist weitverbreitet und wird von der internen Initiationsstelle, d.h. von der Sequenz vom 2. AUG bis zum Stop-Codon, codiert und ist somit kein Abbauprodukt des größeren Proteins. Beide Proteine scheinen für die Bindung an Elongin B und C und für die Regulation der mRNA des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors und des Glucose Transporter Proteins verantwortlich zu sein. Die Aminosäuresequenz zwischen den Initiationsstellen ist beim Maus- und Ratten-VHL-Protein um 34 auf 19 Aminosäuren verkürzt und weist mit dem humanen VHL-

Genprodukt in diesem Bereich kaum Homologie auf (40). Es ist daher möglich, daß diese beiden Proteine unterschiedliche, noch unbekannte Funktionen aufweisen.

Beim Vergleich der VHL cDNA mit bekannten DNA-Sequenzen anderer Gene fand man eine Homologie zu einer sauren Domäne eines Oberflächenproteins von *Trypanosoma brucei*, was zunächst die Vermutung nahelegte, das VHL-Protein sei ein Adhäsionsmolekül (53). Beim Vergleich mit den Maus- und Rattenhomologen wurde diese Sequenz allerdings nicht gefunden. Es ergab sich zwischen den untersuchten Spezies eine Homologie von 90%, woraus man auf eine hohe evolutionäre Konservierung des Genes rückschließen kann (73-75).

Bei der Suche nach der Lokalisation des VHL-Genproduktes innerhalb der Zelle fand man Signale sowohl innerhalb, als auch außerhalb des Zellkernes. Eine Abhängigkeit der zellulären Lokalisation des VHL-Genproduktes vom Stadium des Zellzyklus wird diskutiert (76). Bei *in vitro* Versuchen fand man auch eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation des VHL Proteins in Abhängigkeit von der Zelldichte im Kulturgefäß (77).

1.6 Angiogenese

Als Angiogenese bezeichnet man die Bildung neuer Kapillaren aus existierenden Gefäßen. Auslöser für dieses Wachstum ist ein angiogener Stimulus, der von benachbarten Geweben ausgeht. Dieser Impuls bewirkt, daß die kapillarauskleidenden Endothelzellen ihre Basalmembran verdauen und in die Nachbargewebe hineinwachsen (78). Angiogenese gewährleistet während der Embryonalentwicklung die Ausbildung eines Blutgefäßsystems und das korrekte Wachstum der Organe. Wird die Angiogenese in dieser Phase durch genetische Faktoren, Sauerstoffmangel oder Medikamente mit teratogener Wirkung (Thalidomid) gestört, so kommt es beim Menschen durch Störungen der Blutgefäßentwicklung beispielsweise zu verschiedenen Extremitätenfehlbildungen (Dysmelien), wie z. B. Amelie oder Phokomelie (78-81). Bei zu starker Angiogenese können ebenfalls pathologische Erscheinungen, wie z. B. Hämangiome auftreten. Im Kindesalter geht die Angiogenese und die damit verbundene Endothelzellproliferationsrate zurück und ist beim erwachsenen Mann kaum mehr nachweisbar. Bei der Frau kommt es nur noch während des Menstruationszyklus erneut zu starker Gefäßbildung, da Angiogenese die Corpus Luteum-Entwicklung und das Endometriumwachstum sicherstellt (82; 83). Außerdem wird Neoangiogenese im Kindes- und Erwachsenenalter nach Verletzungen, während der Wundheilung und bei Entzündungsprozessen beobachtet.

Neben diesen physiologischen Funktionen tritt Neoangiogenese jedoch auch bei pathologischen Veränderungen, wie z. B. soliden Tumoren auf. Aus diesem Grund ist in den letzten Jahren die Hemmung der Neoangiogenese als potentieller therapeutischer Ansatz erkannt worden (84; 85). Dieser Ansatz zielt darauf, die Bildung neuer Blutgefäße einzuschränken oder gar zu blockieren, um damit eine Abschwächung oder Heilung angiogenetisch bedingter Krankheiten zu erreichen (86). Diese sogenannte Antiangiogenese ist insbesondere zur Heilung solider Tumoren oder als effektive Rezidivprophylaxe erkannt worden, da eine Vielzahl solider Tumoren eine ausgeprägte Vaskularisierung aufweisen (87-89).

Wenn eine somatische Zelle entartet, entsteht nach einigen Zellteilungen ein Konglomerat mit einem Durchmesser von etwa 1 bis 3 mm, welches als *in situ*-Läsion bezeichnet wird (81). Ab dieser Größe ist eine Versorgung der Tumorzellen nicht mehr möglich, da per Diffusion weder Sauerstoff und Nährstoffe in ausreichendem Maße in diese Zellen gelangen, noch toxische Metabolite aus ihnen abtransportiert werden

können (78; 86). Damit aus dieser Ansammlung von Tumorzellen ein Tumor werden kann, ist es deshalb von entscheidender Bedeutung, daß sich dieses Tumorzellkonglomerat ein eigenes Gefäßnetz verschafft. Man weiß, daß diese Zellen angiogene Faktoren wie z. B. bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*), PDGF (*Plateled Derived Growth Factor*) oder VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) sezernieren, die durch das umliegende Gewebe diffundieren und sich letztlich an der Endothelzelloberfläche von Kapillaren anlagern. Endothelzellen tragen an ihrer Oberfläche spezifische Rezeptoren für angiogene Faktoren. Es kommt zu einer Knospung mit anschließender Sprossung der Kapillare, die sich aufgrund erhöhter Zellteilungsaktivität ständig verlängert und auf die Tumorzellen zuzuwachsen beginnt. Hat dieses neue Gefäß die Tumorzellen erreicht, so ist ihre Versorgung gewährleistet und die Bildung des Tumors kann fortschreiten. Ab einer bestimmten Größe ist die Gefäßversorgung nicht mehr ausreichend und neue Kapillaren werden benötigt. In diesem Fall stellt der Tumor sein Wachstum ein und beginnt erneut mit der Sezernierung angiogener Faktoren. Damit läßt sich das häufig zu beobachtende schubweise Wachstum solider Tumoren erklären (78; 86).

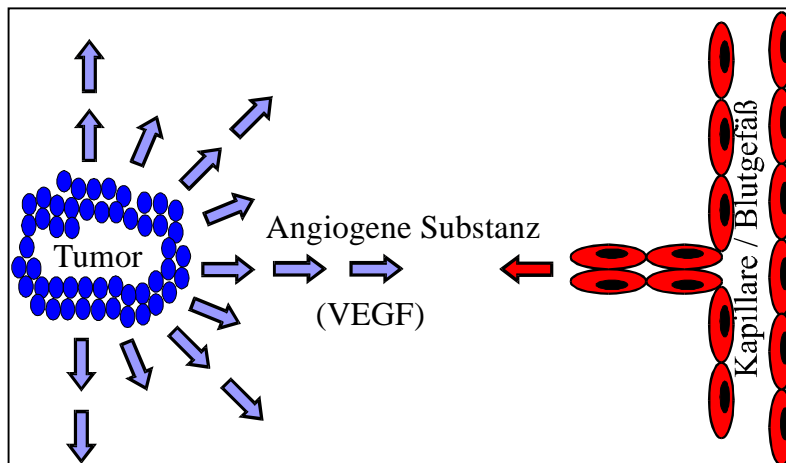


Abb. 3: Schematische Darstellung der Tumorangiogenese; der Tumor sezerniert angiogene Faktoren, wie z. B. VEGF und regt benachbarte Kapillaren damit zur Sprossung an; die Kapillare beginnt auf den Tumor zuzuwachsen und versorgt ihn mit Nährstoffen, bzw. sorgt für den Abtransport toxischer Metabolismusprodukte.

1.7 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF)

Zu den angiogenen Faktoren, die von Tumorzellen in das umliegende Gewebe abgegeben werden, gehört auch der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF. Das Gen für dieses Protein, welches auch als *vaskular permeability factor* (VPF) oder Vaskulotropin bekannt ist, ist auf Chromosom 6 (6p21.3) lokalisiert (90; 91). Dabei handelt es sich um ein homodimerisches, 34 bis 42 kDa schweres, heparinbindendes Glycoprotein mit großer angiogener und mitogener Aktivität für Endothelzellen (92-94). Die Aminosäuresequenz von VEGF zeigt große Homologien zu der α - und β -Kette des *platelet derived growth factor* (PDGF) und des *placenta growth factor* (PlGF) (91; 95). Aufgrund seiner Homologie zu diesen angiogenen Proteinen wurde auch VEGF als angiogenesefördernder Faktor erkannt (96).

VEGF wird in vielen humanen soliden Tumoren exprimiert, so z. B. in Lungenadenokarzinomen, Blasenkarzinomen und Nierenkarzinomen (97-100). In gesundem Gewebe findet man VEGF häufig als Produkt aktiver Makrophagen (101). Durch *in vitro* Versuche wurde gezeigt, daß die Expression von VEGF durch TGF- β und Hypoxie verstärkt werden kann (100; 102; 103).

Das Gen für humanes VEGF ist in 8 Exons unterteilt. Durch alternatives Spleißen entstehen vier Transkripte von 121, 165, 189 und 206 Aminosäuren (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆), denen ein 26 Aminosäuren langes Signalpeptid vorangeht (93; 104; 105). VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ sind lösliche Proteine, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ haben eine hohe Affinität für Heparin und sind meist an heparinbindenden Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix angereichert (106). VEGF ist ein stark konserviertes Protein mit einem hohen Potential für Kreuzspezifität zwischen verschiedenen Arten. Zwischen humanem, Ratten- und Rinder-VEGF wurde eine Homologie von 84 bis 94% nachgewiesen (107-109).

Als putative VEGF-Rezeptoren wurden zwei Rezeptor-Tyrosinkinasen mit hoher Affinität beschrieben, Flt-1 (*fms-like tyrosinkinase*) und KDR (*kinase-insert-domain-containing receptor*) (110; 111).

In vitro wirkt VEGF als starkes Mitogen für Endothelzellen (103). In kultivierten Endothelzellen aktiviert es die Phospholipase C ζ , was mit einem starken Anstieg von frei verfügbarem cytosolischem Ca²⁺ einhergeht (106). Dadurch kommt es zu einer verstärkten Expression anderer Wachstumsfaktoren und zu einer Expressionsverminderung verschiedener Tumorsuppressorgene. *In vivo* führt VEGF zu verstärkter

Angiogenese durch eine Erhöhung der Vaskularität von umgebendem Gewebe. Aufgrund dieser *in vitro* und *in vivo* nachgewiesenen Eigenschaften spielt VEGF eine wichtige Rolle während normaler und pathologischer Angiogenese und ist dadurch in den Focus moderner Krebsforschung gerückt (112; 113).

1.8 Einfluß des VHL-Proteins auf zelluläre Mechanismen

Durch Funktionsanalysen und Koimmunpräzipitationsexperimente konnten in den letzten Jahren einige Proteine, die möglicherweise in Interaktion mit dem VHL-Genprodukt stehen, gefunden werden. Die Suche nach möglichen Bindungsdomänen erwies sich als erfolgreich.

1.8.1 Elongation

Im N-terminalen Bereich des VHL-Proteins konnte ein Bereich detektiert werden, der spezifisch mit zwei Proteinen der Molekulargewichte 18 kDa und 34 kDa interagiert (69). Dieser Bereich umfaßt die Aminosäuren 1 bis 89. Die C-terminale Region enthält einen 32 Aminosäuren langen Abschnitt mit hoher Bindungsaffinität für zwei Proteine mit Molekulargewichten von 10 bzw. 14 kDa (69). Anhand der Molekülgröße wurde erkannt, daß es sich bei diesen Proteinen um zwei Untereinheiten des Elongins handelt, Elongin B und Elongin C. Als man die Tumoren von 67 Familien mit VHL-Syndrom auf VHL-Mutationen an der entsprechenden Stelle untersuchte, fand man bei 31 Familien Mutationen, die den Bereich zwischen den Aminosäuren 157 und 189 betreffen. Bei 11 Familien wurden Deletionen des VHL-Gens in dieser Region gefunden. Vergleicht man diese Daten mit *missense*-Mutationen an den Codons der Aminosäuren 93, 98, 111, 112 und 119, so findet man dort keinen Verlust der Bindungseigenschaften des VHL-Genproduktes zu Elongin B und Elongin C (69; 114). Durch Untersuchungen der Interaktion zwischen dem VHL-Protein und dem heterotrimeren Elongationsfaktor S III konnte man die Elongin B/ Elongin C bindende Domäne weiter einengen. Diese Interaktion weist auf eine Regulationskontrolle potentieller Zielgene des VHL-Gens auf Transkriptionsebene hin. Der SIII-Komplex setzt sich aus einer Gruppe von Elongationsfaktoren zusammen, welche die Transkription positiv regulieren. Zu dieser Gruppe gehören noch die Proteine SII, P-TEFB, TFIIF und ELL (115-119). Alle fünf Elongationsfaktoren erhöhen die Effizienz der transkriptionellen Elongation durch eine Interaktion mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II (115; 116; 120). Dieses Enzym liest aus der einzelsträngigen DNA die Sequenzinformation ab und generiert eine Kopie, die mRNA. Von Zeit zu Zeit stoppt die RNA-Polymerase für eine bestimmte Zeit ab und verharrt auf der DNA (121). Dieser, als *pausing* bezeichnete Regulationsmechanismus der *in vivo* mRNA-Synthese wird durch den Elongin Komplex zeitlich stark verkürzt (122).

Der Elongin SIII Komplex setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen. Zwei Komponenten, die bereits angesprochenen Untereinheiten Elongin B und Elongin C, haben eine regulatorische Funktion, der dritte Teil (Elongin A) wirkt transkriptionsaktivierend katalytisch. Elongin B und Elongin C bilden ein Dimer (B/C), das eine Bindungsdomäne für Elongin A, aber auch für das VHL-Protein aufweist (114; 123). Es handelt sich hierbei um eine Sequenzhomologie mit der C-terminalen Region von pVHL, und der bereits erwähnten Sequenz zwischen den Aminosäuren 157 und 172 (120; 124; 125).

Die Bindung des VHL-Proteins an die beiden Untereinheiten B/C (126) kompetitiert mit der Bindung von A an B/C, wobei der VHL-B/C-Komplex das *pausing* verlängern und damit die Elongation regulieren kann (37). Kommt es nun durch eine Mutation im VHL-Gen zu einer Veränderung des Proteins, so verliert es seine Fähigkeit, B/C zu binden und damit die Elongation zu steuern. Dies führt zu einer hohen Transkriptionsrate, da nun ausschließlich der ABC-Komplex wirksam wird. Dieser Mechanismus ist in der folgenden Abbildung (Abb. 4) grafisch dargestellt.

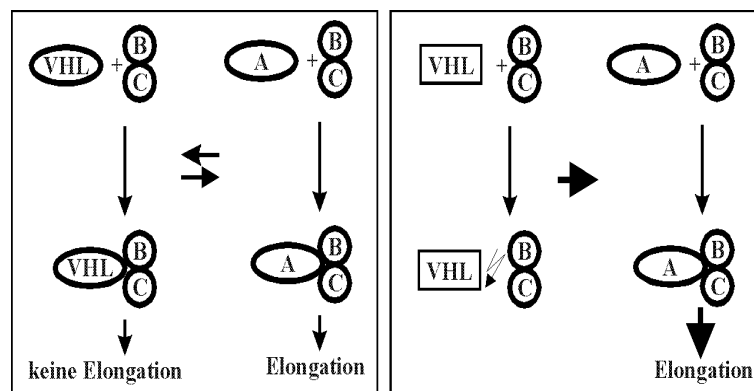


Abb. 4: Vermuteter Wirkmechanismus des VHL-Genproduktes bei der Transkription/elongation. Nähere Erklärungen finden sich im Text. Es sei vor allem auf das durch Mutation veränderte VHL-Protein im rechten Teil der Abbildung und auf die damit verbundene Verstärkung der Elongation hingewiesen.

1.8.2 Translation

Am 3'-Ende der VHL-mRNA konnte 1996 ein Bereich kloniert werden, der nicht translatiert wird, dem aber eine Rolle bei der Genregulation zugeschrieben wird (127): Diese Region des VHL-Gens (3'-UTR) besteht aus drei putativen Polyadenylierungssignalen, insgesamt 11 Alu-repetitiven Elementen und mehreren Adenylierungskontrollelementen (ACE), welche auch als cytoplasmatische Polyadenylierungselemente (CPE) bezeichnet werden (127). Während die Konsensussequenz des Polyadenylierungssignals (ATTAAA) für Polyadenylierung und mRNA-Stabilität verantwortlich ist, scheint der Sequenz des ACE (TTTTTAT oder TTTTAAT) meistens eine metabolische Rolle als Deadenylierungs- und Readenylierungssignal zuzukommen. Nach jedem der Polyadenylierungs Hexamere folgt eine GT- und T-reiche Sequenz, was möglicherweise die Stabilität der Poly(A) Stellen erhöht. Die 3' UTR Kontrollelemente ACE beeinflussen im allgemeinen die Länge bestimmter maternaler Poly(A) Reste während der Entwicklung; dies scheint wiederum mit der translationellen Aktivität dieser mRNAs zu korrelieren (127). Obwohl gezeigt werden konnte, daß die VHL-mRNA ubiquitär exprimiert wird (53), erwartet man, daß VHL als negativer Regulator des Zellwachstums auf unterschiedlichen Ebenen gewebetypspezifisch reguliert wird. Das Auftreten von ACE/CPE Elementen in der 3'UTR weist auf solch einen Regulationsmechanismus auf translationeller Ebene hin (127).

Zur möglichen Interaktion von VHL mit hypoxieinduzierbaren mRNAs sei auf Abschnitt 1.8.6. verwiesen.

1.8.3 Intrazellulärer Proteintransport

Mit Hilfe des *Two-Hybrid Systems* konnten neben Elongin SIII weitere Interaktionspartner des VHL-Proteins gefunden werden. Das VHL-bindende-Protein (VBP-1) weist z. B. auf eine mögliche Rolle des VHL-Proteins als Transportprotein zwischen Zellkern und Cytoplasma hin, da es durch die Bindung an VHL zwischen diesen beiden Kompartimenten hin- und hertransferiert wird (128; 129). Mit dieser Funktion könnte sich auch die unterschiedliche Anreicherung des VHL-Proteins im Zellkern bzw. im Cytoplasma erklären lassen.

1.8.4 mRNA-Stabilisierung

Man vermutet, daß das VHL-Genprodukt einen Regulationsschritt bei der Anlagerung von AUBPs (*Adenyl-Uracyl-binding proteins*) an die ARE (*AU-rich elements*) *binding site* am 3' Ende der mRNA möglicher Zielgene (z. B. VEGF oder Glut-1) steuert (46; 130; 131).

Bei höheren Organismen findet man Proteine, die selektiv an regulatorische Gensequenzen binden und somit die Geschwindigkeit der Transkription regulieren. Die Transkription kann in jeder Phase (Initiation, Elongation, Termination) verstärkt oder abgeschwächt werden (132; 133). Gleichzeitig verfügen eukaryontische Zellen aber auch über die Möglichkeit der posttranskriptionellen Genregulation.

Der Mechanismus der posttranskriptionellen Genregulation beruht auf unterschiedlich langen Halbwertszeiten von mRNA. Verantwortlich dafür sind bestimmte Sequenzunterschiede, die einen beschleunigten Abbau der RNA *in vivo* ermöglichen. Es handelt sich dabei um AU-reiche Regionen in der Nähe des 3'-Poly A- Endes. In seltenen Fällen wird sogar mit dem Abbau der RNA am 5'-Ende bereits begonnen, bevor das 3'- Ende synthetisiert ist (132). Über die Mechanismen, welche Stabilität und Translatierbarkeit der mRNA regulieren, ist wenig bekannt, obwohl beide Faktoren die Genexpression erheblich beeinflussen. Es gibt aber gut untersuchte Beispiele, an denen deutlich wird, wie wichtig diese Vorgänge sind (134-137).

In den nichttranslatierten Abschnitten eukaryontischer mRNA gibt es besondere Sequenzen, die für ihre Stabilität wichtig sind. Zum Beispiel trägt die Poly(A)-Sequenz in Verbindung mit einem poly(A)-bindenden Protein zur Stabilität der mRNA bei, weil sie die 3'-Enden gegen exonukleolytische Angriffe schützt (132). Deshalb führen Mutationen im Polyadenylierungssignal, die eine Polyadenylierung verhindern, zu sehr instabilen Transkripten.

Aufeinanderfolgende Translationszyklen führen zu einer langsamen Verkürzung der Poly(A)-Schwänze, bis das 3'-Ende der mRNA für den Abbau durch Exonucleasen zugänglich wird. Demnach dürfte die Translatierbarkeit einer mRNA in direktem Zusammenhang mit ihrer Stabilität stehen.

1986 entdeckte man bei manchen eukaryontischen mRNAs im nichttranslatierten Abschnitt am 3'-Ende eine Sequenz, die spezifisch den Abbau fördert (134; 138). Diese Sequenz (5'-AUUUA-3') kann in tandemförmiger Überlappung, *upstream* des Polyadenylierungssignals einiger kurzlebiger mRNAs, mehrfach vorkommen. Zu dieser

Gruppe gehören einige mRNAs für Zellproteine, die Wachstum und Differenzierung der Zellen steuern (z. B. VEGF), sowie mRNAs, die durch Transkription zellulärer und viraler Onkogene entstehen (u.a. c-fos, c-myc).

Die Deletion des AU-reichen Abschnitts verwandelt z. B. das zelluläre c-fos-Gen in ein Onkogen, da als Folge der Mutation die Menge der im Fließgleichgewicht vorhandenen, zugehörigen mRNA ansteigt. Umgekehrt verliert das Virusonkogen v-fos sein krebserzeugendes Potential, wenn das 3'-Ende durch den entsprechenden Abschnitt des nichtonkogenen Gens c-fos ersetzt wird (133). Vermutlich beruht die kanzerogene Wirkung auf der höheren Konzentration des Translationsprodukts, die durch die längere Lebensdauer der mRNA hervorgerufen wird.

Weshalb AU-reiche Sequenzen eine Instabilität der mRNA bewirken, ist nicht bekannt. Möglicherweise binden aktivierte AUBPs an derartige Sequenzen und machen sie dadurch für die Wirkung von Endonucleasen und später für den Abbau durch Exonucleasen zugänglich. Anderen Hinweisen zufolge beschleunigen diese Sequenzen jedoch den mRNA-Abbau durch die genannten Enzyme, indem sie für eine schnellere Verkürzung der Poly-(A)-Schwänze sorgen (135).

1.8.5 Interaktion von VHL mit Cullin-2

Da das VHL-Protein (pVHL) über Elongin-C auch eine indirekte Bindung mit Cullin-2 (42; 76; 139), einem Vertreter der Cullin Proteine, eingeht, scheint es nicht nur in Prozesse auf Transkriptionsebene involviert zu sein, sondern könnte auch eine wichtige Rolle bei der mRNA-Stabilisierung spielen (140). Außerdem ist pVHL möglicherweise über die Bindung an das Cullinprotein an der Proteindegradation beteiligt (42). Cullin-2 bindet an den VHL-Elongin B/C-Komplex, was mit der Regulation von hypoxieinduzierbaren mRNAs korreliert (130; 140). Cullin-2 scheint die notwendige Komponente für die Assemblierung des trimeren Komplexes (Elongin B,C und VHL) zu sein, da VHL in Abwesenheit von Cullin-2 nicht mit Elongin B oder C alleine interagieren kann (42). Daß eine eventuelle Korrelation zwischen der Bindung von VHL an Elongin B/C-Cul2 und einer mRNA-Stabilisierung besteht, wird dadurch unterstützt, daß *downstream-targets* von Cullin-2 RNA-bindende Proteine sein könnten, die spezifisch mit der 3' untranslatierten Region von hypoxieinduzierbaren mRNAs interagieren (42; 43).

1.8.6 Interaktion von VHL mit VEGF

Man vermutet, daß das VHL-Genprodukt ein negativer Regulator von Hypoxie-induzierbaren mRNAs ist (140). Zu den durch Hypoxie induzierbaren mRNAs gehören u.a. die mRNAs der Gene VEGF und des Glucose Transporters Glut-1. VEGF ist als angiogener Faktor an der Gefäßbildung während der Phylogenie, aber auch während der Tumorgenese beteiligt (141) (s. auch Abschnitt 1.7). Zur Erklärung einer möglichen physiologischen Interaktion zwischen VHL und VEGF wurden verschiedene Hypothesen postuliert (38; 47; 141; 142):

Durch Hypoxie wird der Calcium-Einstrom und die membrangebundene Proteinkinase C-Konzentration erhöht, d.h. in der Zelle nimmt die Menge dieser *second messenger* zu (141). Es konnte gezeigt werden, daß das VHL-Protein in Nierenzellkarzinomen cytoplasmatische Komplexe mit zwei spezifischen Isoformen der Proteinkinase C (PKC) bildet, wodurch deren Translokation zur Zellmembran verhindert wird (48; 143). Durch die verhinderte Translokation der PKC-Isoformen werden Signaltransduktionsprozesse unterbunden, die normalerweise zu einer Überexpression von VEGF führen. Die PKC δ Isoform interagiert direkt mit dem VHL-Protein, während die ζ Isoform für die Bindung an pVHL weitere Komponenten benötigt. Die Neutralisierung der PKC δ und ζ Isoformen durch das VHL-Protein und die damit verbundene Verhinderung der Phosphorylierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) führt zur Inaktivierung dieser Kinasen (48). Die Inhibition der MAPK bewirkt die *Downregulation* der VEGF Expression.

Eine andere Erklärung ist die Bindung von VHL an Hif-1 (46; 130) und an SP1 und damit die Regulation des VEGF-Promotors oder anderer VHL-Zielgene (144).

In diesem Zusammenhang sei noch erwähnt, daß eine homozygote VHL- Mutation bei Maus und Ratte als Letalfaktor wirkt (145). Als mögliche Ursache kommt eine verminderte Vaskularisierung der Placenta in Frage, was eine suboptimale Versorgung des Embryos zur Folge hat. Embryonen von Maus und Ratte mit einer homozygoten VHL-Mutation sterben am 9. bzw. 10. Tag der Gastrulation (146; 147).

1.8.7 Zusammenfassung der möglichen VHL-Interaktionen

Wie lassen sich nun die beschriebenen Ergebnisse und Hypothesen aktueller Forschung am VHL-Gen zusammenfassen?

Das VHL-Genprodukt (pVHL) bildet einen großen Komplex mit Elongin B, Elongin C und Cul-2 (s. Abb. 5). Elongin C und Cul-2 ähneln zwei in der Hefe vorkommenden Proteinen, Skp-1 und Cdc-53 (43; 148), welche ihrerseits durch Bindung an das sogenannte F-Box Protein Multiproteinkomplexe (SCF-Komplexe: Skp1/Cdc53/F-Box) formen. Diese Komplexe wirken sich über einen Prozeß, der als Ubiquitinierung bezeichnet wird, direkt auf die Degradation der Targetproteine aus: Das Targetprotein wird zunächst durch ein Protein, welches als Ubiquitin bezeichnet wird, aktiviert. Es gelangt an das aktive Zentrum eines weiteren Proteinkomplexes (Proteasom) und wird dort abgebaut (s. Abb. 5).

Da sich das F-Box Protein und das VHL-Protein in ihren biochemischen Eigenschaften gleichen, nimmt man für den VHL-Elongin C-Cul-2-Komplex die gleichen Funktionen an, wie für den SCF-Komplex (149).

Diese Hypothese wird durch neue Ergebnisse bei der Aufklärung der Kristallstruktur des pVHL-Elongin B-Komplexes erhärtet (126). Auch bei diesen Untersuchungen fand man große Übereinstimmungen zum SCF-Komplex der Hefe. Für pVHL wurden zwei Unterdomänen gefunden. Dabei bindet die α -Untereinheit an das Elongin C-Cul-2 Dimer, die β -Untereinheit ist wahrscheinlich die Bindungsstelle für das Targetprotein (126). Für die Regulation von VEGF wäre eine mögliche Erklärung, daß sich Hif- α an die β -Untereinheit anlagert und damit eine Destabilisierung der VEGF mRNA erreicht wird.

Ein weiterer Hinweis für eine Involvierung von pVHL an der Ubiquitinierung läßt sich aus der Kopurifikation von pVHL und Rbx-1 ableiten (44; 45). Dieses Protein tritt ebenfalls bei der Degradation von Hefeproteinen in Aktion, in dem es ein Ubiquitin bindendes Enzym (E 2) an den Proteinkomplex heranführt (Abb. 5).

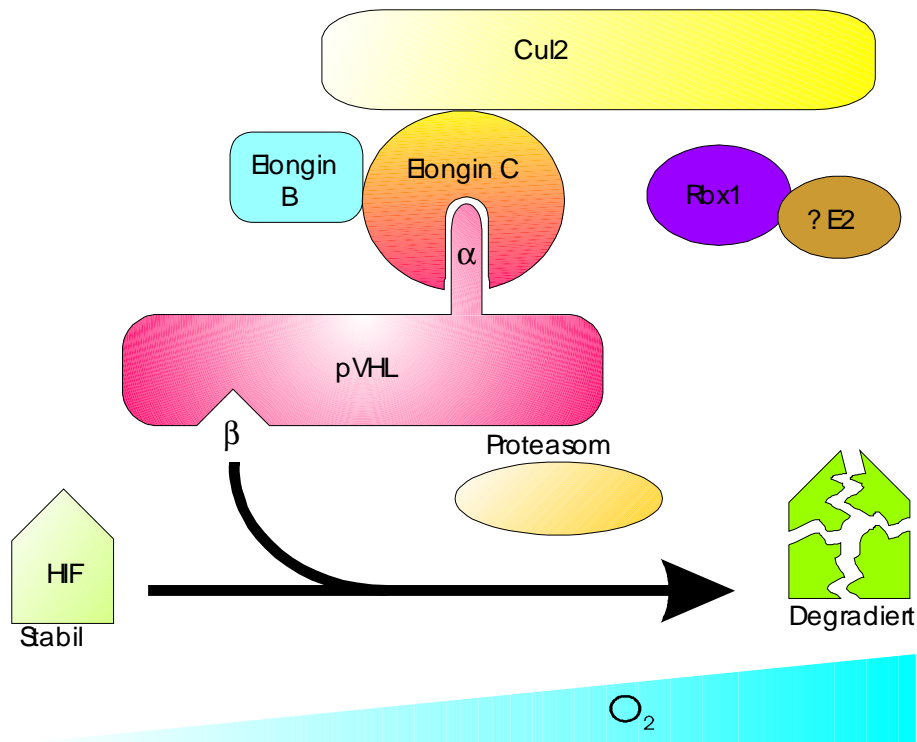


Abb. 5.: Molekulares Modell der Funktion des VHL-Genproduktes. An Elongin B, Elongin C, Cul-2 und Rbx-1 gebundenes pVHL übernimmt das Targeting von Hif-1 in einem sauerstoffabhängigen Mechanismus. Über Ubiquitinierung und anschließendem Abbau des Targetproteins erfolgt die Regulation an einem aktiven Zentrum des Proteasoms (149).

1.9 Aufklärung möglicher Targetgene von VHL durch Klonierung in GFP-exprimierende Vektoren

In den letzten Jahren hat sich ein neuartiges Nachweissystem mit fluoreszierenden eukaryontischen Vektoren als sehr hilfreich erwiesen (150; 151). Dabei macht man sich die Biolumineszenz der Qualle *Aequorea victoria* zu Nutze. Diese erzeugt Licht, wenn Energie von dem Calciumaktivierten Photoprotein Aequorin auf ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) übertragen wird (152).

Durch die Klonierung des Wildtyp GFP-Gens und dessen Expression in einem heterologen System konnte ein genetisches Reportersystem etabliert werden. Durch Substitutionen in der Basensequenz der fluorophoren Gruppe können unterschiedlich fluoreszierende Varianten des GFP hergestellt werden. Damit ist es möglich, verschieden fluoreszierende Fusionsproteine zu generieren. Durch die Transfektion der Vektorkonstrukte in die gewünschte Zelllinie kann die Lokalisation der Fusionsproteine und eine mögliche Interaktion mit den anderen fluoreszierenden Fusionsproteinen nachgewiesen werden.

1.10 Das Xenograftmodell als biologischer *read out*

Um die Pathogenese solider Tumoren aufzuklären, ist man auch auf Untersuchungen am Tiermodell angewiesen (56; 153). Nur *in vivo* lassen sich Fragen zur Tumorgeometrie beantworten (86; 154). Weiterhin soll in dieser Arbeit der Aspekt der Tumolvaskularisierung beobachtet werden. Dazu ist es notwendig, daß man Tumorzellen in einen Wirt injiziert, der dem heranwachsenden Tumor ein eigenes Gefäßnetz verschafft. Diese Studien können in Zellkulturversuchen nicht durchgeführt werden und rechtfertigen aufgrund der immensen therapeutischen Bedeutung der Antiangiogenese den Tierversuch.

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei unterschiedliche Mausstämme verwendet (CD-1/ *nu/nu* und CB-17/ *SCID*). CD-1 oder Nacktmäuse tragen eine vererbte Mutation auf Chromosom 14. Phänotypisch bedeutet das zum einen, daß sie eine gestörte Keratinsynthese haben. Dadurch sind die Fellhaare sehr instabil und brechen ab, sobald sie die Epidermis durchstoßen. Zum anderen führt diese Mutation auch zu einer verkümmerten Entwicklung des Thymus. Junge Nacktmäuse haben deshalb keine T-Zellen. Als Folge dieser Mutation stoßen sie transplantierte Zellen anderer Individuen nicht ab. Bestrahlt man diese Mäuse 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit 500 rad γ -Strahlung, so werden vorübergehend zusätzlich die B-Zellen eliminiert, was die Anwachsrate der transplantierten Zellen erhöht.

CB-17 oder *SCID*-Mäuse (*severe combined immunodeficiency*) tragen eine Mutation auf Chromosom 16, die ein völliges Fehlen von B- und T-Zellen bewirkt. Erstmals wurde dieses Phänomen 1983 beschrieben (155). Diese Mutation macht diesen Mausstamm zu einer effektiven Grundlage für biologische Studien mit Xenotransplantaten, die auch in bestrahlten *nu/nu*-Mäusen nicht anwachsen.

2. Problemstellung und Zielsetzung

Diese Arbeit soll zur Aufklärung der Pathogenese des sporadischen Nierenzellkarzinoms unter besonderer Berücksichtigung des klarzelligen Subtyps beitragen. Dieser Subtyp ist häufig gekennzeichnet durch einen Funktionsverlust des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens. Klarzellige Nierenzellkarzinome sind häufig gut vaskularisiert. Ein Kandidatengens, das neben anderen für die Angiogenese verantwortlich ist, ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF. Eine antiangiogene Wirkung des VHL-Proteins könnte deshalb möglich sein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Auswirkungen des VHL-Funktionsverlustes auf potentielle Targetgene aufgezeigt werden. Hierzu wird die Interaktion zwischen dem VHL-Gen und dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) untersucht. Ferner ist es Ziel der Arbeit, herauszufinden, ob der Expressionsverlust des VHL Tumorsuppressorgens zu einem Anstieg der beiden Onkogene c-fos und c-myc führt, deren Expressionsregulation von einem VHL-abhängigen Mechanismus gesteuert wird. Mit Hilfe eines Expressionsvektors mit Reportergen (pEGFP-N1) werden die Funktionsanalysen des VHL Gens mit *in vitro* und *in vivo* Studien durchgeführt.

Die Etablierung eines *in vivo* Modells als biologischer *read out* für eventuelle Veränderungen des Tumorwachstums wird angestrebt. Besondere Berücksichtigung findet dabei die Frage, ob sich mit einem solchen *in vivo* Modell Aussagen zur Vaskularisierung solider Tumoren treffen lassen. Für die *in vitro* Studien werden 6 Nierenkarzinomzelllinien vom klarzelligen Subtyp verwendet, die *in vivo* Studien werden mit immunsupprimierten Mäusen durchgeführt. Die Expressionsveränderungen werden mit molekulargenetischen Methoden auf RNA-Ebene untersucht. Veränderungen auf Proteinebene sollen mittels Antikörper-Nachweis durch Western Blots und Immunhistochemie nachgewiesen werden. Zudem sollen die Xenotransplantate auch histopathologisch aufgearbeitet und charakterisiert werden.

Desweiteren ist ein Ziel dieser Arbeit, die zelluläre Lokalisation des VHL-Genproduktes aufzuklären, um herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen Lokalisation und Funktion des VHL-Proteins gibt. Wünschenswert wäre letztendlich, aus der Gesamtheit dieser Untersuchungen Rückschlüsse zu ziehen, inwieweit man durch Grundlagenforschung zur Antiangiogenese die Etablierung einer Gentherapie des sporadischen Nierenzellkarzinoms vereinfachen könnte.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Chemikalien

Acrylamid (Roth, Karlsruhe); Agar-Agar (Life Technologies, Eggenstein); Agarose (USB, Cleaveland, USA); Ammoniumacetat (Roth, Karlsruhe); Ammoniumpersulfat (Gibco BRL, Eggenstein); Ampicillin (Sigma Chemie, Deisenhofen); γ -³²P dCTP (Amersham, Braunschweig); Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe); Bacto Trypton (Difco, Hamburg); Borat (Sigma Chemie, Deisenhofen); Bromphenolblau (Sigma Chemie, Deisenhofen); Chloroform (Sigma Chemie, Deisenhofen); DAPI/Antifade, 4'6-Diamidino-2-phenylindol (Oncor, Gaithersburg, USA); Didesoxy NTPs (Invitrogen, ITC Heidelberg); Dimethylsulfoxid (Serva, Heidelberg); Diethylpyrocarbonat (Sigma Chemie, Deisenhofen), Dulbecco's mod. Medium + Natriumhydrogencarbonat + 1000 mg/l Glucose (Life Technologies, Eggenstein); Eisessig (Sigma Chemie, Deisenhofen); Ethylendiamintetraacetat (EDTA; Life Technologies, Eggenstein); Ethanol (Klinikapotheke); Ethidiumbromid (Sigma Chemie, Deisenhofen); Fixogum (Marabo, Tamm); Formaldehyd (Merck, Darmstadt); Formamid (Oncor, Gaithersburg, USA); Fötale Kälberserum (Greiner, Freckenhausen); Geneticin, (Life Technologies, Eggenstein); Hepes (Life Technologies, Eggenstein); Isopropanol (Merck, Darmstadt); Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt); Kunstharz Ag 501-x8 & BioRex® MSZ 501 (Biorad, Californien, USA); L-Glutamin (Life Technologies, Eggenstein); Magnesiumchlorid (Sigma Chemie, Deisenhofen); Magnesiumsulfat (Merck, Darmstadt); Mc Coy's 5A mit Zusätzen (Life Technologies, Eggenstein); MEM + Natriumhydrogencarbonat (Life Technologies, Eggenstein); Methanol (Sigma Chemie, Deisenhofen); Mineralöl (Sigma Chemie Deisenhofen); MOPS (Sigma Chemie, Deisenhofen); Natriumacetat (Merck, Darmstadt); Natriumcarbonat (Merck, Darmstadt); Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe); Natriumcitrat (Merck, Darmstadt); Natriumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt); Natriumdodecylsulfat (SDS; Sigma Chemie, Deisenhofen); Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt); Natriumphosphat (Merck, Darmstadt); Natriumpyruvat (Life Technologies, Eggenstein); N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED; Biorad, München); Opti Mem 1 mit Glutamax (Life Technologies, Eggenstein); Penicillin/Streptomycin (Life Technologies, Eggenstein); Propanol (Klinikapotheke), RPMI 1640 w/o Glutamin (Biochrom, Berlin); Roti Quant

(Roth, Karlsruhe); Salzsäure (Merck, Darmstadt); Tris-Base (Biorad, München); Trypsin 1:250 (Difco, Hamburg); 1 x Trypsin/EDTA (Seromed, Berlin); Tris (Merck, Darmstadt); Xylen Xyanol (Sigma Chemie, Deisenhofen)

Kits

BESS T-Scan (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA)
DNA Tissue Extraction (Qiagen, Hilden)
ECL Western Blot Detection, (Amersham, Buckinghamshire, England)
Effectene (Qiagen, Hilden)
Endo Free Qiaex Maxipräp (Qiagen, Hilden)
GFX Gelelution and DNA Purification (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Hot Wax OptiStart™ (Invitrogen, ITC, Heidelberg)
Lipofektamin (Life Technologies; Eggenstein)
Megaprime Labelling (Amersham, Braunschweig)
mRNA Isolation (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach)
Thermosequenase (Amersham, Braunschweig)
Qiaex Miniprep (Qiagen, Hilden)
Qia Shredder, (Qiagen, Hilden)
Random Prime It II Oligo Primed Labelling (Stratagene, Heidelberg)
RT-PCR (Perkin Elmer, Roche Mol. Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, USA)
Super Fect (Qiagen, Hilden)
TriFast (peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen)

Sonstige Materialien

1 ml-Spritzen, (B Braun, Melsungen); 15 ml Röhrchen (Greiner, Nürtingen); 50 ml Röhrchen (Greiner, Nürtingen); *chamber slides* (Nalge Nunc, Naperville, IL, USA); Deckgläser (IDS, Nidderau); Einfrierboxen (Nalgene); Einmalskalpelle (Dahlhausen, Köln); Hybond N+ Membranen (Amersham, Braunschweig); Injektionskanülen Sterican 0,45 x 25 mm (B Braun, Melsungen); Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden); Mörser und Pistill aus Porzellan (Labotec, Wiesbaden); Nitrocellulose Membranen (Amersham, Braunschweig); Objektträger (IDS, Nidderau); Petrischalen (Greiner, Nürtingen); Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg); Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml (Eppendorf, Hamburg); Röntgenfilme (Dupont, Bad Homburg); Screens RPN 1643

mit Verstärkerfolie (Amersham, Braunschweig); Whatman-Papier (Schleicher & Schüll, Daßel); Zellkulturflaschen T25 ,T75 und T125 (Nunc, Wiesbaden); Zellschaber (Nalge Nunc, Naperville, IL, USA);

Geräte

Bildverarbeitungssystem Cytovision 2.21 (Applied Imaging, England); CO₂ Inkubator (Biometra, Göttingen); Densitometer Easy Plus Rev. 3.16 (C) (Herolab, Wiesbaden); Digitalkamera (Cybertech, Hamburg); Elektrobloetter Fast Blot 014-100 (Biometra, Göttingen); Flachbettscanner MFS 12000 SP (Mustek, Neuss); Fluoreszenzmikroskop, (Leica); Heraeus Omnifuge 2.0 RS mit Rotor 2251 (Heraeus, Hanau); Flachbettgelkammern (Biorad, München); Gelkammer Minigel Twin (Biometra, Göttingen); Heraeus Biofuge 15 (Heraeus, Hanau); Heraeus Fresco (Heraeus, Hanau); Hochauflösendes Mikroskop Leitz Aristoplan (Leitz, Wetzlar); Hybridisierungsöfen (Biometra, Göttingen); Invertmikroskop (Hund, Wetzlar); LiCOR 4200 iR2 Sequencer mit Base ImagIR Software, Version 4 (MWG, Ebersberg); Phasenkontrastmikroskop Laborlux S (Leica, Bensheim); Photoaufsatz Orthomat E mit Kamera DX 0.32.E für Aristoplan (Leitz, Wetzlar); Photometer Pharmacia pH-Meter (Knick, Berlin); Spannungsgeber (Life Technologie, Eggenstein); REW 20 Rotor-Stator (Labotec, Wiesbaden); Sterilwerkbank (Antair BSK, Stade); TGGE Gelkammer mit Kühlsystem (Biometra, Göttingen); Tierisolator LFC 3-16 (Ebeco, Castrop-Rauxel); Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg); Transilluminator (Janker & Kunkel); Trockenschrank (Heraeus,Hanau); Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen); Uno Thermoblock (Biometra, Göttingen); Vortex VF2 (Janker & Kunkel); Wasserbad (Köttermann,Ützen-Henigsen); Ultrospec 2000 (Pharmacia, Schweden); Wasserbad (Janker & Kunkel);

Antikörper

Polyklonal Maus Anti-Human VHL, (Pharmingen, Heidelberg)

Monoklonal Maus Anti-Human VEGF, (R&D-Systems, Wiesbaden)

Ziege gegen Maus, FITC markiert, (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg)

Ziege gegen Maus, TRITC markiert, (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg)

Längenstandards

0,24-9,5 kb RNA-Marker (Life Technologies, Eggenstein)

100 bp DNA-Marker (Roche, Mannheim)

1 kb DNA-Marker (Roche, Mannheim)

QS DNA Quant Standard, 500 bp/ 1000 bp (Del Mar, Canada)

Rainbow Protein-Marker (Amersham, Buckinghamshire, England)

Enzyme

Bam HI (AGS, Heidelberg)

Eco RI (AGS, Heidelberg)

Klenov-Polymerase (Stratagene, Heidelberg)

MuLV-Reverse Transcriptase (Perkin Elmer, New Jersey, USA)

Pfu Polymerase (Stratagene, Heidelberg)

T4-Ligase (Roche, Mannheim)

Taq-Polymerase (Perkin Elmer, New Jersey, USA)

Tfl-Polymerase (Biozym, Hessisch Oldendorf)

Versuchstiere

CD 1 nunu-Mäuse, männlich (Charles River Deutschland, Sulzfeld)

CB17 SCID-Mäuse , männlich (Charles River Deutschland, Sulzfeld)

Kompetente Zellen

Escherichia coli XL-2 Blue, (Stratagene, Heidelberg)

Bakterienkulturmedium

LB-Medium: 5 g/l Bacto-Hefeextrakt

 10 g/l NaCl

 10 g/l Bacto-Trypton

pH 7,0

3.2 Nierenkarzinomzelllinien

Alle Nierenkarzinomzelllinien, die für diese Untersuchungen verwendet wurden, sind kommerziell erhältlich und bereits zytogenetisch charakterisiert worden. Außerdem sind alle Zelllinien in den letzten Jahren schon für molekulargenetische Untersuchungen des VHL-Gens genutzt worden, ihre VHL-Sequenz wurde - sofern vorhanden - bereits publiziert. Zelllinien können sich jedoch im Verlaufe ihrer *in vitro* Kultivierung durch Sekundärmutationen verändern, der Karyotyp und die Sequenz der zu untersuchenden Gene sollte darum von Zeit zu Zeit kontrolliert werden. Für die *in vitro* und *in vivo* Studien war es deshalb sehr wichtig, den Status des VHL Gens genau zu kennen, um aus den gewonnenen Daten die richtigen Rückschlüsse bezüglich der Funktion von pVHL ziehen zu können. Aus diesem Grund wurden die Zelllinien noch einmal mit geeigneten Methoden bezüglich eventueller VHL-Mutationen charakterisiert.

3.2.1 Zelllinien

KTCTL-26A (DKFZ, Heidelberg)

Zelltyp: humanes klarzelliges Nierenzellkarzinom

Literatur: Cytogenetic and growth factor gene analysis of a renal carcinoma cell line, Hogemann-I; Bock-S; Heppner-P; Petrides-PE; Cancer-Genet-Cytogenet. 1994 Dec; 78(2): 175-80

CAKI-1 (ATCC, Rockville, MD, USA)

Zelltyp: humanes klarzelliges Nierenzellkarzinom

Literatur: Fogh et al., J. Natl. Cancer Inst. 58: 209-214 (1977); idem, 59: 221-226 (1977)

CAKI-2 (DSMZ, Braunschweig)

Zelltyp: humanes klarzelliges Nierenzellkarzinom

Literatur: Fogh et al., J. Natl. Cancer Inst. 58: 209-214 (1977); Fogh et al., J. Natl. Cancer Inst., 59: 221-226 (1977)

- 786-0 (ATCC, Rockville, MD, USA)
Zelltyp: humanes Adenokarzinom
Literatur: Williams RD et al. In vitro cultivation of human renal cell cancer. I. Establishment of cells in culture. In Vitro 12: 623-627, Williams RD et al. In vitro cultivation of human renal cell cancer. II. Characterization of cell lines. In Vitro 14: 779-786, 1978, PubMed: 79066544
- A-498 (ATCC, Rockville, MD, USA)
Zelltyp: humanes klarzelliges Nierenzellkarzinom
Literatur: Giard et al., J. Natl. Cancer Inst. 51: 1417-1423 (1973)
- 293 (DSMZ, Braunschweig)
Cell Type: humane embryonale Niere, adenovirustransformiert
Literatur: Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59-72 (1977)

3.2.2 Zellkulturmedien

KTCTL-26A

RPMI 1640 w/o Glutamin

1 % Glutamin

10 % FCS

1 % P/S

Caki-1

McCoy`s 5A mit Zusätzen

10 % FCS

1 % P/S

Caki-2

McCoy`s 5A mit Zusätzen

10 % FCS

1 % P/S

786-O

RPMI 1640 w/o Glutamin

10 mM Hepes

1 mM Natriumpyruvat

10 % FCS

1 % P/S

A-498

MEM + NaHCO₃

10 % FCS

1 % P/S

293

Dulbecco`s Mod. Medium inkl. Natriumpyruvat + 1000 mg/ l Glucose

10 % FCS

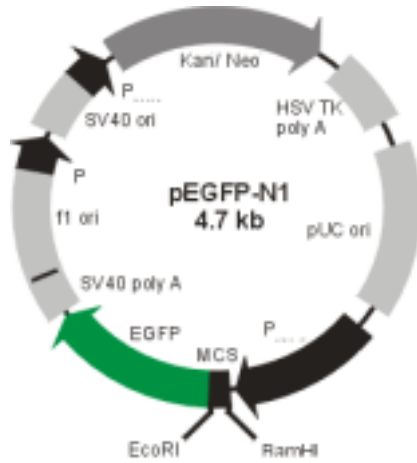
1 % P/S

Die Zellen wurden nach pH-Umschlag von rot zu gelb, d. h. in der Regel zweimal wöchentlich durch Mediumwechsel gefüttert. Einmal pro Woche wurden sie im Verhältnis 1:5 subkultiviert. Für die Transfektanten wurde eine Geneticinkonzentration von 600µg G418/ ml Medium ermittelt (s. Abb. 9). Handelt es sich um transfizierte Zellen, so ist im Weiteren unter „Medium“ jedesmal „Selektionsmedium“ inklusive Geneticin zu verstehen.

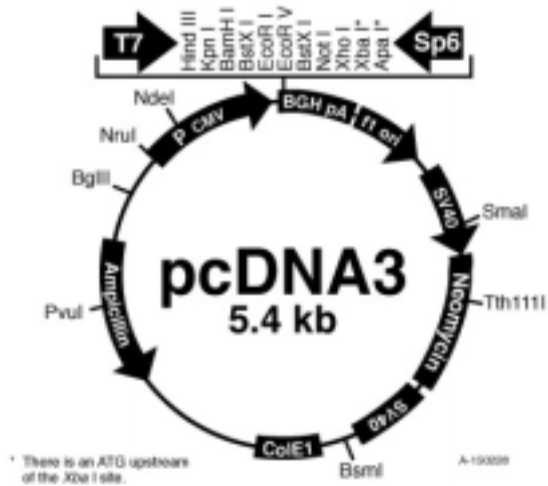
Bestimmung der optimalen Geneticinkonzentration: Die Zellen wurden in einer 6-well-Platte bis zu einer Konfluenz von 100 % kultiviert. Darauf wurde das flüssige Geneticin (50 mg/ ml) in verschiedenen Konzentrationen ins Medium gegeben. Das Wachstum wurde anschließend beobachtet und im Abstand von 8 Stunden die Konfluenz abgeschätzt. Diejenige Konzentration, bei der nach 24 Stunden eine Zelldichte von 50% vorlag, wurde als optimal eingestuft (156; 157).

3.3 Vektoren

pEGFP-N1, Clontech, Heidelberg



pCDNA3, Invitrogen, Heidelberg



3.4 Primer und PCR-Protokolle

Alle PCR-Reaktionen wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit je 10 mM dNTP-Mix und 2U DNA-Polymerase in einem 50 µl Reaktinsansatz durchgeführt.

Primer für Funktionsanalysen

β-Actin, (Amplimer Set, Clontech, Palo Alto, USA), 838 bp

5'-Primer: 5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'

3'-Primer: 5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGAATCCACATCTGC-3'

Perkin Elmer GenAmp10x PCR Puffer, Taq-Polymerase

95°C-3' > 35x (94°C-1' > 60°C-1' > 72°C-1') > 72°C-7' > 4°C-∞

GAPDH, (MWG, Ebersberg), 480 bp

5'-Primer: 5'-CAACTTTGGTATCGTGGAAGG-3'

3'-Primer: 5'-CCACCCTGTTGCTGTAGCC-3'

Perkin Elmer GenAmp10x PCR Puffer, Taq-Polymerase

95°C-3' > 35x (94°C-1' > 60°C-1' > 72°C-1') > 72°C-7' > 4°C-∞

c-fos, (Amplimer Set, Clontech, Palo Alto, USA), 612 bp

5'-Primer: 5'-AAGGAGAATCCGAAGGGAAAGGAATAAGATGGCT-3'

3'-Primer: 5'-AGACGAAGGAAGACGTGTAAGCAGTGCAGCT-3'

Perkin Elmer GeneAmp10x PCR Puffer, Taq-Polymerase

95°C-3' > 35x (94°C-1' > 60°C-1' > 72°C-1') > 72°C-7' > 4°C-∞

c-fos cds, (MWG, Ebersberg), 1152 bp

5'-Primer: 5'-CCGAATTCATGATGTTCTCGGGCT-3'

3'-Primer: 5'-GGGATCCAGAGGGCCAGCAGC-3'

Invitrogen „pH9,0“ 5x PCR Puffer + 2,5 mM MgCl₂ – Hot Wax Bead, Pfu-Polymerase

95°C-3' > 30x (94°C-1' > 62°C-1' > 72°C-90'') > 72°C-7' > 4°C-∞

c-myc, (Amplimer Set, Clontech, Palo Alto, USA), 479 bp

5'-Primer: 5'-TACCCTCTCAACGACAGCAGCTCGCCCAACTCCT-3'

3'-Primer: 5'-TCTTGACATTCTCCTCGGTGTCCGAGGACCT-3'

Perkin Elmer GenAmp10x PCR Puffer, Taq-Polymerase

95°C-3' > 35x (94°C-1' > 60°C-1' > 72°C-1') > 72°C-7' > 4°C-∞

c-myc cds, (MWG, Ebersberg), 1934 bp

5'-Primer: 5'-CCGAATTCATGCGAGGGTCTGGA-3'

3'-Primer: 5'-CTGGATCCAGCACAAAGAGTTCCGT-3'

Invitrogen „pH 8,5“ 5x PCR Puffer + 3,5 mM MgCl₂, - Hot Wax Bead, Pfu-Polymerase

95°C-3' > 30x (94°C-1' > 64°C-1' > 72°C-2') > 72°C-7' > 4°C-∞

VHL cds, (MWG, Ebersberg), 660 bp

5'-Primer: 5'-GGAGAATTCTTATGCCCCGGAGG-3'

3'-Primer: 5'-GGTGGATCCGTATCTCCCATCCG-3'

Invitrogen PCR-Optimizer „F“ 5x PCR Puffer + 1% DMSO, Pfu-Polymerase

95°C-3' > 32x (94°C-1' > 65°C-1' > 72°C-1') > 72°C-7' > 4°C-∞

VHLAS, (MWG Ebersberg), 660 bp

5'-Primer: 5'-CCCTTAAGGTCTGGATCGCGGAGGGA-3'

3'-Primer: 3'-TACCTAGGAATCTCCCATCCGTTG-5'

Invitrogen „pH 9,0“ 5x PCR Puffer + 1,5 mM MgCl₂ - Hot Wax Bead, Pfu-Polymerase

95°C-3' > 32x (94°C-1' > 60°C-1' > 72°C-1') > 72°C-7' > 4°C-∞

VEGF cds, (MWG, Ebersberg), 452, 584, 656, 707 bp

5'-Primer: 5'-GGAGAATTCGGATGAACTTTCTGC-3'

3'-Primer: 5'-GGTGGATCAACCGCCTCGGCT-3'

Perkin Elmer GenAmp 10x PCR Puffer, Pfu-Polymerase

95°C-3' > 32x (94°C-1' > 60°C-1' > 72°C-1') > 72°C-7' > 4°C-∞

GFP cds, (MWG, Ebersberg); 730 bp

5'-Primer: 5'-GGTCGCCACCATGGTGAGC-3'

3'-Primer: 5'-TACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'

Invitrogen PCR-Optimizer „F“ 5x Puffer, Pfu-Polymerase

95°C-3' > 32x (94°C-1' > 60°C-1' > 72°C-1') > 72°C-7' > 4°C-∞

pEGFP-N1 MCS, (MWG, Ebersberg), 136 bp

5'-Primer: 5'-CAGAGCTGGTTTAGTGAACCG-3'

3'-Primer: 5'-CTCCTCGCCCTTGCTCACC-3'

Perkin Elmer GenAmp 10x PCR Puffer, Pfu-Polymerase

95°C-3' > 32x (94°C-1' > 60°C-1' > 72°C-1') > 72°C-7' > 4°C-∞

Kan^R, (MWG, Ebersberg), 500 bp

5'-Primer: 5'-CCTGAATGAACTGCAAGACG-3'

3'-Primer: 5'-CCAACGCTATGTCCTGATAGC-3'

Invitrogen PCR-Optimizer „F“ 5x Puffer, Pfu-Polymerase

95°C-3' > 32x (94°C-1' > 60°C-1' > 72°C-1') > 72°C-7' > 4°C-∞

Primer für SSCP-Analyse, (MWG, Ebersberg)

Die PCR-Bedingungen sind in der Dissertation von C. Neuhaus beschrieben (159) .

Exon 1/I

5'-Primer: 5'-CCTCGCCTCCGTTACAACAG-3'

3'-Primer: 5'-TTCAGGGCCGTACTCTTCGA-3'

Exon 1/II

5'-Primer: 5'-TGGTCTGGATCGCGGAGGGAAT-3'

3'-Primer: 5'-GACTGCGATTGCAGAAGATGACCTGGG-3'

Exon 1/III

5'-Primer: 5'-GGCCCGTGCTGCGCTCGGTGAACT-3'

3'-Primer: 5'-CCCTGCTGGGTCGGGCCTAAGCGCCGGGCCCGT-3'

Exon 2

5'-Primer: 5'-GTGGCTCTTTAACAACCTTTGC-3'

3'-Primer: 5'-CCTGTACTIONTACCACAACAACCTTATC-3'

Exon 3

5'-Primer: 5'-GCCCTTCCAGTGTATACTCTG-3'

3-Primer: 5'-CAGAAATCTTCAATCTCCCAT-3'

Primer für F-BESS-Sequenzierung, (MWG, Ebersberg)

VHL Exon 1a

5'-Primer: 5'-FAM-AGCGCGTTCCATCCTCTACC-3'

3'-Primer: 5'-HEX-CGGCCTCCATCTCCTCCTCG-3'

Perkin Elmer 10x PCR Puffer, 1U Perkin Elmer Gold Taq, 50 µl Ansatz

94°C-5' > 40x (94°C-1' > 55°C-1' > 72°C-1') > 72°C-20'' > 4°C-∞

VHL Exon 1b

5'-Primer: 5'-FAM-TGAAGAAGACGGCGGGGAGG-3'

3'-Primer: 5'-HEX-TCAGACCGTGCTATCGTCCC-3'

Perkin Elmer 10x PCR Puffer, 1U Perkin Elmer Gold Taq, 50 µl Ansatz

94°C-5' > 40x (94°C-1' > 55°C-1' > 72°C-1') > 72°C-20'' > 4°C-∞

VHL Exon 2

5'-Primer: 5'-FAM-TGTGGCTCTTTAACAACCTTTGC-3'

3'-Primer: 5'-HEX-TATCCTGTACTIONTACCACAACAACC-3'

Perkin Elmer 10x PCR Puffer, 1U Perkin Elmer Gold Taq, 50 µl Ansatz

94°C-5' > 40x (94°C-1' > 55°C-1' > 72°C-1') > 72°C-20'' > 4°C-∞

VHL Exon3

5'-Primer: 5'-FAM-CTAGTCTGTCCTGAGGATTTGG-3'

3'-Primer: 5'-HEX-CTGAGATGAAACAGTGTAAGTTTC-3'

Perkin Elmer 10x PCR Puffer, 1U Perkin Elmer Gold Taq, 50 µl Ansatz

94°C-5' > 40x (94°C-1' > 55°C-1' > 72°C-1') > 72°C-20'' > 4°C-∞

Primer für genomische VHL-Sequenzierung, (MWG, Ebersberg)

VHL-Exon1

5'-Primer: 5'-GCCTCGCCTCCGTTACAACAG-3'

3'-Primer: 5'-CACCTGGATGTGTCCTGCC-3'

Perkin Elmer 10x PCR Puffer, 1U Perkin Elmer Gold Taq, 50 µl Ansatz

94°C-5' > 40x (94°C-1' > 60°C-1' > 72°C-1') > 72°C-7' > 4°C-∞

Nested M13

5'-Primer: 5'-CCTCCGTTACAACAGCCTACG-3'

3'-Primer: 5'-TGGATGTGTCCTGCCTCAAGG-3'

Perkin Elmer 10x PCR Puffer, 1U Perkin Elmer Gold Taq, 20 µl Ansatz

94°C-5' > 20x (94°C-1' > 58°C-1' > 72°C-1') > 72°C-10' > 4°C-∞

VHL-Exon2

5'-Primer: 5'-GGACGGTCTTGATCTCCTGACC-3'

3'-Primer: 5'-CATAACGTACAAATACATCACTTCC-3'

Tfl-Polymerase 20x PCR Puffer, 0,5 U Tfl-Polymerase, 50 µl Ansatz

95°C-4' > 35x (94°C-45'' > 60°C-30'' > 70°C-45'') > 70°C-20' > 4°C-∞

Nested M13

5'-Primer: 5'-GTCTTGATCTCCTGACCTCAT-3'

3'-Primer: 5'-TACAAATACATCACTTCCATTTTATTTATGG-3'

Tfl-Polymerase 20x PCR Puffer, 0,4 U Tfl-Polymerase, 20 µl Ansatz

95°C-5' > 20x (95°C-20'' > 58°C-20'' > 70°C-30'') > 70°C-3' > 4°C-∞

VHL-Exon3

5'-Primer: 5'-CCATCAGTAGTACAGGTAGTTG-3'

3'-Primer: 5'-CTGAGAATGAGACACTTTGAAAC-3'

Tfl-Polymerase 20x PCR Puffer, 0,5 U Tfl-Polymerase, 50 µl Ansatz

94°C-4' > 35x (94°C-45'' > 60°C-30'' > 70°C-45'') > 70°C-20' > 4°C-∞

Nested M13

5'-Primer: 5'-AGTAGTACAGGTAGTTGTTGGC-3'

3'-Primer: 5'-GAGAATGAGACACTTTGAAACTAAGG-3'

Tfl-Polymerase 20x PCR Puffer, 0,4 U Tfl-Polymerase, 20µl Ansatz

95°C-5' > 20x (94°C-20'' > 58°C-20'' > 70°C-30'') > 70°C-3' > 4°C-∞

Markierungs PCR für Sequenzierung

5'-Primer: 5'-IRD-800-TGTAAAACGACGGCCAGT-3'

3'-Primer: 5'-IRD-700-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

Thermosteuerase Kit- Premix

95°C-2' > 30x (95°C-15'' > 57°C-15'' > 70°C-15'') > 4°C-∞

3.5 Lösungen

Alle verwendeten Glas- und Metallgeräte wurden vor Gebrauch für 4 Stunden bei 180°C sterilisiert. Die verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit demineralisiertem Wasser aus der Reinstwasser-Anlage (Millipore, Wien, Österreich) angesetzt und bei 120°C und 1,2 bar für 20 Minuten autoklaviert oder - bei hitzeinstabilen Substanzen -sterilfiltriert (0,2 µm). Lösungen für die Zellkultur wurden durch eine Sterilkontrolle auf mögliche Kontaminationen überprüft.

TAE-Puffer

40 mM	Trisacetat
2 mM	EDTA

10 x MopsPuffer

0,2 M	3-[<i>N</i> -morpholino]propansulfonsäure
0,05 mM	NaOAc
0,01M	EDTA
ad 1000 ml DEPC-Wasser > pH 7,0	

20 x SSC

3 M	NaCl
0,3 M	Na-Citrat
ad 1000 ml DEPC-Wasser > pH 7,0	

Prä/Hybridisierungspuffer

0,5 M	NaH ₂ PO ₄
7 w/v%	SDS
1mM	EDTA
ad 1000 ml DEPC-Wasser > pH 7,2	

Waschpuffer für Nylonfilter

40 mM	NaH ₂ PO ₄
1 w/v%	SDS
ad 1000 ml DEPC-Wasser > pH 7,2	

DNA-Blaumarker

0,25%	Bromphenolblau
0,25%	Xylencyanol
30%	Glycerin

RNA-Blaumarker

0,1%	Bromphenolblau
0,1%	Xylencyanol
1 mM	EDTA
50%	Glycerin

Denaturierungspuffer

für SSCP-Proben:	95% Formamid
	10 mM NaOH
	0,05% Xylen Xyanol
	0,05% Bromphenolblau

10% Trenngellösung

für Western Blot	30% Acrylamid	2,0 m
	2% Bisacrylamid	0,8 ml
	Tris-HCl pH 8,8	1,2 ml
	SDS 10%	60 µl
	dH ₂ O	1940 µl
		Mischen
	TEMED	5 µl
	APS 10%	30 µl

12% Trenngellösung

für Western Blot	30% Acrylamid	2,4 ml
	2% Bisacrylamid	960 µl
	Tris-HCl pH 8,8	1,2 ml
	SDS 10%	60 µl
	dH ₂ O	1380 µl
		Mischen
	TEMED	5 µl
	APS 10%	30 µl

5% Sammelgellösung

für Western Blot	30% Acrylamid	410µl
	2% Bisacrylamid	150 µl
	Tris-HCl pH 6,8	500 µl
	SDS 10%	25 µl
	dH ₂ O	1425 µl
		Mischen
	TEMED	2,5 µl
	APS 10%	12,5 µl

Guanidinhydrochlorid 0,3 M in 95% Ethanol

Calciumphosphat 250 mM

Kaliumphosphat 500 mM

Tris-HCl 1,88M, pH 8,8

Tris-HCl 0,625M, pH6,8

SDS-Stammlösung 10%

SDS-Probenpuffer für Proteine

Bromphenolblaulsg.: 1% in Ethanol (wenigst abwägen und auf 1% mit Ethanol bringen)

10 ml Probenpuffer:

2 ml 0,625M Tris-HCl pH 6,8

2 ml 10% SDS-Lsg.

5 ml Glycerin

0,1 ml 1% Bromphenolblaulsg.

0,4 ml dH₂O

= 9,5 ml

Vor jedem Gebrauch wird unter dem Abzug ein Aliquot dieses Puffers mit 5% β-Mercaptoethanol versetzt

5 x Proteinlaufpuffer:

Tris base 25 mM

Glycin 192 mM

10% SDS 0,1%

ad 1L dH₂O; pH > 8,3

Protein Färbepuffer:

1,0 g Coomassie Brilliant Blau R 250

0,25 g Coomassie Brilliant Blau G 250

212 ml Ethanol

25 ml Methanol

50 ml Essigsäure

212 ml H₂O

ÜN unter Rühren lösen, über Faltenfilter abfiltrieren

Entfärbelsg.:

Schnelles Entfärben: 450 ml Ethanol

100 ml Essigsäure

450 ml dH₂O

Langsames Entfärben: 70 ml Essigsäure ad 1000 ml dH₂O

Transferpuffer:

1 x Laufpuffer der Elektrophorese 1:3 verdünnen

3.6 Methoden

Allgemein

Standardmethoden wurden, soweit nicht anders angegeben, nach Sambrook et al. durchgeführt und werden nicht weiter beschrieben (158).

3.6.1 Spektralphotometrische Messungen

Zur Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Reinheit von Plasmid-DNA-Lösungen wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm in Quarzküvetten ermittelt. Zur Bestimmung der Konzentration von Plasmid-DNA-Lösungen wurden folgende Richtwerte zugrundegelegt:

dsDNA: $1 A_{260}$ ca. 50 $\mu\text{g/ml}$

ss RNA: $1 A_{260}$ ca. 40 $\mu\text{g/ml}$

Dabei sollte der Quotient $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ für ausreichend reine Nukleinsäurelösungen zwischen 1,8 bis 2,0 liegen.

Die Konzentration von PCR-Produkten oder auch Plasmid-DNA-Lösungen wurde über Agarose-Gelelektrophorese durch Vergleich mit einem DNA-Standard bekannter Konzentration quantifiziert.

3.6.2 Isolation von RNA, DNA und Proteinen

Zur Isolation von RNA und Proteinen wurde ein kommerziell erhältliches Reagenz verwendet (TriFast). Dabei beruht die Extraktion von RNA auf der Phenol-Chloroform-Methode, die Proteine werden mit Isopropanol gefällt (158).

Die DNA wurde mit dem Tissue Kit von Qiagen gewonnen. Es wurde nach den Protokollen der Hersteller verfahren.

3.6.3 Zellkultur

Alle im folgenden beschriebenen Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C unter einer 5%igen CO₂-Atmosphäre. Dabei wurden Gewebekulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 cm² (T25), 75 cm² (T75) und 125 cm² (T125) eingesetzt. Bei *Monolayer*kulturen, wie z. B. adhärennten Nierenzellkarzinomzellen, erfolgte der Mediumwechsel nach pH-Umschlag des Mediums von rot zu gelb (pH 6,0), in der Regel zweimal wöchentlich. Das verbrauchte Medium wurde komplett abgesaugt, zu jeder Kultur wurden in Abhängigkeit der Größe der Zellkulturflasche 5 ml, 10 ml oder 20 ml frisches Medium gegeben.

Subkultivierung

Ist die gesamte Fläche der Kulturflasche mit Monolayerzellen bedeckt (100% Konfluenz), stellen adhärennte Zellen aufgrund von Kontaktinhibition ihre Proliferation ein und müssen passagiert werden. Dazu werden die Zellen in Suspension gebracht und dann nach Verdünnung in ein neues Kulturgefäß überführt. Zur mechanischen Ablösung der Zellen kann ein Zellschaber verwendet werden, mit dem die Zellen vom Boden abgelöst werden. Die Methode der Wahl, adhärennte Zellen zu subkultivieren, ist der Gebrauch von Trypsin bzw. eines Trypsin/EDTA-Gemisches. Trypsin und EDTA denaturieren die Tertiärstruktur der Adhäsionsproteine der Zellmembranen und verhindern damit die Anheftung an den Boden des Kulturgefäßes, bzw. führen zu einem Ablösen der Zellen. Eine zu hohe Trypsinkonzentration kann jedoch zu irreversiblen Schädigungen der Zellmembran führen. Da die Wirkung des Trypsins durch die im Medium vorhandenen Proteine stark beeinträchtigt wird, werden die Zellen vor der Subkultivierung mit 1 x PBS-Puffer gespült. Zu den Zellen wird für 30 Sekunden eine Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin; 0,02% EDTA) gegeben. Unter dem Phasenkontrastmikroskop kann beobachtet werden, wie sich unter leichtem Klopfen die Zellen ablösen. Nach Ablösen der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes, spätestens aber nach 5 Minuten, können die Zellen durch Spülen mit Medium oder PBS vollständig vom Untergrund abgelöst werden. Will man die Zellen passagieren, so nimmt man sie in einer definierten Menge an Medium auf und verteilt sie nach Bedarf in mehreren Zellkulturflaschen (etwa 20% Konfluenz).

Sollen die Zellen geerntet werden, so nimmt man sie in PBS auf und schließt sie durch eine Behandlung mit dem Qia *Shredder* auf.

Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Anzahl geernteter Zellen werden die trypsinierten und gewaschenen Zellen in 10 ml PBS aufgenommen. Daraus entnimmt man ein Aliquot von 10 μ l und gibt 90 μ l Trypanblau dazu. 5 μ l dieses Gemisches werden auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und im Mikroskop 10 Felder ausgezählt. Die gezählten Zellen (Z) rechnet man nun mittels der Gleichung: $((Z:5) \times 10^4) \times 12$ auf die Gesamtzahl der geernteten Zellen in 10 ml PBS hoch (157).

Kryokonservierung

Vitale Zellen können in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt werden. Die Zellen werden mit Einfriermedium (Kulturmedium mit 8,5% DMSO, Dimethylsulfoxid) eingefroren. DMSO verhindert die zu einer Zerstörung führende Ausbildung von Eiskristallen in den Zellen. Da DMSO allerdings auch zytotoxisch wirkt, müssen die Zellen möglichst schnell niedergefroren, bzw. aufgetaut werden. Die Zellen werden trypsiniert und für 5 Minuten bei 1000rpm (350g) sedimentiert. Anschließend werden sie in Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Zum schnellen Einfrieren mit gleichmäßiger Temperaturabsenkung werden mit Isopropanol gefüllte Einfrierboxen verwendet. Sie sind so konstruiert, daß sie bei einer Lagerung von -80°C 1°C pro Minute abkühlen. Nach 12 bis 24 Stunden bei -80°C werden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen

Das Auftauen der Zellen sollte möglichst schnell erfolgen.

Das aufzutauende Kryoröhrchen wird aus dem Stickstoff entnommen und sofort in ein 37°C Wasserbad überführt. Sobald sich die Zellen von der inneren Wand des *Kryotubes* ablösen, werden sie in eine mit 10 ml angewärmtem Medium gefüllte T25 Zellkulturflasche gegeben, sodaß die DMSO-Konzentration auf höchstens 1,5% verringert wird. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel.

3.6.4 SSCP-Analyse

Zur Suche von potentiellen der VHL-Mutationen der verwendeten Zelllinien wurde ein Mutationsscreening durch *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP)-Analyse durchgeführt.

Einzelstrang-DNA nimmt unter denaturierenden Bedingungen eine von ihrer Sequenz abhängige Konformation ein, die mit Temperatur und Laufpuffer variiert. Sie bestimmt die Mobilität in einem nativen Polyacrylamidgel. Unter geeigneten Bedingungen verändert schon der Austausch oder Verlust eines einzelnen Basenpaares das Laufverhalten eines DNA-Fragments. Damit gilt die SSCP als eine Methode, mögliche Punktmutationen zu detektieren. Die Empfindlichkeit der SSCP-Analyse liegt für Fragmente einer Größe von 200 bp bei etwa 80%. Aus methodischen Gründen wird Exon 1 des VHL-Gens anhand von 3 überlappenden Sequenzen (I-III) untersucht (159; 160).

Weitere Einzelheiten zur Analyse des VHL Gens bezüglich Herstellung des Gels, Probenvorbereitung, Aufbau der Gelkammer, Probenlauf und Anfärbung mit Silbernitrat können in der Dissertation von Neuhaus 1996 (159) nachgelesen werden.

3.6.5 Mutationsanalyse mit F-BESS

Eine neue Methode zur Detektion von DNA-Mutationen ist das *fluorescence-labelled base excision sequence scanning* (F-BESS). Dabei bedient man sich eines bestimmten Enzyms, der Uracil-N-Glycosylase. Detektiert werden alle Mutationen mit Beteiligung eines Thymidins (80 bis 90% aller Substitutionsmutationen). Ersetzt man dieses Thymidin statistisch mittels PCR durch Didesoxyuridintriphosphat, so erhält man nach einem nachfolgenden Verdau mit Uracil-N-Glycosylase eine bestimmte Anzahl von Fragmenten definierter Länge. Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern während der PCR kann man durch Vergleich mit einer ebenfalls markierten Wildtyp-DNA eine Veränderung des Bandenmusters durch DNA-Sequenzierung nachweisen (161).

3.6.6 DNA-Sequenzierung

Die zu sequenzierende DNA wird zunächst mit genspezifischen Primern amplifiziert. Es folgt eine *nested*-PCR des Amplifikats mit spezifischen Primern, die jeweils am 5'-Ende ein Sequenzfragment des M13 Phagen tragen. Dadurch ist es möglich, in der folgenden Sequenzierreaktion für verschiedene Gene die gleichen endmarkierten M13-Primer einzusetzen, was eine immense Kosteneinsparung mit sich bringt. Zudem erfolgt bei der *nested*-PCR eine zusätzliche Produktaufreinigung. Die eigentliche Sequenzierungsreaktion läuft nach der Methode von Sanger mit Didesoxynucleotiden ab (162). Die DNA wird mit einem LiCOR Automaten sequenziert und mit einer speziellen Software ausgewertet (Base ImagIR Software, Version 4; MWG, Ebersberg). Der LiCOR verwendet zur DNA-Detektion Infrarotfluoreszenzfarbstoffe, die in der Sequenzierungs-PCR mit Primer-Labeling angehängt werden. Es handelt sich dabei um ein duales System, d. h. es werden zwei Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge verwendet (Laser 1: 685 nm, Laser 2: 785 nm). Dadurch ist es möglich, zwei Farbstoffe gleichzeitig zu detektieren, was einen Probenlauf der 5'- und der 3'-Sequenz in einer Spur ermöglicht.

3.6.7 Vektorkonstrukte mit GFP als Reportergen

Die zu untersuchenden Gene wurden in das kommerziell erhältliche Plasmid pEGFP-N1 kloniert. Dieses Plasmid enthält ein optimiertes, ursprünglich aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* isoliertes Gen für das *green fluorescent protein* (GFP) (150; 151; 163). Das Genprodukt läßt sich durch FACS-Analyse oder mit dem Fluoreszenzmikroskop nachweisen. Es dient als Reportergen, beispielsweise zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und bei Verwendung als Fusionsprotein zwischen GFP und einem anderen Gen zur Aufklärung der intrazellulären Lokalisation des exprimierten Gens. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde der Vektor mit Eco RI und Bam HI restringiert. Damit trägt er die gleichen „sticky ends“, wie die durch PCR gewonnenen Gensequenzen von VHL und seinen potentiellen Targetgenen, die somit in pEGFP-N1 inkloniert werden können. Die PCR-Produkte wurden mit Primern amplifiziert, die eine Schnittstelle für Eco RI am 5'- und Bam HI am 3'-Ende erzeugen. Mittels einer Ligase (T4) werden die Fragmente nun jeweils in das restringierte Plasmid in orthograde Richtung hineinligiert.

3.6.8 Transformation

Für die Transformation kompetenter Zellen wurden 100µl der kommerziell erhältlichen Zellen auf Eis aufgetaut. Zu den Zellaliquots wurden etwa 10 µl des Ligationsansatzes, bzw. 0,1 bis 50 ng DNA hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Nach einer 25-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Zellen für 30 sec. einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Danach wurden die Zellen nochmals für 90 sec. auf Eis inkubiert und in 850 µl vorgewärmten (42°C bzw. 37°C) LB-Medium aufgenommen. Nun wurden die Zellen bei 300 rpm und 37°C für 45 min. bis eine Stunde geschüttelt und anschließend 100 bis 200 µl (1/10-2/10) dieser Zellsuspension auf den entsprechenden LB-Selektionsplatten ausgestrichen. Die restlichen Zellen (9/10-8/10) wurden bei 100g für 10 min. sedimentiert und in 50 µl LB-Medium aufgenommen und ausplattiert. Die transformierten Zellen wurden ÜN bei 37°C inkubiert.

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde parallel 1 ng *supercoiled* pBluescript Kontroll-DNA eingesetzt.

3.6.9 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Sind auf einer LB-Selektionsplatte ÜN Klone gewachsen, so müssen diese zunächst analysiert werden, um zu bestimmen, ob das Plasmid aufgenommen und exprimiert wird. Dazu setzt man eine 5 ml Kultur an, und weist das Plasmid nach Minipräparationsmethode mittels PCR nach. Als besonders kostengünstig und schnell hat sich die Isolation mit Isobutanol erwiesen (164), zur präparativen Gewinnung reiner Plasmid-DNA sind jedoch kommerziell erhältliche Kits zu empfehlen.

Hat man das eingebrachte Plasmid aus den Bakterien isoliert, so weist man z. B. mittels PCR das einklonierte Gen nach. Klone, die als positiv detektiert werden, werden nun ÜT in einer 5 ml Kultur kultiviert und ÜN in einer 100 ml Kultur vermehrt. Am nächsten Tag isoliert man die Plasmide mit Hilfe eines endotoxinfreien Maxi DNA-Plasmid Kits. Damit wird erreicht, daß die isolierten Plasmide zellkultursteril sind und für die Transfektion eukaryontischer Zellen verwendet werden können. Die isolierten Plasmide werden nun mittels gelelektrophoretischer und photometrischer Methoden auf Quantität und Qualität hin untersucht und anschließend bei -20° C gelagert.

3.6.10 Transfektion

Das Einbringen von Fremd-DNA in eine Zelle wird als Transfektion bezeichnet. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Liposomentransfektion verwendet. Dabei wird die einzubringende DNA in Liposomenmicellen eingeschlossen und danach in das Zellkulturmedium gegeben. Per Endocytose werden die Partikel von den Zellen aufgenommen und die DNA in den Zellkern geschleust. Im Fall einer stabilen Transfektion wird die eingebrachte DNA in das Genom der Wirtszelle integriert. Es wurden drei verschiedene kommerzielle Kits verwendet, und je nach Zelllinie und Vektor wurde ein optimales Transfektionsprotokoll empirisch ermittelt (Tab. 3). Dazu wurde die DNA zunächst für eine definierte Zeit mit den Liposomenpartikeln inkubiert. Je nach Lipofektionsreagenz wurde dabei nach den Herstellerangaben verfahren. Die Verwendung von *Effectene* erfordert einen zusätzlichen Schritt, bei dem die DNA zunächst mit einem *Enhancer* inkubiert wird, der eine starke Verknäuelung des Vektormoleküls bewirkt. Nach diesem Zwischenschritt sind die DNA Moleküle dann leichter in die Liposomen einzuschließen.

Die zu transfizierenden Zellen werden am Vortag in einer Dichte von 30 bis 40% ausgesät, sodaß sie zur Transfektion eine Konfluenz von 50 bis 80% erreicht haben, womit sie sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Damit ist sichergestellt, daß der intrazelluläre Stoffwechsel ein Aktivitätsmaximum aufweist, was eine beschleunigte endocytotische Aufnahme der Liposomen zur Folge hat. Die Zellen werden nun einmal mit PBS gewaschen und je nach Lipofektionsprotokoll mit serumhaltigem oder serumfreiem Medium versetzt. Die Liposomenemulsion wird zu den Zellen gegeben und die Zellen kultiviert. Am nächsten Tag wird ein Mediumwechsel durchgeführt und mit der Selektion begonnen. Die optimale Antibiotikumkonzentration wurde zuvor empirisch ermittelt. Dazu werden die Zellen in kleinen Kulturgefäßen ausplattiert und mit einer Verdünnungsreihe die optimale Menge an Geneticin ermittelt (s. Kap. 4.3). Für die in dieser Arbeit untersuchten Nierenkarzinomzelllinien stellte sich eine Konzentration von 600 µg Geneticin / ml Medium als geeignet heraus. Das entspricht der Menge Geneticin, die innerhalb von 24 Stunden 50% der nichtresistenten Zellen zum Absterben bringt (165).

Zur visuellen Abschätzung, welche Transfektionseffizienz erreicht wurde, wird ein Aliquot von 10^4 Zellen auf einem *chamberslide* ÜN kultiviert. Am folgenden Tag werden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und mit einem Deckglas versiegelt. Danach

läßt sich mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops das *green fluorescent protein* detektieren, was zur Ermittlung der Transfektionseffizienz dient.

3.6.11 Klonierung stabil transfizierter Zelllinien

Für die Analyse und Weiterverwendung transfizierter Zellen ist es wichtig, daß man auf Zellen eines Klones zurückgreifen kann. Nur so ist garantiert, daß Beobachtungen und Schlüsse aus den *in vitro* und insbesondere den *in vivo* Untersuchungen reproduziert werden können.

Die stabil transfizierten Zellen werden gezählt; dann stellt man die Konzentration der Zellen auf 3 Zellen pro 1800 µl Medium ein und plattiert je 200 µl in eine 96 well-Platte (Ø 5mm) aus. Damit erreicht man eine wahrscheinliche Verteilung von 1/3 Zelle pro well, bzw. eine einzelne Zelle in jeder dritten well. Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks wurde G418 in der geeigneten Konzentration zugegeben (s. o.). Die Klone werden nun expandiert und in grössere Kulturgefäße überführt. Nach ausreichender Zellvermehrung isoliert man die RNA und schätzt durch semiquantitative RT-PCR die Expressionsstärke des transfizierten Gens ab. Der Klon mit der stärksten Expression wird für weitere Untersuchungen verwendet. Für funktionelle Studien kann man auch Klone mit variablen Expressionsstärken des selben Genes untersuchen. Damit lassen sich Studien durchführen, die sich mit der Untersuchung intrazellulärer Konzentrationsunterschiede eines Genes befassen.

3.6.12 Xenotransplantationen

Für die Injektion von menschlichen Nierenkarzinomzellen in immunsupprimierte Mäuse werden 10^7 Zellen pro Versuchstier benötigt. Die Zellen wurden zunächst trypsiniert und dann in 800 µl PBS aufgenommen. Zur Bestimmung einer geeigneten Injektionsstelle ist bei SCID-Mäusen zunächst eine partielle Enthaarung der Tiere notwendig. Dazu befeuchtet man das Fell mit 70% igem Ethanol und rasiert links und rechts je eine Stelle von etwa 10 cm^2 mit einer sterilen Einmalrasierklinge frei. Bei Nacktmäusen entfällt diese Behandlung. Die Zellen werden nun in eine Spritze aufgezogen und zu gleichen Teilen links und rechts dorsal subkutan in die Flanke des Tieres injiziert. Das Tumorstadium wird täglich beobachtet. Hat sich ein tastbarer Tumor gebildet, so wird dieser einmal pro Woche mit einer Schiebelehre vermessen und seine Ausdehnung notiert. Das Tumorstadium bestimmt man über die Formel $\text{Länge} \times \text{Breite}^2 / 2$ (166; 167). Hat der Tumor eine ausreichende Größe erreicht, wird das

Versuchstier mit CO₂ narkotisiert und durch Überstrecken der Wirbelsäule getötet. Der Tumor wird freipräpariert und entnommen. Eine Hälfte des Tumors wird in flüssigem Stickstoff für die Gewinnung von RNA, DNA und Proteinen schockgefroren. Die andere Hälfte wird nochmals geteilt, dabei wird ein Teil für die histopathologischen Untersuchungen in gepuffertes Formalin (4% in PBS) eingelegt, der andere Teil in steriles PBS überführt. Dieses Gewebestück wird mit Hilfe eines sterilen Einmalskalpells mechanisch disaggregiert, danach für 10 Stunden mit Kollagenase-lösung inkubiert und wieder in Kultur genommen.

Die histopathologischen Untersuchungen wurden im Labor von Herrn Prof. Peter Schirmacher in der Abteilung Pathologie der Universitätsklinik Köln durchgeführt. Dort wurde das formalinfixierte Gewebe in Paraffinblöcke eingebettet und mit einem Mikrotom auf eine Stärke von 2 µm geschnitten. Es erfolgte eine histopathologische Begutachtung und Auswertung. Weiterhin erfolgte eine immunhistochemische Aufarbeitung mit einem Antikörper gegen VHL.

3.6.13 Reverse Transkription und PCR

Zur Analyse der intrazellulären mRNA-Konzentration wurde die semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Dazu wird die extrahierte Gesamt-RNA einer Probe zunächst mittels der Reversen Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Verwendet man während der RT Poly-A Primer, so erhält man eine cDNA, die sich aus den mRNA Molekülen gebildet hat. Die so gewonnene cDNA setzt man als *template* für die PCR ein. Nach Amplifikation und gelelektrophoretischer Auftrennung kann die ursprünglich vorhandene Menge an mRNA des untersuchten Gens in der Zelle abschätzen. Aufgrund von Alterung oder Kontaminationen kann RNA jedoch degradieren. Das kann Fehleinschätzungen bei der semiquantitativen Auswertung zur Folge haben. Aus diesem Grund werden in parallelen Ansätzen „housekeeping“ Gene (β-Actin, GAPDH) amplifiziert. Für die dargelegten Untersuchungen wurden deshalb zunächst nur diese beiden Gene auf einem Gel verglichen. Anhand der Bandenstärke wurde dann abgeschätzt, welche Menge der übrigen PCR-Ansätze letztendlich miteinander verglichen werden. Treten beispielsweise bei Probe A die „housekeeping“ Gene nur halb so stark auf, wie bei Probe B, so ist zu einer semiquantitativen Bestimmung von Probe A der Einsatz der doppelten Menge amplifizierter cDNA erforderlich. Dieses Vorgehen ist in Übereinstimmung mit entsprechend vergleichbaren Untersuchungen, die in der eingängigen Literatur beschrieben werden (142).

3.6.14 Western Blot

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (PAA). Die extrahierten Proteine werden zunächst quantifiziert. Dazu wird ein Aliquot von 10 µl entnommen und nach dem Roti Quant Protokoll der Firma Roth quantifiziert. Diese Methode stützt sich auf die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford, wobei die Proteine in einem Coomassie Reagenz aufgenommen und bei 600 nm photometrisch bestimmt werden. Für das PAA Gel werden gleiche Mengen der zu untersuchenden Proteine aufgetragen und in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Nach ausreichender Auftrennung wird das Gel entnommen und per Elektroblothing auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran kann nun zur weiteren Verwendung in Folie geschweißt bei 4°C aufbewahrt werden.

Die Antikörperhybridisierung und Detektion erfolgt nach den Herstellerangaben des ECL-Kits. Dabei wird die Membran in aufeinanderfolgenden Schritten gewaschen und mit einem Antikörper inkubiert. Der Antikörpernachweis erfolgt auf einem lichtempfindlichen Film durch eine Peroxidasereaktion.

3.6.15 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode, mit der man relativ schnell Proteine anfärben und nachweisen kann. Voraussetzung ist, daß man die zu untersuchenden Zellen zunächst auf einem Objektträger fixiert. Dazu werden 10^4 Zellen auf einem *chamber slide* ausplattiert und mit 2 ml Medium ÜN kultiviert. Am nächsten Tag sind die adhärennten Zellen auf der Grundfläche angewachsen. Das Medium wird entfernt, und die Zellen werden 2 x mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen zur Fixierung für 20 min. in eine Küvette mit eiskaltem Methanol überführt. Danach können sie bei -20°C für mehrere Monate gelagert werden.

Zur immunhistochemischen Untersuchung werden die Objektträger mit den fixierten Zellen für 10 min. in eiskaltem Aceton nachfixiert. Es folgt ein zweimal 5minütiges Waschen mit PBS. Nun werden je nach Bedarf und Zielsetzung die Antikörper dazugegeben. Nach jeder Antikörperhybridisierung werden die Objektträger zweimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper wieder zu entfernen.

Zuletzt werden die Zellen mit DAPI-*Antifade* gegengefärbt und mit einem Deckglas abgedeckt und versiegelt. Die fertigen Objektträger können bei -20°C für 2-3 Monate gelagert werden. Die Auswertung erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop.

4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung des VHL-Status der verwendeten NZK-Linien

4.1.1 SSCP-Analyse

Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft, welche Erkenntnisse bezüglich des VHL-Status der verwendeten Zelllinien aus der SSCP-Analyse gewonnen werden konnten. Zu sehen sind die Ergebnisse für die NZK-Linien KTCTL-26A und A-498, sowie eine Positivkontrolle (VHL-Wildtyp). Die Puffertemperatur während des Gellaufs betrug 15°C.

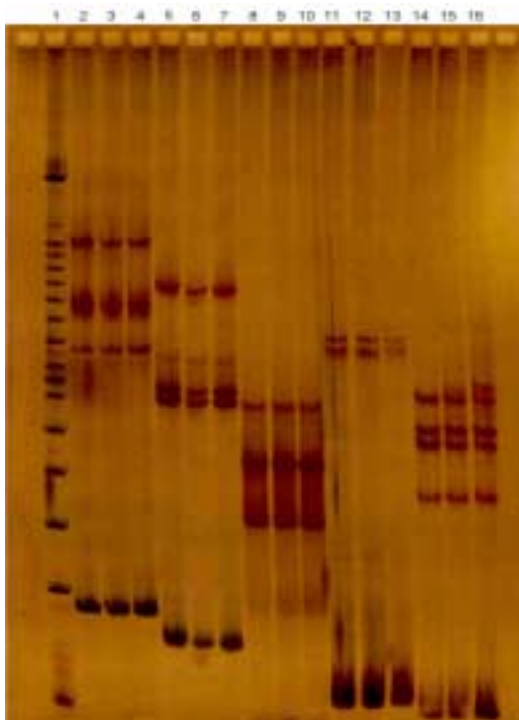


Abb. 6: SSCP-Analyse:

Spur 1 Marker, Spur 2-4 Exon 1/I,

Spur 5-7 Exon 1/II, Spur 8-10 Exon 1/III,

Spur 11-13 Exon 2, Spur 14-16 Exon 3;

Spur 2,5,8,11,14: KTCTL-26A

Spur 3, 6, 9, 12, 15: A-498

Spur 4, 7, 10, 13, 16: VHLwt

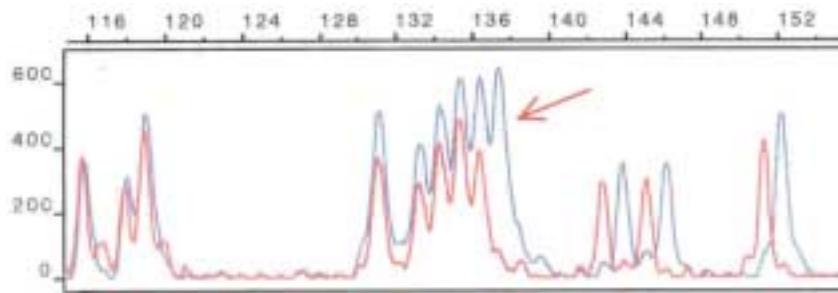
Die beiden Zelllinien zeigen ein Bandenmuster, das dem Muster der VHLwt-Kontrolle entspricht. Es sind keine VHL-Mutationen nachweisbar.

Die Abbildung zeigt ein einheitliches Bandenmuster. Zwischen der VHL-Wildtypkontrolle und den beiden Zelllinien (KTCTL-26A und A-498) konnte kein Unterschied im Laufverhalten beobachtet werden. Mit dieser Methode war in den Nierenkarzinomzelllinien keine VHL-Mutation nachweisbar. Das gilt auch für SSCP-Analysen, die unter veränderten Bedingungen durchgeführt wurden. Die Zelllinien wurden deshalb mit anderen Methoden auf VHL-Mutationen untersucht (s. Kap. 4.1.2 und 4.1.3).

4.1.2 Base Excision Sequence Scanning

Mit dieser Methode konnte ein Teil der Mutationen nachgewiesen werden (Tab. 2). Am Beispiel von zwei Zelllinien soll in der unteren Abbildung verdeutlicht werden, wie bei dieser neuen Methode (161) Mutationen im Elektropherogramm grafisch dargestellt werden.

a)



b)

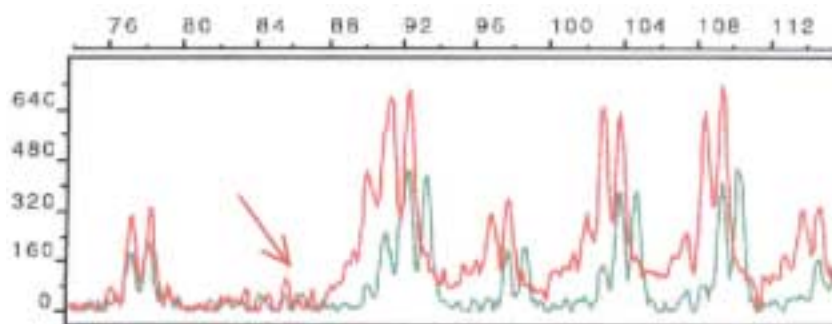


Abb. 7: Elektropherogramm der F-BESS-Analyse; Ausschnitte der Sequenzanalysen der Nierenkarzinomzelllinien a) KTCTL-26A (del T) und b) 786-0 (del C). Gezeigt wird das Sequenzdiagramm der beiden Zelllinien (rot) und der Wildtypkontrolle (blau/ grün).

Im oberen Teil der Abbildung (Abb. 7a) liegt die Mutation innerhalb eines Thymidinpentamers zwischen den Nucleotiden 5491 und 5495 der genomischen VHL-Sequenz (Leserichtung 5' > 3'), im unteren Teil (Abb. 7 b) ist eine Base (C oder G) zwischen den Nucleotiden 1023 und 1027 (Leserichtung 3' > 5') deletiert (vgl. Pfeile). Die Skalierungen am oberen und linken Rand der Grafiken sind methodisch bedingt.

4.1.3 DNA-Sequenzierung

Durch direkte DNA-Sequenzierung konnten schließlich alle VHL-Mutationen der verwendeten Nierenkarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Die Zelllinie Caki-1 wird in der Literatur als Wildtyplinie beschrieben (46). Der Klon, der für die vorliegenden Untersuchungen verwendet wurde, hat jedoch den distalen Abschnitt von Chromosom 3 verloren und trägt außerdem eine Punktmutation im VHL-Gen, die zu einem Stoppcodon führt. Damit ist durch Sekundärmutationen auch hier eine VHL defiziente Linie entstanden.

Zelllinie	publizierte Mutationen	F-BESS	Ergebnis der DNA-Sequenzierung
KTCTL-26A	del T, Codon 148, frameshift; (64)	del T, zw bp 5491-5495, Codon 148	bp 5491-5495, Ex 2, del T
Caki-1	VHL-Wildtyp, (46) (s. auch Text)	ins 1 bp, bp 917	bp 917, Ex 1, Ins A, truncation
Caki-2	subst A>T, Codon 177 nonsense; (70)	subst 1 bp, 8732, Codon 177	bp 8732, Ex 3, subst. A>T
786-0	del G, Codon 104 frameshift; (64)	del 1 bp, bp 1023-1027, Codon 104	bp 1024, Ex 1, del G
A-498	del 4 bp, Codon 147 frameshift; (64)	del 4 T, bp 5477 Codon 147	bp 5477, Ex 2, del 4 T
293	VHL-Wildtyp; (56)	VHL-Wildtyp	VHL-Wildtyp

Tab. 2: VHL-Mutationsanalyse der sechs Zelllinien, die für die vorliegenden Studien verwendet wurden.

Die Sequenzierung erfolgte mit einem LICOR-4200 Sequencer. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung, sowie die Ergebnisse der F-BESS-Sequenzierung (Kap. 4.1.2) und den entsprechenden Literaturangaben in Tabelle 2 zusammengefaßt worden.

4.2 Kontrolle der Transfektionskonstrukte

Die Expressionsvektoren mit den einklonierten Gensequenzen wurden mit Eco RI und Bam HI restringiert und auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 8 zeigt die Amplifikate der *multiple cloning site* (MCS) des Expressionsvektors pEGFP-N1. Sie beträgt im unveränderten Vektor mit den gewählten Primern 130 bp (Spur 2). Durch Insertion unterschiedlicher Sequenzen zwischen den Restriktionsschnittstellen für Eco RI und Bam HI ändert sich die Länge der amplifizierten Fragmente jeweils um die einklonierte Sequenz.

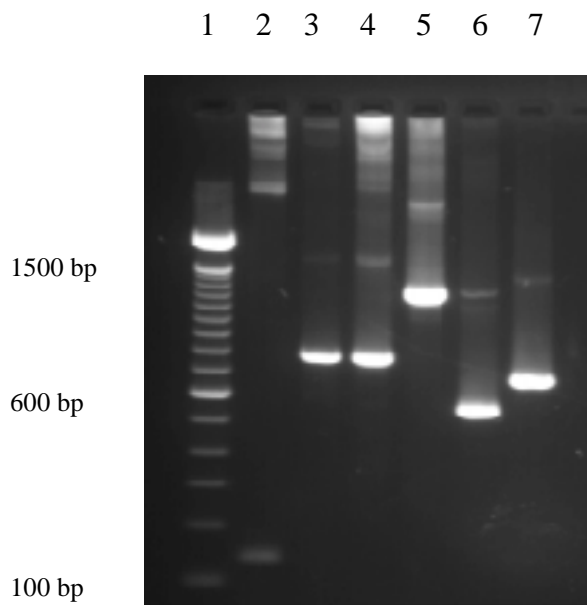


Abb. 8: Kontrolle der Vektorkonstrukte
Spur 1 Marker, 100 bp-Leiter
Spur 2 pEGFP-N1, MCS 130 bp
Spur 3: pEGFP-N1 + VHLcds, 790 bp
Spur 4: pEGFP-N1 + VHLAS, 790 bp
Spur 5: pEGFP-N1 + c-fos cds, 1282 bp
Spur 6: pEGFP-N1 + VEGF₁₂₁, 582 bp
Spur 7: pEGFP-N1 + VEGF₁₈₉, 786 bp

4.3 Bestimmung der optimalen Antibiotikumkonzentration zur Generierung stabil transfizierter Zelllinien

Die Ermittlung der optimalen Antibiotikumkonzentration (Geneticin, G418) zur Generierung stabiler NZK-Linien wird exemplarisch am Beispiel der Nierenkarzinomzelllinie KTCTL-26A dargestellt (Abb. 9). Für alle anderen Zelllinien, die für diese Arbeit verwendet wurden, ergaben sich ähnliche Wachstumskurven, so daß die Antibiotikumkonzentration von 600 µg G 418 pro ml Kulturmedium generell verwendet werden konnte.

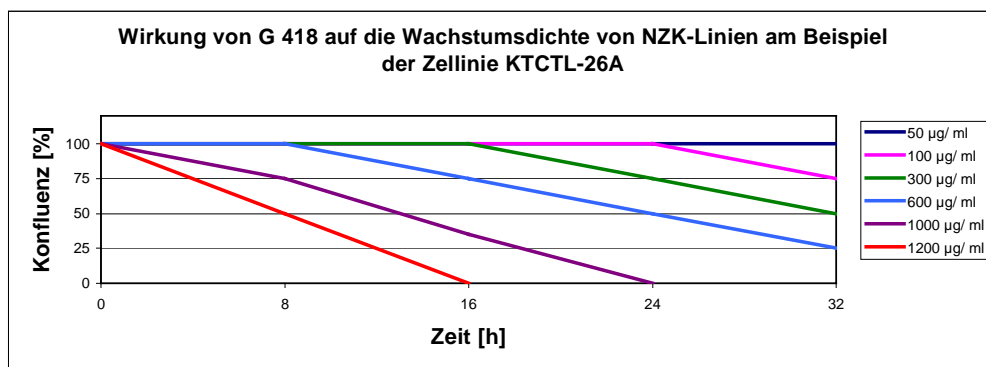


Abb. 9: Bestimmung der optimalen Geneticinkonzentration. Bei einer Konzentration von 600 µg /ml Medium überlebten nach 24 Stunden 50% der Zellen (blaue Linie) die Selektion. Diese Konzentration wurde für alle folgenden Untersuchungen zur Selektion der transfizierten Zellen verwendet.

4.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz

24 Stunden nach Zugabe der DNA-Liposomenkomplexe zu den Zellen wurden die Zellen trypsinisiert und in kleinere Kulturschalen überführt. Gleichzeitig wurden etwa 2500 Zellen auf einem *chamber slide* ankultiviert. Dieser kann weitere 24 Stunden später bezüglich der Transfektionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Zu diesem Zweck wurden jeweils 200 Zellen gezählt. Je nach Größe des Vektors und der verwendeten Zelllinie ergaben sich verschiedene Effizienzen. Außerdem zeigte sich eine Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom Lipofektionsreagenz. In den folgenden Tabellen sind die optimalen Kombinationen dargestellt:

a) KTCTL-26-A

Konstrukt	Transfektionsreagenz	Effizienz
PEGFP-N1	LF	20%
VHL	LF	20%
VHLAS	LF	20%
VEGF ₁₈₉	LF	15%
VEGF ₁₆₅	SF	5%
c-fos	SF	< 5%

b) Caki-1

Konstrukt	Transfektionsreagenz	Effizienz
PEGFP-N1	LF	20%
VHL	LF	20%
VHLAS	SF	15%
VEGF ₁₈₉	E	10%
VEGF ₁₆₅	E	10%
c-fos	E	< 5%

c) Caki-2

Konstrukt	Transfektionsreagenz	Effizienz
PEGFP-N1	E	20%
VHL	SF	15%
VHLAS	E	20%
VEGF ₁₈₉	E	10%
VEGF ₁₆₅	E	< 5%
c-fos	E	< 5%

d) 786-0

Konstrukt	Transfektionsreagenz	Effizienz
PEGFP-N1	E	25%
VHL	E	20%
VHLAS	E	20%
VEGF ₁₈₉	E	25%
VEGF ₁₆₅	SF	10%
c-fos	SF	5%

e) A-498

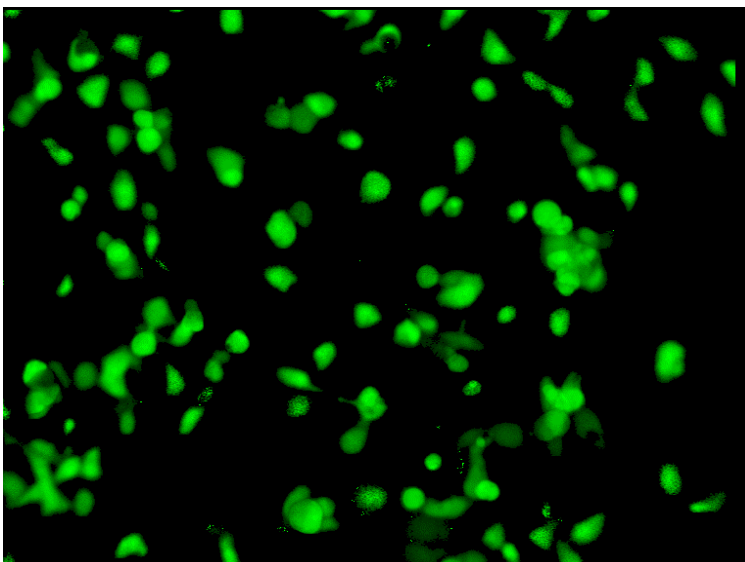
Konstrukt	Transfektionsreagenz	Effizienz
PEGFP-N1	E	5%
VHL	E	5%
VHLAS	E	5%
VEGF ₁₈₉	E	< 5%
VEGF ₁₆₅	E	< 5%
c-fos	E	< 5%

f) 293

Konstrukt	Transfektionsreagenz	Effizienz
PEGFP-N1	E	30%
VHL	LF	20%
VHLAS	E	20%
VEGF ₁₈₉	E	10%
VEGF ₁₆₅	E	5%
c-fos	E	< 5%

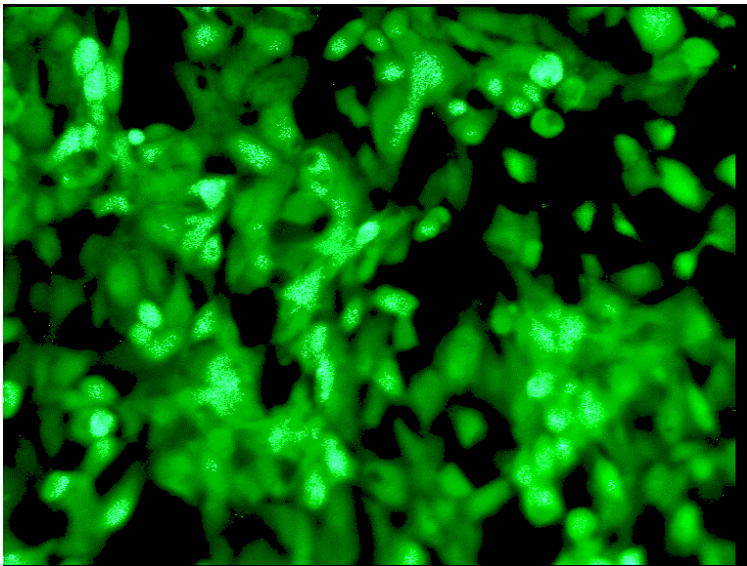
Tab. 3: optimale Transfektionsbedingungen der Zelllinien; Das optimale Transfektionsreagenz wurde für jede Zelllinie empirisch bestimmt. Die Effizienz wurde durch Auszählen des prozentualen Anteils fluoreszierender Zellen bestimmt.

Die folgende Abbildung zeigt die Expression des GFPs im Fluoreszenzmikroskop. Durch Auszählen von positiven und negativen Zellen konnte die Transfektionseffizienz leicht bestimmt werden. Dazu wurden zunächst unter Weißlicht alle Zellen im Okularausschnitt gezählt, danach mit einem FITC-Filter bei 488 nm der Anteil der grün fluoreszierenden Zellen bestimmt.



*Abb. 10:
Expression des green fluorescent protein
Die Aufnahme zeigt eine konfluente Kultur der NZK-Zelllinie KTCTL-26A.
Die Transfektionseffizienz entspricht in dieser Abbildung etwa 20%;*

Während einer 48 stündigen Inkubation mit Geneticinhaltigem Medium erfolgte eine Elimination der nichttransfizierten Zellen. Die verbleibenden, vitalen Zellen wurden nun vereinzelt in 96-well plates überführt und kultiviert. Diese Vermehrung kann bis zu 2 Wochen in Anspruch nehmen, da solitäre Zellen nur sehr schlecht proliferieren und gelegentlich das transfizierte Gen wieder aus dem Genom eliminiert wird. Nach ausreichender Zellvermehrung hatten, wurden sie in eine kleine Kulturflasche überführt; der nun vorliegende Klon wurde erneut auf GFP-Expression überprüft. Dabei zeigte sich nun eine einheitliche Grünfärbung der Zellen (Abb. 11).



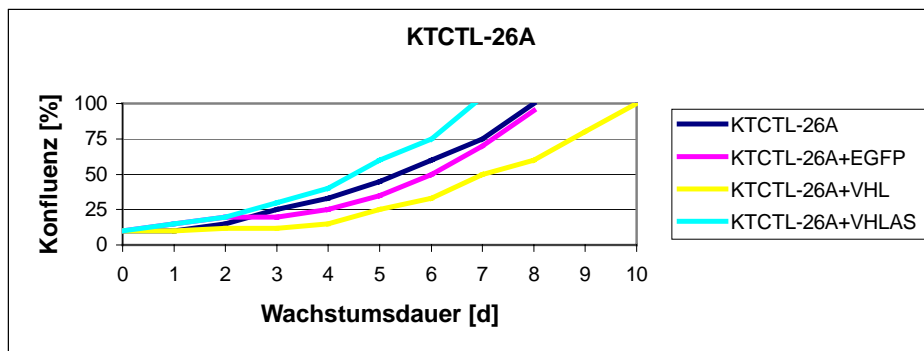
*Abb. 11:
konfluente Kultur
der NZK-Linie
KTCTL-26A,
stabil transfiziert
mit homogener
GFP-Expression;*

4.5 *In vitro* Studien

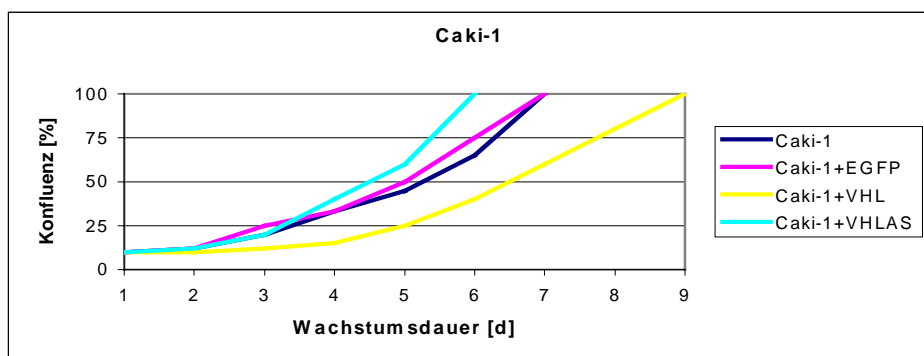
4.5.1 Änderung des *in vitro* Wachstumsverhaltens der NZK Linien

Durch die Expression der transfizierten Gene änderte sich das Wachstumsverhalten der Zellen. Generell wirkte sich die Transfektion von VHL negativ, die Transfektion von VEGF positiv auf die Teilungsaktivität aus. Die folgenden Grafiken (Abb. 12 a-f) veranschaulichen die Wirkung der Transfektionen auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien. Dargestellt werden die Beobachtungen für Transfektionen mit dem „leeren“ Vektor“ EGFP-N1 (pink), sowie VHLcds (gelb) und VHLAS (hellblau). Vergleichend wird auch die Teilungsgeschwindigkeit der unveränderten Zelllinie dargestellt (blau). Veränderungen der Wachstumsgeschwindigkeit nach Transfektion mit VEGF waren im *in vitro* Modell nicht zu detektieren. Deshalb wurde auf die Darstellung der Wachstumskurven in den Diagrammen verzichtet.

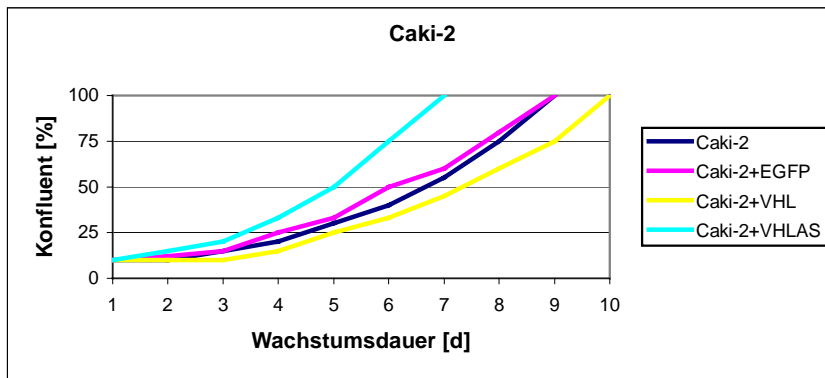
a)



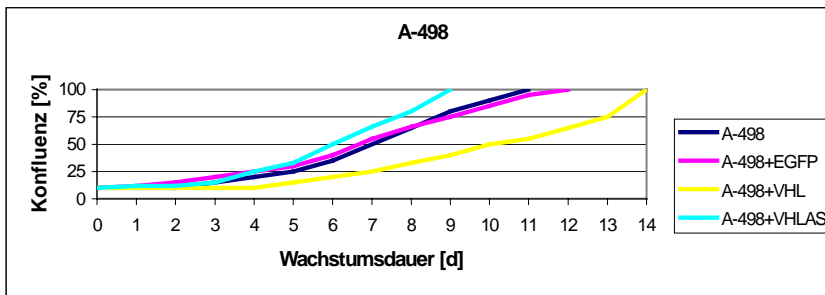
b)



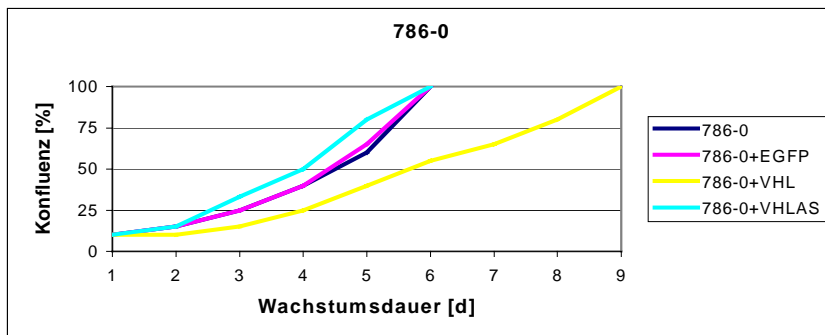
c)



d)



e)



f)

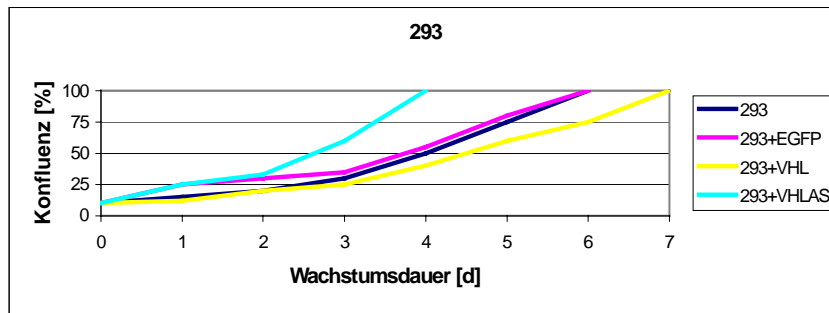


Abb. 12: Auswirkung der Transfektion auf das *in vitro*-Zellwachstum der Nierenkarzinomzelllinien. Alle Diagramme zeigen, daß die Transfektion von VHLcds die Proliferation verlangsamt, durch das Einbringen des VHLAS-Konstruktes kommt es dagegen zu einer verstärkten Zellteilungsrate.

Es wird deutlich, daß die Transfektion der VHL Sequenz das Wachstum in allen Fällen verlangsamt. Der „leere“ Vektor, mit ausschließlicher Expression von GFP, übt keinen Einfluß auf das Wachstumsverhalten der Zelllinien aus. Die Transfektion von VHLAS beschleunigt die Proliferation vor allem bei der VHL-Wildtypelinie 293. Die anderen 5 Zelllinien weisen eine nahezu unveränderte Wachstumskinetik nach Transfektion von VHLAS auf. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß dem mutierten VHL-Protein ohnehin keine, bzw. nur eine verminderte Funktion zukommt und eine Verringerung der intrazellulären VHL-mRNA-Konzentration keine Wirkung zeigt. Die Einführung der *coding sequences* von c-fos und VEGF121, führten zu keinen reproduzierbaren Wachstumsveränderungen in den Zelllinien. Aus diesem Grund sind in diesem Teil der Arbeit alle weiteren Versuche mit diesen beiden Konstrukten nicht weiter verfolgt worden.

4.5.2 Expressionsveränderung

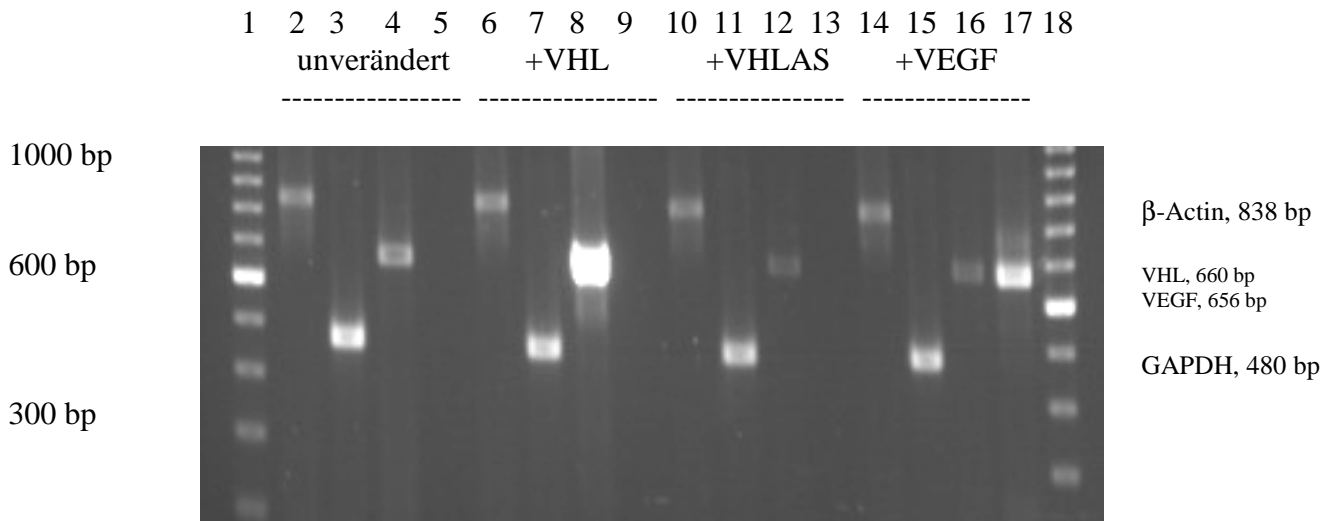


Abb.13: Veränderung der VHL- und VEGF-Expression in der Zelllinie Caki-2 nach Transfektion mit VHL, VHLAS und VEGF. Zu sehen sind die PCR-Produkte der unveränderten Zelllinie (2-5), sowie nach Transfektion mit VHL (6-9), mit VHLAS (10-13) und mit VEGF₁₈₉ (14-17). Spur 1 und 18 100 bp-Leiter/ β-Actin: 2, 6, 10, 14/ GAPDH: 3, 7, 11, 15/ VHL: 4, 8, 12, 16/ VEGF: 5, 9, 13, 17;

Wie in der oberen Abbildung zu erkennen ist, steigt die Expression von VHL nach Transfektion mit der VHLcds drastisch an (Spur 8). Die Transfektion von VHLAS reduziert die zelluläre fehlerhafte „VHL-mRNA“ (Spur 12). Auf das Wachstumsverhalten der Zelllinie wirkt sich das jedoch nicht aus, da ein aus dieser mRNA resultierendes fehlerhaftes Genprodukt seine biologische Funktion nicht mehr ausüben kann. Die Transfektion von VEGF bewirkt einen Anstieg der VEGF-mRNA (Spur 17) bei gleichzeitiger Reduktion der VHL-mRNA (Spur 16), ein Hinweis auf die mögliche Wechselwirkung der beiden Gene.

Die nachfolgenden Tabellen (Tab. 4 und 5) zeigen im Einzelnen die Expressionsveränderungen der untersuchten Gene nach Transfektion in die Zelllinien.

KTCTL-26A	VHL	VEGF
unverändert	+	+
VHLcads	+++	(+)
VHLAS	-	+
VEGF	(+)	++
Caki-2	VHL	VEGF
unverändert	+	(+)
VHLcads	+++	-
VHLAS	-	(+)
VEGF	-	+
A-498	VHL	VEGF
unverändert	+	-
VHLcads	+++	-
VHLAS	-	-
VEGF	-	+

Caki-1	VHL	VEGF
unverändert	-	-
VHLcads	++	-
VHLAS	-	-
VEGF	-	++
786-0	VHL	VEGF
unverändert	+	++
VHLcads	+++	(+)
VHLAS	-	+++
VEGF	(+)	+++
293	VHL	VEGF
unverändert	++	+
VHLcads	+++	(+)
VHLAS	(+)	++
VEGF	+	++

Tab. 4: Zusammenfassung der Expressionsveränderungen von VHL und VEGF in den untersuchten sechs Nierenkarzinomzelllinien nach Transfektion mit Konstrukten aus dem Expressionsvektor *pEGFP-N1*. Bewertet wurden jeweils die Veränderungen nach Transfektion von VHLcads, VHLAS und VEGF gegenüber der unveränderten Zelllinie. (Expression: +++ sehr stark / ++ stark / + schwach / (+) sehr schwach / - keine Expression)

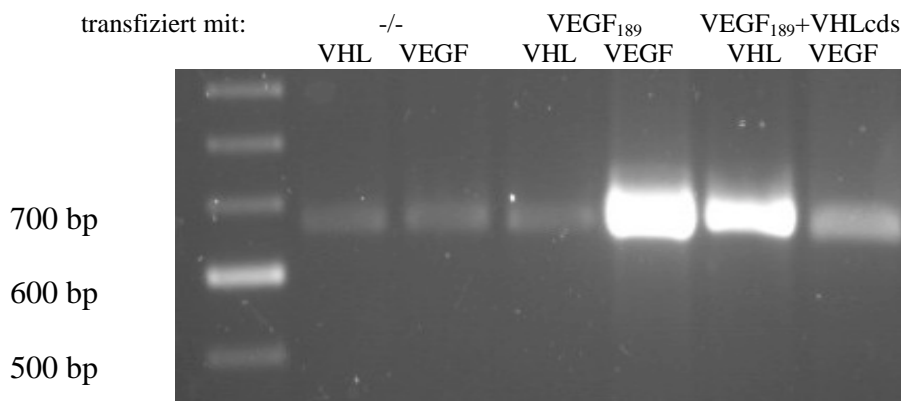
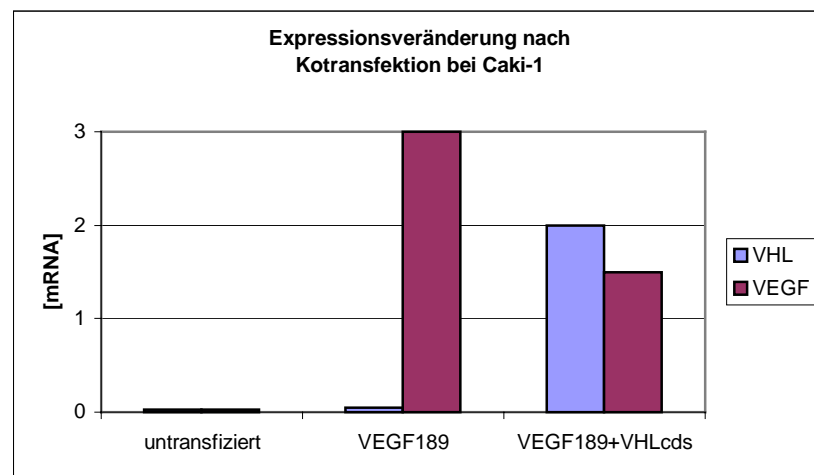
Vergleichende Transfektionen mit einem anderen eukaryontischen Expressionsvektor (pcDNA3) erbrachten die gleichen Resultate. Dieser Versuchsansatz wurde repräsentativ mit vier Zelllinien durchgeführt (KTCTL-26A, Caki-1, Caki-2 und 786-0). Nach Transfektion mit der kodierenden Sequenz für die VHL-cDNA stieg die Expression der VHL-mRNA in den Zellen an. Gleichzeitig kam es zu einer Abschwächung der VEGF-mRNA, sofern diese in der unveränderten Zelllinie vorlag. Umgekehrt reduzierte das Einbringen der VEGF kodierenden Sequenz die Expression von VHL.

KTCTL-26A	VHL	VEGF	Caki-1	VHL	VEGF
unverändert	+	+	unverändert	-	-
VHLcads	++	+	VHLcads	+	-
VHLAS	+	++	VHLAS	-	-
VEGF	(+)	+++	VEGF	-	+
Caki-2	VHL	VEGF	786-0	VHL	VEGF
unverändert	+	(+)	unverändert	+	++
VHLcads	+++	+	VHLcads	+++	-
VHLAS	-	(+)	VHLAS	-	++
VEGF	-	+	VEGF	(+)	++

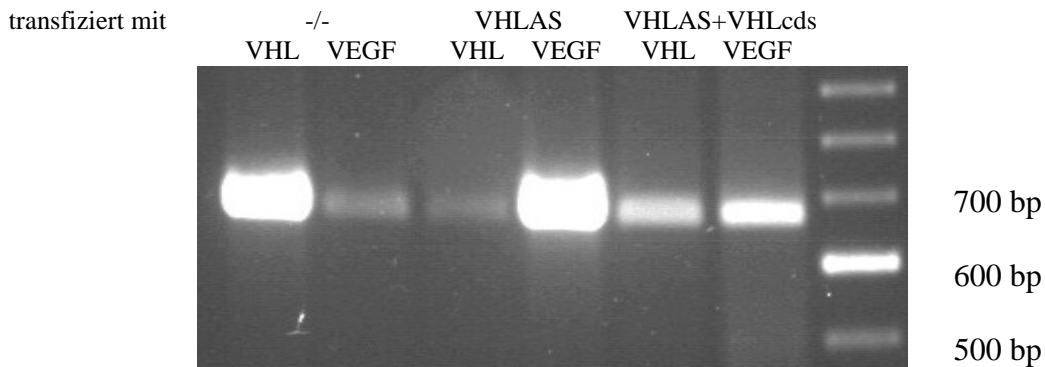
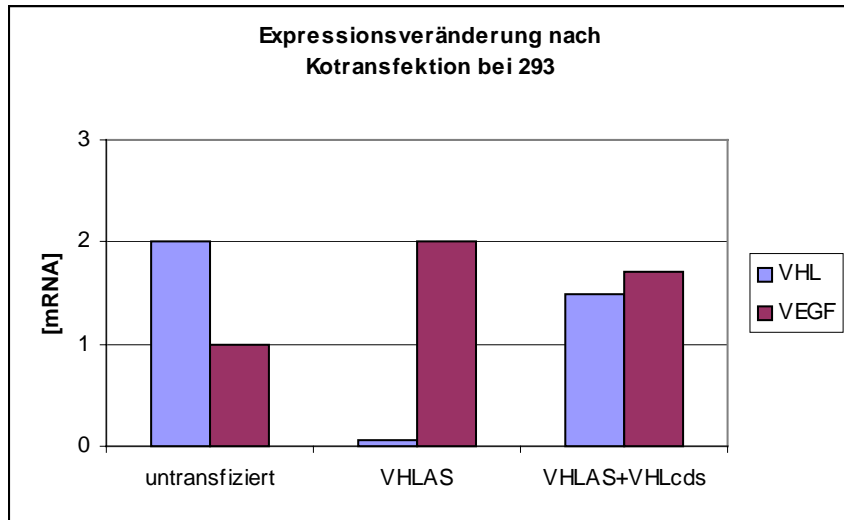
Tab. 5: Expressionsveränderungen von VHL und VEGF nach Transfektion mit pcDNA3; die vier Zelllinien zeigen nahezu die gleichen Veränderungen, wie nach Transfektion mit EGFP. (Expression: +++ sehr stark / ++ stark / + schwach / (+) sehr schwach / - keine Expression)

4.5.3 Kotransfektionen

Zur Verifizierung der beschriebenen Ergebnisse wurde eine Reihe von Transfektionen durchgeführt, bei der zunächst ein stabiler Klon generiert wurde, der danach zusätzlich mit einem anderen Gen transfiziert wurde. So wurde beispielsweise in die VHL-defiziente Zelllinie Caki-1 zunächst die kodierende Sequenz für VHL transfiziert und die Expressionsveränderungen von VHL und VEGF beobachtet. Nachträglich wurde der Klon mit VEGF₁₈₉ transfiziert und erneut mittels semiquantitativer RT-PCR auf Expressionsunterschiede untersucht. Vergleicht man die intrazelluläre mRNA-Konzentration von VEGF in beiden Klonen, so stellt man fest, daß sich die zusätzliche Expression von VHL negativ auf VEGF auswirkt (Abb. 14 a). Die Transfektion von VHLAS in die Zelllinie 293 führt zu einer Abnahme der VHL-mRNA-Konzentration und zu einem Anstieg der VEGF-mRNA. Sekundär eingebrachte VHL-mRNA läßt die Konzentration der zellulären VEGF-mRNA Konzentration wieder absinken (Abb. 14 b).



a)



b)

Abb. 14: a) Expressionsveränderungen bei Caki-1 (1. Doppelsäule: unveränderte Zelllinie); Die Zelllinie wurde zunächst mit VEGF₁₈₉ transfiziert (2. Doppelsäule), danach wurde der Klon mit VHLcgs transfiziert, was zu einer Verminderung der VEGF-mRNA führte (3. Doppelsäule). b) Expressionsveränderungen bei 293 (1. Doppelsäule: unveränderte Zelllinie); zuerst wurde mit VHLAS transfiziert, woraus eine Verringerung der Konzentration von VHL-mRNA resultierte (2. Doppelsäule). Darauf erfolgte eine zusätzliche VHLcgs-Transfektion, die einen Anstieg der VHL-mRNA bei gleichzeitiger Verringerung der VEGF-mRNA zur Folge hatte (3. Doppelsäule). Die Skalierung der y-Achse entspricht in beiden Diagrammen den visuell abgeschätzten Konzentrationsunterschieden. Unter der grafischen Darstellung ist jeweils ein repräsentativer Gelausschnitt gezeigt.

Nach diesem Schema erfolgten weitere Kotransfektionen, deren Ergebnisse ausnahmslos auf eine direkte Interaktion von VHL und VEGF hinweisen. Die VEGF-mRNA stieg oder sank umgekehrt proportional zur VHL-Konzentration. Wenn VHL-mRNA durch VHLAS-mRNA blockiert wurde kam es dagegen zu einer Verstärkung der VEGF-Expression.

4.6 *In vivo* Studien

Nach anfänglichen Parallelversuchen zwischen SCID-Mäusen, Nacktmäusen und bestrahlten Nacktmäusen zeigte sich, daß die humanen Tumorzellen am besten in den SCID-Mäusen heranwachsen. Aus diesem Grund wurden die weitergehenden Versuche nur mit SCID-Mäusen durchgeführt.

Die folgende Grafik verdeutlicht die Unterschiede im Zellwachstum in den verschiedenen Versuchstierstämmen am Beispiel der Zelllinie 786-0. Der Versuch erfolgte als Parallelansatz mit je drei Tieren.

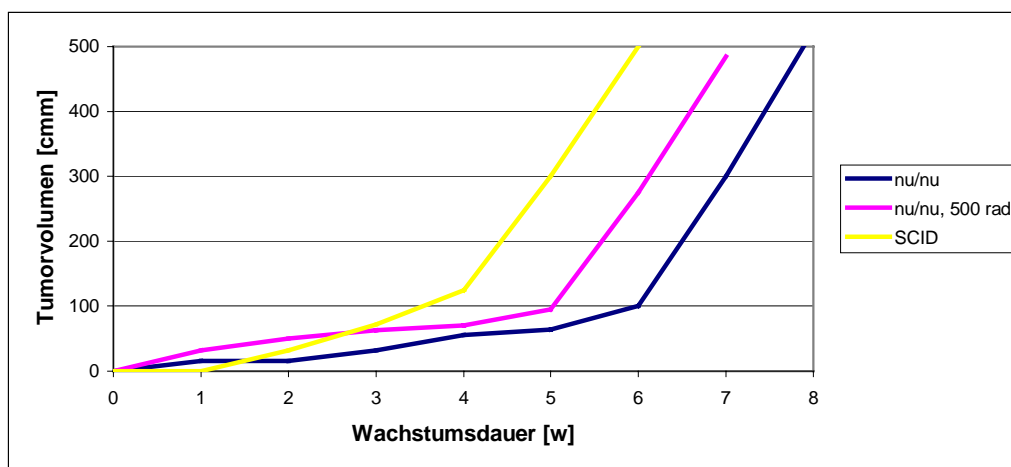
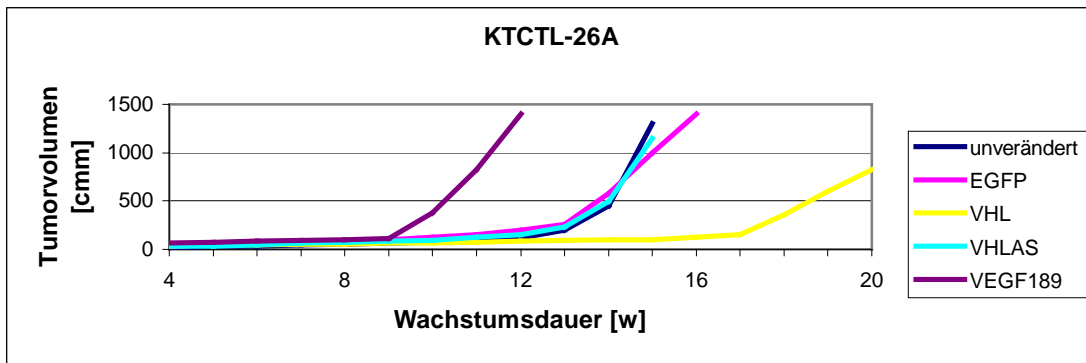


Abb. 15: vergleichendes Wachstum der injizierten humanen Nierenkarzinomzellen in immunsupprimierte Mäuse. Am schnellsten wachsen die Tumoren bei SCID-Mäusen, die Bestrahlung von Nacktmäusen (nu/nu_{rad}) hat ein beschleunigtes Zellwachstum gegenüber unbestrahlten Nacktmäusen (nu/nu) zur Folge.

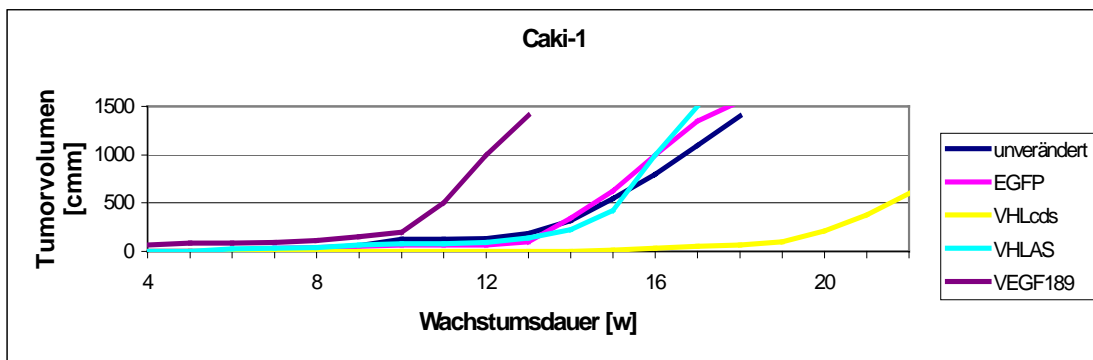
4.6.1 Änderung des *in vivo* Wachstumsverhaltens der NZK Linien in den Versuchstieren

Jede Zelllinie wurde an 4 Mäusen getestet. Den Versuchstieren wurden die Tumorzellen der unveränderten Nierenkarzinomzelllinien in beide Flanken injiziert. Somit sind jeweils acht Tumoren in die unten aufgeführten Grafiken (Abb. 16) eingegangen. Dieselbe Anzahl Tumoren mit transfizierten Zellen sind für die Auswertung verwendet worden. Die folgenden Diagramme zeigen die Auswirkungen der Transfektionen auf das *in vivo* Wachstumsverhalten der Zellen in SCID-Mäusen.

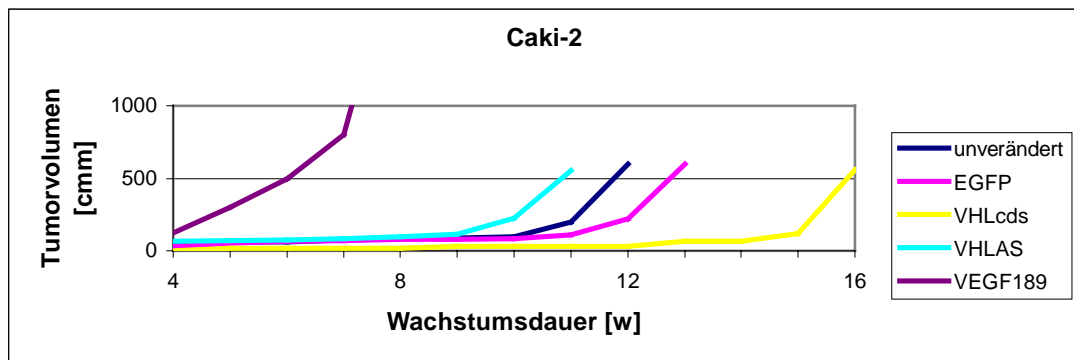
a)



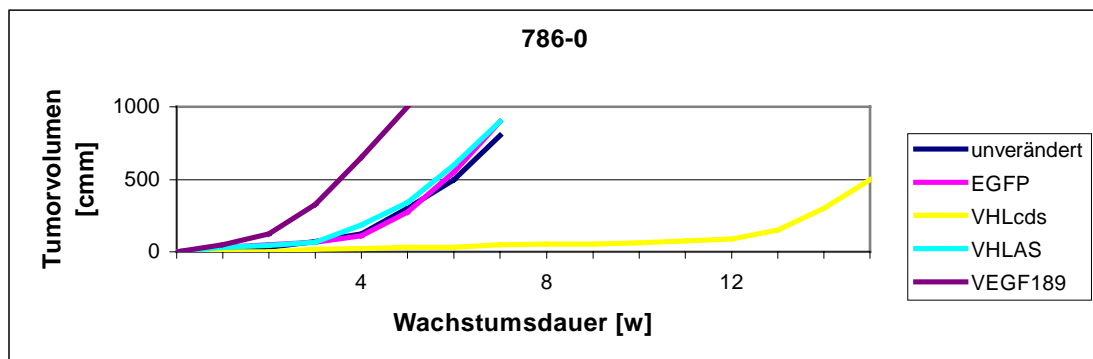
b)



c)



d)



e)

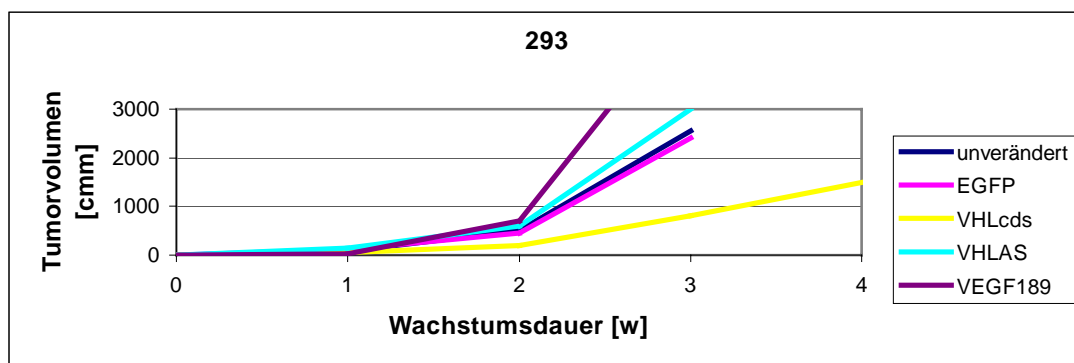


Abb. 16: Auswirkung der Transfektion auf das *in vivo*-Zellwachstum;

Auch hier wird eine starke Verlangsamung des Tumorwachstums nach Transfektion von VHL deutlich. Der Leervektor beeinflusst die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors nicht, jedoch kommt es zu einer gesteigerten Wachstumsrate nach Transfektion von VEGF.

Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen VEGF-Expression und beschleunigtem Tumorwachstum lieferten auch die makroskopischen Befunde der entnommenen Tumoren.

Bei VEGF transfizierten Zellen lassen sich Tumoren mit wesentlich stärkerer Vaskularisierung erkennen. Die dadurch bessere Versorgung des Tumors scheint eine Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit zur Folge zu haben.

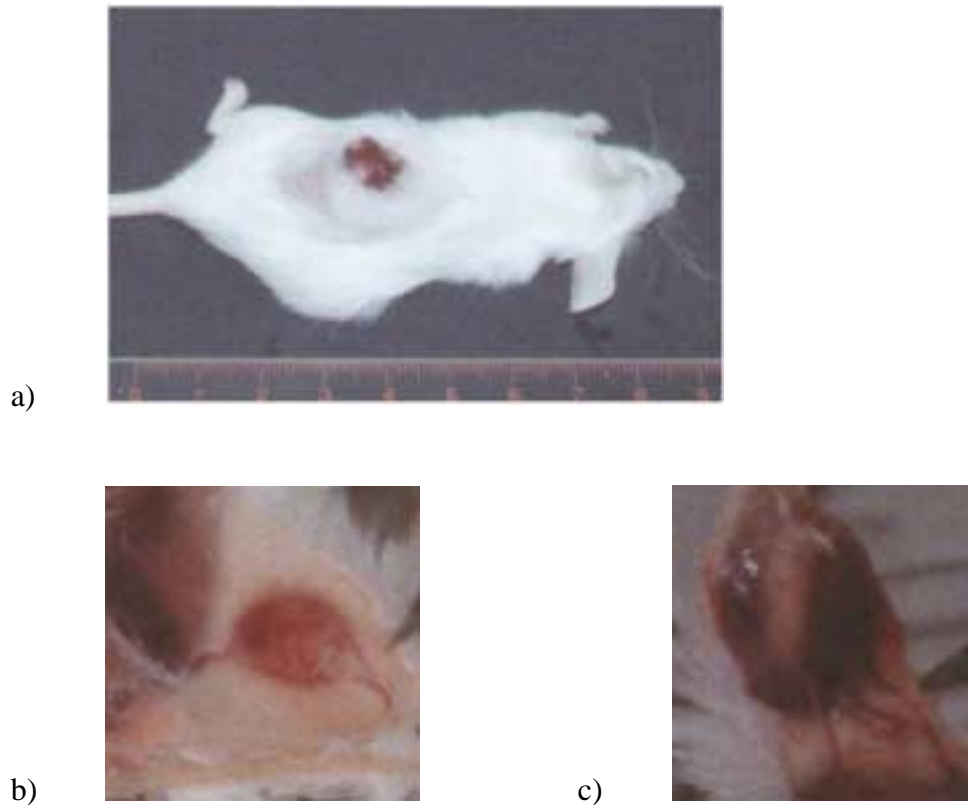


Abb. 17: Xenograft-Modell, Tumoren humaner Nierenkarzinomzellen bei SCID-Mäusen; a) SCID-Maus mit gut vaskularisiertem Tumor (ca. 4000 cmm); injiziert wurden VEGF-transfizierte Zellen der NZK-Linie 786-0. b) schwach vaskularisierter Tumor der NZK-Linie 786-0, mit VHL transfiziert (ca. 500 cmm). c) stark vaskularisierter Tumor der mit VEGF transfizierten NZK-Linie 786-0 (4000 cmm).

4.6.2 Expressionsveränderungen

Nach der Tumorexstirpation wurde die RNA isoliert und mit der daraus gewonnenen cDNA die PCRs durchgeführt. Die folgende Abbildung zeigt die Expressionsunterschiede der einzelnen Tumoren nach Transfektion mit verschiedenen Genen.

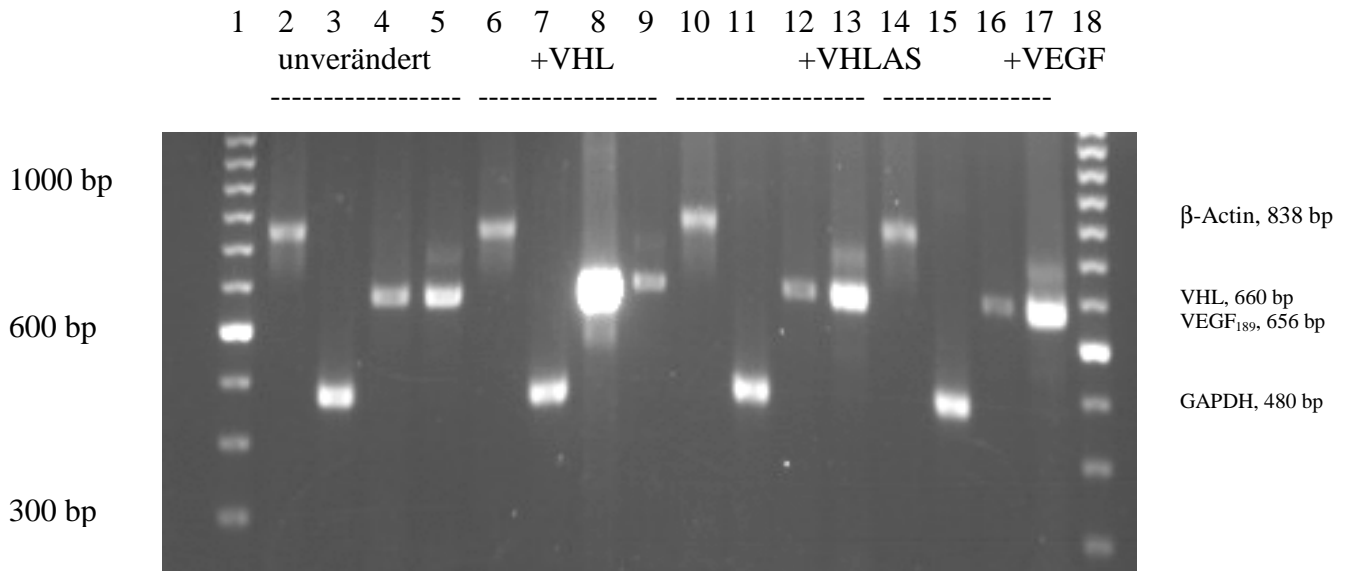


Abb.18: Expressionsveränderung der VHL-mRNA nach Transfektion; die Abbildung zeigt die Veränderung der VHL und VEGF-Expression der Zelllinie KTCTL-26A nach den in vivo Versuchen. Aufgetragen wurden die Amplifikate der unveränderten Zelllinie (2-5), sowie der mit VHL (6-9), mit VHLAS (10-13) und mit VEGF₁₈₉ (14-17) transfizierten Linien. Spur 1 und 18 Marker, 100 bp-Leiter/ β -Actin: 2, 6, 10, 14/ GAPDH: 3, 7, 11, 15/ VHL: 4, 8, 12, 16/ VEGF: 5, 9, 13, 17; β -Actin und GAPDH dienen zum Abgleichen der aufgetragenen DNA Mengen.

Wie in der oberen Abbildung zu erkennen ist, steigt die Konzentration der VHL-mRNA nach Transfektion mit VHLcds sehr stark an (Spur 8). Gleichzeitig sinkt die im Tumor vorhandene Menge an VEGF mRNA (Spur 9). Die Transfektion von VHLAS reduziert die vorhandene VHL-mRNA (Spur 12), verstärkt aber gleichzeitig die Bildung von VEGF-mRNA (Spur 13). Die Transfektion von VEGF bewirkt eine Reduktion der VHL-mRNA, ein Hinweis auf die mögliche Wechselwirkung der beiden Gene (Spur 16).

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 6) verdeutlicht im einzelnen die Expressionsveränderungen der untersuchten Gene nach Transfektion der Zelllinien und Injektion in die SCID-Mäuse. Auch nach Rekultivierung der disaggregierten Xenotransplantate ergab sich dieses Expressionsmuster für die untersuchten Zelllinien.

KTCTL-26A	VHL	VEGF
unverändert	+	+
VHLc ds	+++	(+)
VHLAS	-	+
VEGF	(+)	++

Caki-1	VHL	VEGF
unverändert	-	-
VHLc ds	++	-
VHLAS	-	-
VEGF	-	++

Caki-2	VHL	VEGF
unverändert	++	+
VHLc ds	+++	(+)
VHLAS	(+)	++
VEGF	(+)	++

786-0	VHL	VEGF
unverändert	+	++
VHLc ds	+++	(+)
VHLAS	-	+++
VEGF	(+)	+++

A-498	VHL	VEGF
unverändert	(+)	-
VHLc ds	+++	-
VHLAS	-	(+)
VEGF	-	++

293	VHL	VEGF
unverändert	++	+
VHLc ds	+++	(+)
VHLAS	(+)	++
VEGF	+	++

Tab. 6: Zusammenfassung der Expressionsveränderungen von VHL und VEGF in den Xenotransplantaten nach Transfektion mit EGFP-N1. Aufgeführt sind jeweils die Veränderungen nach Transfektion von VHLc ds, VHLAS und VEGF gegenüber der unveränderten Zelllinie. (Expression: +++ sehr stark / ++ stark / + schwach / (+) sehr schwach / - keine Expression)

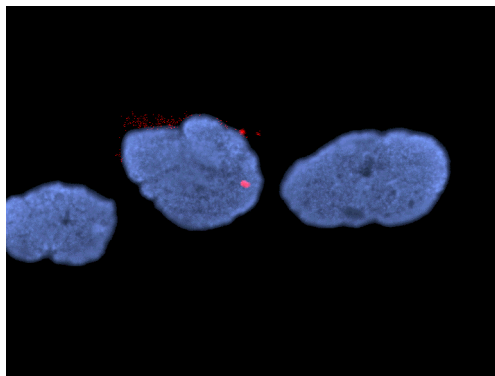
4.7 Proteindaten

4.7.1 Western Blots

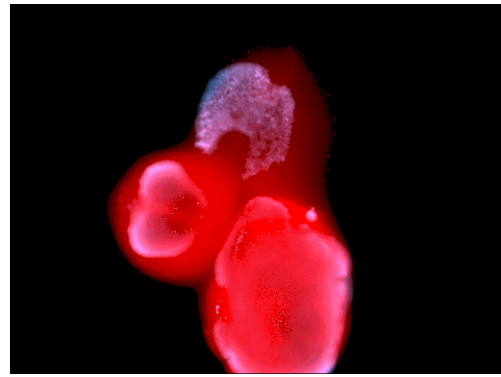
Es wurde der einzige kommerziell erhältliche VHL-Antikörper getestet. Dieser erwies sich jedoch im Western Blot als zu unspezifisch. Auf die Darstellung von Western Blots wurde deshalb verzichtet.

4.7.2 Immunhistochemie

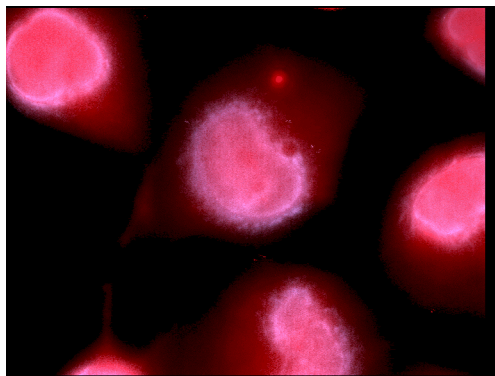
Mit Immunhistochemie (IHE) war es möglich, die Expression der Genprodukte von VHL und VEGF nachzuweisen. Die nachfolgende Abbildung zeigt Beispiele für die unterschiedliche Expression des VHL-Proteins vor und nach Transfektion.



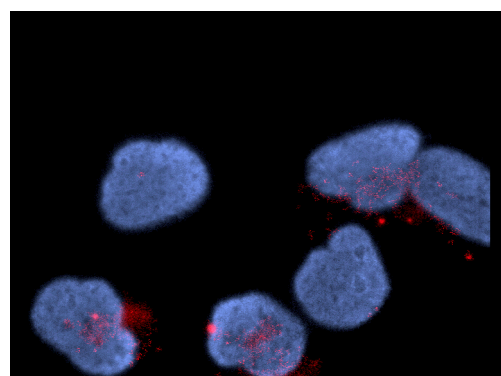
a)



b)



c)

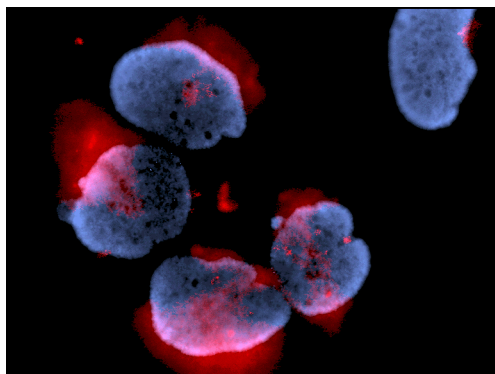


d)

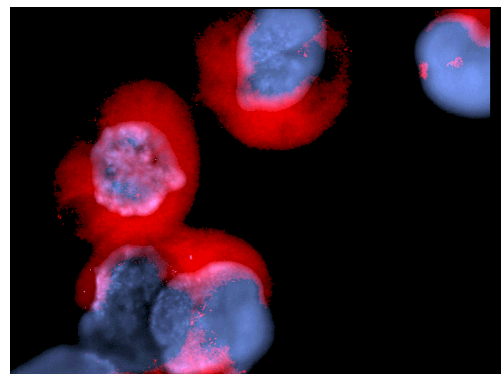
Abb. 19: Expression von pVHL nach immunhistochemischer Markierung; a) Caki-1 >VHL defizient; b) Caki-1 nach Transfektion der VHLcDNA, c) 786-0 transfiziert mit VHLcDNA, d) 786-0+VHLcDNA nach sekundärer Transfektion von VHLAS; (rote Fluoreszenz = TRITC-Markierung von pVHL)

Es wird deutlich, daß die Expression des VHL-Genproduktes nach Transfektion des VHL-Gens zunimmt. Die Transfektion von VHLAS reduziert die VHL-Expression auf ein Minimum. Die Zellkerne sind in der obigen Abbildung durch DAPI-Antifade sichtbar gemacht.

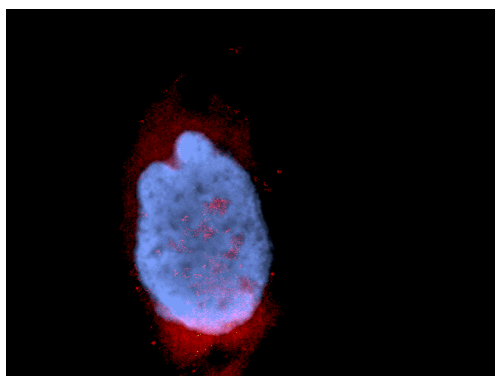
Ebenso konnte mit dieser Methode die Expression des VEGF-Proteins nachgewiesen werden. Dabei ergaben sich Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen der Proteinexpressionen von VEGF und VHL. Die Expression des VEGF-Genproduktes wird durch die rote Fluoreszenz (TRITC) gezeigt, die Kerne wurden mit DAPI-Antifade blau angefärbt.



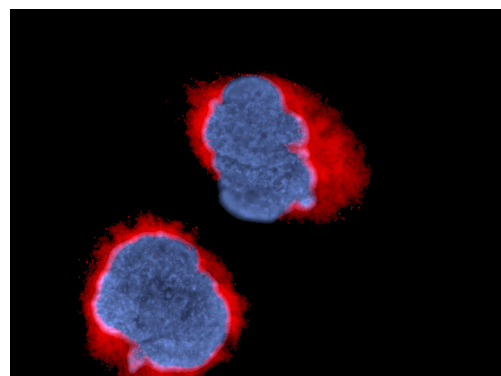
a)



b)



c)



d)

Abb. 20: immunhistochemischer Nachweis des VEGF Proteins; a) schwache Expression in der Zelllinie KTCTL-26A, b) KTCTL-26A nach Transfektion von VEGF₁₈₉; c) und d) verminderte Expression von pVEGF in KTCTL-26A (c) und 786-0 (d) nach Transfektion von VHLcds.

4.8 Histopathologie

Histopathologische Untersuchungen

Von einem Teil der entnommenen Tumoren wurde im pathologischen Institut der Universitätsklinik Köln 2 µm dicke Paraffinblöcke hergestellt und mikroskopisch begutachtet. Die folgende Tabelle (Tab. 7) faßt die Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen zusammen. Abbildung 21 zeigt exemplarisch die Auswirkungen der Transfektionen auf die verschiedene Zelllinien. Es wurden 33 Tumoren aufgearbeitet und bezüglich ihrer Gefäßstruktur charakterisiert. Ein Teil wurde zusätzlich mit einem VHL-spezifischen Antikörper markiert und angefärbt. Aus der Tabelle wird deutlich, daß die histopathologischen Beobachtungen im wesentlichen den Ergebnissen der RNA-Untersuchungen entsprechen. Generell läßt sich festhalten, daß das Einbringen von VHL den Gefäßanteil in den Tumoren reduziert, VEGF dagegen das Kapillarwachstum verstärkt. VHL und VEGF wirken demnach antagonistisch. Die Transfektion von VHLAS zeigt einen Phänotyp, der durch stärkere Vaskularisierung geprägt ist.

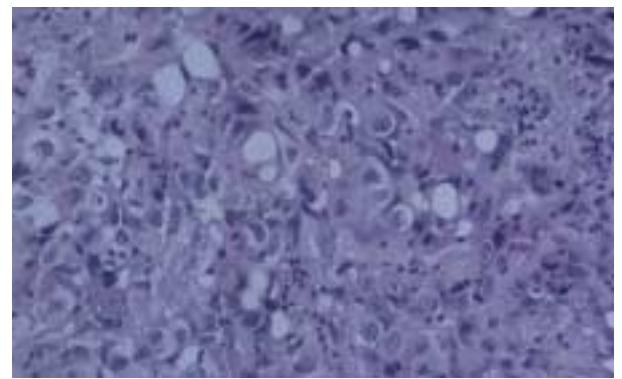
Ein Zusammenhang zwischen der Expression von VHL oder VEGF und der Ausbildung eines bestimmten Gradings scheint nicht zu bestehen.

lfd. Nr.	injizierte Tumorzellen	Histologie	Gefäße	VHL IHE
1	KTCTL-26A	kz NZK, G3	+	+
2	KTCTL-26A+VHL	kz NZK, G3, solide	+	++
3	KTCTL-26A+VHL	tumorfreie Lunge		0
4	KTCTL-26A+VHLAS	kz NZK, G3, solide	++	
5	KTCTL-26A+VEGF ₁₈₉	kz NZK, G3, solide	++	(+)
6	Caki-1	kz NZK, G3	n. b.	0
7	Caki-1	tumorfreie Lunge		0
8	Caki-1+VHL	tumorfreie Lunge		+
9	Caki-1+VEGF ₁₈₉	kz NZK, G3	++	0
10	Caki-2	kz NZK, G3	+	++
11	Caki-2	kz NZK, G2-3, solide tub./ papillär cyst.		
12	Caki-2+VHL	kz NZK, G3, solide	++	+
13	Caki-2+VHL	tumorfreie Lunge		0
14	Caki-2+VHLAS	kz NZK, G3	++	(+)
15	Caki-2+VHLAS	kz NZK, G3	+++	(+)
16	Caki-2+VHLAS	unterschiedl. diff.	++++	0
17	Caki-2+VHLAS	unterschiedl. diff.	++++	0
18	Caki-2+VHLAS	kz NZK, G2, mäßig diff.	++	
19	Caki-2+VEGF ₁₈₉	kz NZK, G3	++	0
20	Caki-2+VEGF ₁₈₉	kz NZK, unterschiedl. diff.	++++	0
21	Caki-2+VEGF ₁₈₉	kz NZK, G2-3, solide, mäßig diff.		
22	Caki-2+VEGF ₁₈₉	tumorfreie Lunge		
23	786-0	kz NZK, G3, solide	+++	0
24	786-0	kz NZK, G3	+++	
25	786-0	kz NZK, G3	++	
26	786-0	tumorfreie Lunge		0
27	786-0+VHL	kz NZK, G3	+	++
28	786-0+VHL	tumorfreie Lunge		
29	786-0+VHLAS	kz NZK, G3	++	0
30	293	G4, solide, gut diff., maligne	n. b.	++
31	293	G4, solide, gut diff., maligne	n. b.	+++
32	293	tumorfreie Lunge		
33	293+VHL	G4, solide, gut diff., maligne	n. b.	

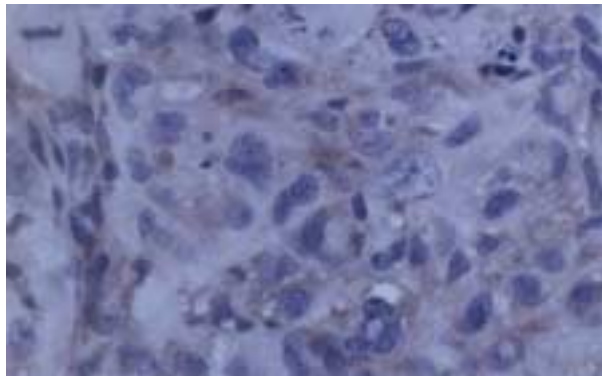
Tab. 7.: Histopathologische Untersuchungen der Xenotransplantate; ausgewertet wurden 33 Tumoren. Generell läßt sich eine stärkere Vaskularisierung der Tumoren mit VEGF-Expression, bzw. nach Blockade von VHL mit VHLAS feststellen. Expression: +++ sehr stark / ++ stark / + schwach / (+) sehr schwach / 0 keine Expression / n. b. nicht beurteilbar / leere Felder nicht untersucht)



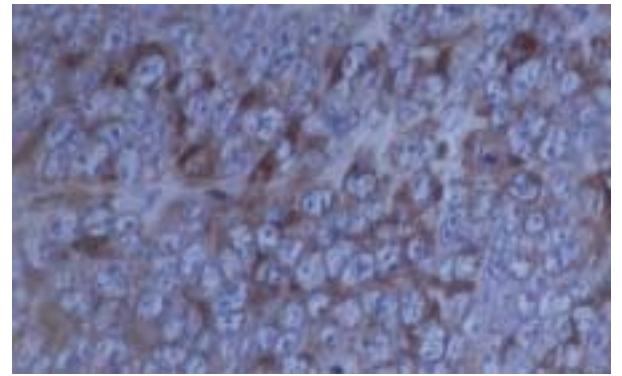
a)



b)



c)



d)

Abb. 21: immunhistochemische Auswertung der Xenotransplantate am Beispiel zweier Zelllinien. a) 786-0 unverändert mit großen Gefäßen; b) 786-0 nach Transfektion mit VHL, der Gefäßanteil ist deutlich zurückgegangen; c) die Anfärbung der VHL-Wildtyp-Zelllinie 293 zeigt nach Transfektion mit VHLAS nur noch schwache Signale; d) nach Transfektion mit VHL findet man das Genprodukt in der ursprünglich VHL-defizienten Zelllinie 786-0 cytoplasmatisch lokalisiert.

4.9 Lokalisation des VHL Proteins

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist das VHL Genprodukt sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma nachweisbar. Zur Detektion wurde zum einen ein VHL-GFP Fusionsprotein konstruiert und in die Zellen hineintransfiziert, zum anderen das zelluläre pVHL mit einem spezifischen Antikörper markiert und mit einem zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen. Beide Markierungen können mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

4.9.1 Nachweis des VHL-GFP Fusionsproteins

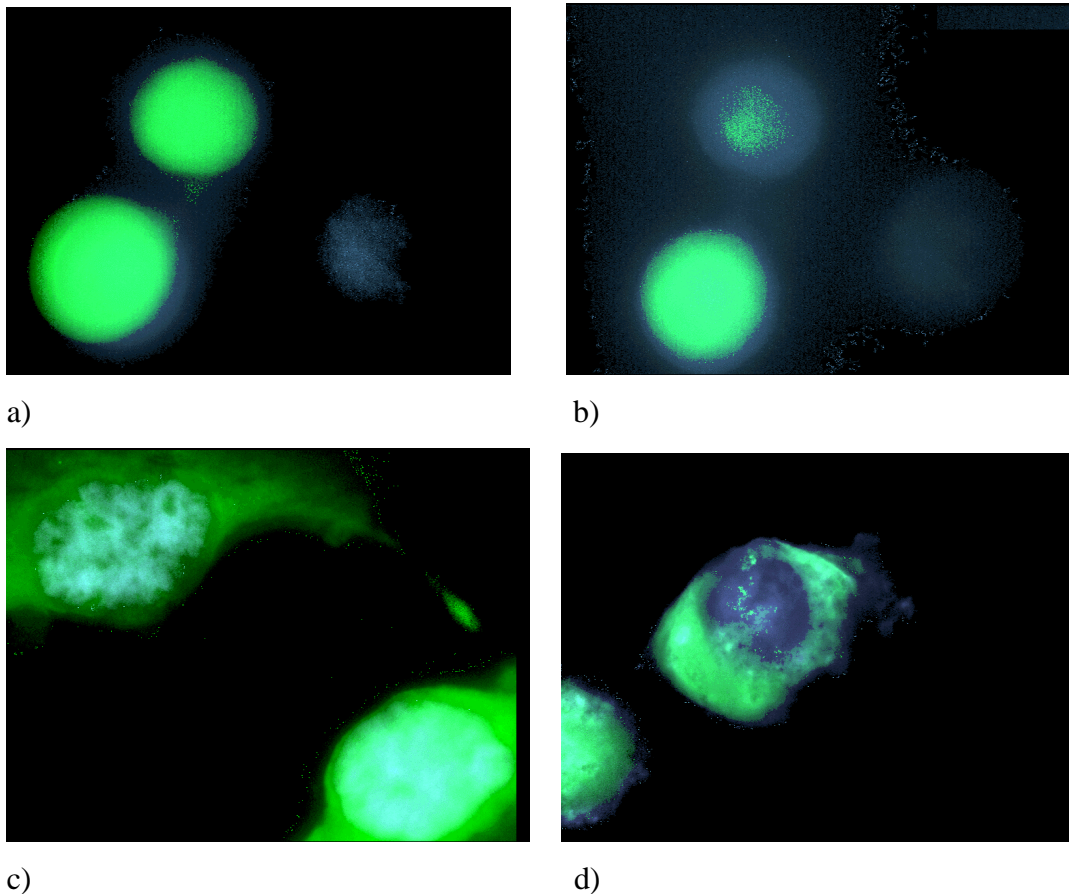
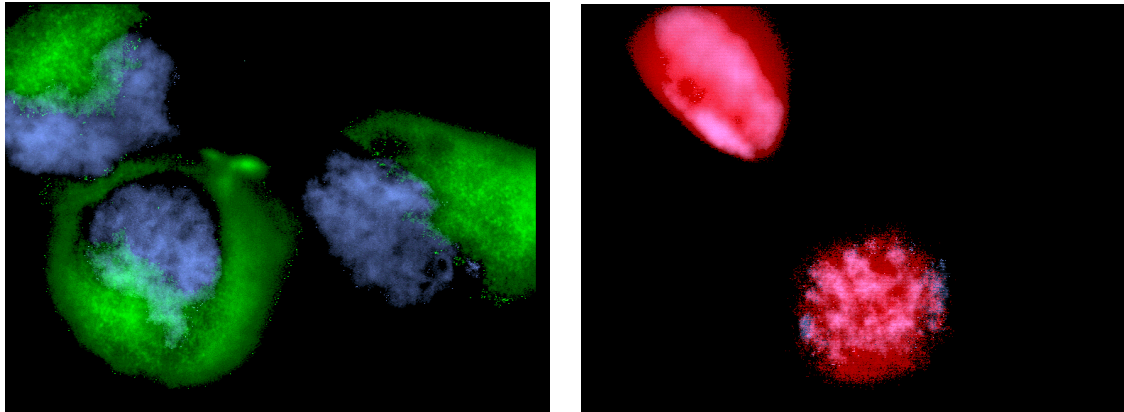


Abb. 22: Expression des VHL-GFP-Fusionsproteins; fluoreszenzmikroskopische Detektion, man erkennt sowohl eine nukleäre (a, b, c), als auch eine cytoplasmatische (c, d) Lokalisation, was auf ein ubiquitäres Auftreten des VHL Genproduktes hinweist. Die rein blauen Zellen (a, b) sind nicht transfiziert und sterben während der Selektion ab.

4.9.2 Immunhistochemischer Nachweis des VHL-Proteins

Auch der immunhistochemische Nachweis der VHL-Lokalisation weist auf ein ubiquitäres Auftreten des Genproduktes in der Zellen hin.



a)

b)

Abb. 23: cytoplasmatische und nukleäre Lokalisation des VHL Proteins; das VHL-Genprodukt ist in a) mit FITC und in b) mit TRITC markiert. Die Zellkerne sind mit DAPI-Antifade sichtbar gemacht worden.

In der obigen Abbildung ist zu erkennen, daß in dichteren Zellkonglomeraten das VHL-Protein im Cytosol lokalisiert ist und in Einzelzellen eher im Nukleus.

5. Diskussion

5.1 Mechanismen der Genregulation

Die vorliegende Arbeit zeigt die Auswirkungen von Expressionsveränderungen des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens und seinen potentiellen Targetgenen in Nierenkarzinomzellen auf.

Verschiedene Mechanismen regulieren *in vivo* die Expression von Genen. Dadurch unterliegt die Genexpression in einer gesunden Zelle einer räumlichen und zeitlichen Kontrolle. Bestimmte Gene können durch Umweltfaktoren oder interne Signale (z. B. Hormone) an- oder abgeschaltet werden. Andere Gene sind dagegen stets aktiv (konstitutive Genexpression). Die Expression von Genen kann auf allen Stufen, vom Chromosom, über DNA und RNA bis zum Protein, reguliert werden.

Auf chromosomaler Ebene stellt die Kondensation der DNA einen Regulationsmechanismus dar. Kondensierte DNA-Histon-Komplexe werden als Chromatin bezeichnet. Das Chromatin wird in Eu- und Heterochromatin unterteilt. Während die Information des Euchromatins in jeder Zelle und zu jedem Zeitpunkt benötigt wird, ist das Heterochromatin nur unter bestimmten Voraussetzungen in die Transkription involviert. Auch hier unterscheidet man zwei Konformationen der DNA das konstitutive, welches transkriptional inert ist, und das fakultative Heterochromatin. Die Kondensation des Heterochromatins dient vermutlich dazu, größere Chromosomenabschnitte zeitweise von der Transkription auszuschließen.

Ein Beispiel für Genregulation auf DNA-Ebene ist die Genamplifikation. Durch zusätzliche Replikation eines Chromosomenabschnittes kann, bei erhöhtem Bedarf der Zelle, die Menge an Genprodukt erheblich gesteigert werden.

Ein Beispiel für die Steuerung der Genexpression auf DNA-Ebene ist der Methylierungsstatus. Eukaryontische DNA kann nach einem vererbaren spezies-spezifischen Muster Nukleotide enthalten, die eine Methylgruppe tragen. Somit liegt neben den vier bekannten Basen auch 5-Methylcytosin vor. Ein solches Muster kann auf die Transkription Auswirkungen haben und zwar vor allem dann, wenn die stromaufwärts von den transkribierten Sequenzen gelegenen Kontrollbereiche des Gens betroffen sind. Die beiden Mechanismen der Genregulation durch Methylierung sind erstens die Ausbildung von Z-DNA in diesen Regionen. Diese Konformation der DNA hat eine Expressionverminderung zur Folge. Zweitens ist bekannt, daß einige Transkriptionsfaktoren nicht an methylierte DNA binden können (168-170). Aus diesen

Gründen ist es sinnvoll, umfangreiche Untersuchungen über einen unterschiedlichen Methylierungsgrad in renalen Tumoren durchzuführen. Mittlerweile haben wir in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen zeigen können, daß fast 80% der Nierenzellkarzinome eine Veränderung im VHL-Gen zeigen (171). In dieser Studie wurden neben PCR/SSCP-Analysen, LOH-Studien und Sequenzanalysen auch Hypermethylierungen des VHL-Gens untersucht. Man schätzt den Anteil der Hypermethylierungen im VHL-Gen bei sporadischen NZKs auf etwa 20% (36).

Die Regulation der meisten Gene findet jedoch auf der Stufe der Transkription statt (122; 172). Die Anzahl der synthetisierten RNA-Moleküle pro Zeiteinheit ist dabei ein direktes Maß für die primäre Genaktivität. Bei Eukaryonten gibt es Proteine, die selektiv an regulatorische Gen-Sequenzen binden und somit die Geschwindigkeit der Transkriptionsinitiation regulieren (173-175). Beispiele hierfür sind u.a. der Steroidrezeptor und daran bindende Zinkfingerproteine. Außerdem liegen in der Nähe der Promotorregion noch verstärkende Elemente, sogenannte *enhancer*, welche einen Anstieg der Transkriptionsrate auf das Hundertfache bewirken können. In diesem Zusammenhang sei an das Operonmodell für Prokaryonten erinnert. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Genen, die gemeinsam reguliert und in eine einzige mRNA transkribiert werden. Häufig hängen diese Gene mit sogenannten Regulatorgenen zusammen. Die Proteine der Regulatorgene lagern sich hinter der Promotorregion an und dienen für die gesamte mRNA als Repressoren. Werden diese Proteine durch bestimmte Substrate jedoch von der mRNA gelöst, so kann die RNA-Polymerase II an den Promotor binden und mit dem Ablesen des mRNA-Stranges beginnen. Bei höheren Organismen findet man ähnliche Genregulationsmechanismen, wenn auch die Gene nicht in einem Operon zusammengefaßt sind.

Ein wichtiger Gesichtspunkt, der zur Interpretation der hier vorgelegten Daten zu beachten ist, ist die posttranskriptionelle Genregulation. Darunter fallen alternatives Spleißen und intrazelluläre mRNA-Stabilität.

Alternatives Spleißen ist eine Möglichkeit der mRNA-Reifung. Aus der Prä-mRNA kann ein Teil der Information „herausgeschnitten“ werden, wobei verschiedene Transkripte entstehen. Eines der Transkripte kann bei der anschließenden Translation favorisiert werden und damit zu einer Vermehrung dieses Genproduktes gegenüber dem anderen führen. Dieser Unterschied wäre für das VHL-Gen von Bedeutung, wenn nachgewiesen werden könnte, daß die verschiedenen möglichen VHL-Funktionen in Abhängigkeit von den beiden VHL-Genprodukten reguliert werden (128). Mit dieser

Hypothese ließe sich zum Beispiel die unterschiedliche Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie z. B. c-fos und c-myc in NZK mit verminderter VHL-Expression erklären (41; 176). Dazu muß untersucht werden, ob die Zunahme der Onkogenexpression vom Überwiegen des einen oder anderen VHL-Proteins abhängt.

5.2 Transkription und VHL

Transkriptionsfaktoren (TFs) steuern die Expression eukaryontischer mRNAs. Dabei können TFs sowohl positiven, als auch negativen Einfluß auf die Transkription ausüben. Die TFs können ihrerseits wiederum durch Aktivatoren oder Repressoren in ihrer Aktivität beeinflußt werden. Zur Transkription einer bestimmten DNA sind bis zu 50 TFs nötig, die sich zu einem festen Multiproteinkomplex zusammenlagern. An diesen Komplex bindet bei Eukaryonten die RNA-Polymerase II, die für das Umschreiben der DNA in RNA verantwortlich ist. Durch *in vitro* Versuche konnte gezeigt werden, daß TFs sich auch außerhalb der Zelle zusammenlagern können (177; 178). Offenbar besitzen sie Sequenzen, die sowohl für die Erkennung, als auch für die Bindung anderer TFs verantwortlich sind. Für das Genprodukt des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens wird in der Literatur ein negativer Effekt auf die Expression potentieller Zielgene postuliert (48). Die Autoren beschreiben in dieser Publikation eine Interaktion von pVHL mit SP1. Bei SP1 (Spezifitätsprotein 1) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, dessen Zinkfinger-Strukturen an die 5'-Region der zu transkribierenden Gene binden und die Transkription starten (177; 179). Das VHL-Genprodukt ist nach diesen Ergebnissen ein Repressor von SP1, da es seine Aktivität negativ beeinflußt (48). Die mRNA des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors wird als eine der möglichen Targetsequenzen von pVHL angenommen (142). Um zur Aufklärung dieser Hypothese beitragen zu können, wurde in den vorliegenden Studien der Zusammenhang zwischen den beiden Genen untersucht. Es zeigte sich, daß ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression der beiden Gene besteht: Eine verstärkte Expression der VHL-mRNA hat eine *Downregulation* der VEGF-Transkription zur Folge. Das läßt sich durch die Abnahme der intrazellulären VEGF-mRNA-Konzentration mit semiquantitativer RT-PCR belegen. Umgekehrt steigt die Expression von VEGF an, wenn vorhandene VHL-mRNA durch eine komplementäre *Antisense*-mRNA geblockt wird (Abb.14).

Nach Transfektion von Tumorzellen mit VEGF-mRNA sinkt die Konzentration von VHL-mRNA. Das Endprodukt des Transkriptionsvorgangs scheint demnach seinen eigenen Repressor zu hemmen, ein Phänomen, welches für Angiogeneseaktivatoren und ihre Wirkung auf Angiogenesehemmer bereits beschrieben wurde (78; 86; 89).

Dieser Rückkopplungsmechanismus ist eine von vielen Regulationsmöglichkeiten, die in gesundem Gewebe die Angiogenese steuern. Ziel dieser Regulationen ist die

Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen Angiogeneseaktivatoren und Angiogeneseinhibitoren (s. Abb. 25), wie es von Folkman beschrieben wurde (86). Nach diesem Modell trägt neben der Überexpression von Angiogenesestimulatoren und ihren korrespondierenden Signaltransduktoren (z. B. FLT-1) (180) auch der Verlust von Angiogeneseinhibitoren (z. B. IF- α 2a, Thrombospondin, Plättchenfaktor 4) und entsprechenden Signaltransduktoren zur Tumorangienese bei (78). Eine Überexpression von Angiogeneseaktivatoren, wie z. B. VEGF kann dagegen angiogenesefördernd sein, wenn keine Mutationen der Inhibitoren vorliegen. Dieser negative *feedback* Effekt auf Angiogeneseinhibitoren konnte für VEGF kürzlich gezeigt werden (181). Möglicherweise bewirkt ein Konzentrationsüberschuß frei verfügbarer VEGF-mRNA im Cytosol eine Suppression der VHL-Translation. Ob die VEGF-mRNA ein doppelsträngiges Molekül mit der VHL-mRNA bildet oder ob die Ribosomen überwiegend VEGF-mRNA-Moleküle binden, ist bislang nicht untersucht worden.

Weiterführende Versuche müssen jetzt zur Quantifizierung der zellulären mRNA-Konzentrationen von VHL und VEGF durchgeführt werden. Diese Ergebnisse werden wir durch geeignete Methoden, wie z. B. ELISA oder RNase *Protection Assays*, ergänzen. Zusätzlich ist die Konzentrationsbestimmung von intrazellulärem pVEGF nach der Transfektion ein wichtiger Faktor, der untersucht werden muß. Wenn man herausfinden würde, daß die Konzentration von pVEGF in Korrelation zur transfizierten VEGF-mRNA ansteigt, wäre das ein wichtiger Hinweis auf den angesprochenen *feedback* Effekt zwischen VHL und VEGF.

5.3 Anmerkungen zur Methodik

5.3.1 RT-PCR

Die semiquantitative RT-PCR ermöglicht es, aus minimalen Mengen mRNA durch Amplifikation detektierbare Mengen von cDNA herzustellen. Damit können Expressionsveränderungen in Geweben gezeigt und die Konzentration intrazellulärer mRNAs gegeneinander abgeschätzt werden. Dieser Vorteil gegenüber dem Northern-Blotting macht diese Methode für die Analyse pathologischer Vorgänge in der Humanmedizin sehr wichtig, da aufgrund minimal-invasiver diagnostischer Eingriffe (z. B. Feinnadelbiopsien) oder einer geringen Anzahl relevanter Zellen im Probenmaterial häufig nur kleinste Mengen an mRNA zur Verfügung stehen. In der Praxis treten allerdings vielfältige Probleme auf. So kann beispielsweise die RNA-Ausbeute von zwei parallel bearbeiteten Proben durch die Anwesenheit unterschiedlich hoher RNase Konzentrationen im Gewebe stark differenzieren. Demnach variiert auch die nach der Reversen Transkription erhaltene cDNA-Menge. Desweiteren kann die Reverse Transkription unterschiedliche Effizienz aufweisen.

Aus den genannten Punkten folgt, daß eine einmalige Quantifizierung durch Vergleich der erhaltenen Amplifikatmengen nicht ausreichend sein kann. Zur Minimierung dieses Restrisikos wurden neben der Verwendung eines hochwertigen Gerätes und höchster Sorgfalt bei der Versuchsdurchführung, Standardsequenzen sogenannter *housekeeping*-Gene (β -Actin, GAPDH) amplifiziert (Abb. 13, 18). Ausgewertet wurden letztendlich nur die Agarosegele, die für die untersuchten Proben eine nahezu gleiche Expression von β -Actin und GAPDH zeigten. Zusätzlich wurden alle dargestellten Ergebnisse mindestens einmal reproduziert. Somit wurden nur gesicherte Daten in die Auswertung einbezogen.

5.3.2 VHL-Mutationsanalyse der verwendeten NZK-Linien

Die SSCP-Analyse eignete sich zum Nachweis der VHL-Mutationen in den verwendeten NZK-Zelllinien nicht. Obwohl die Methode in der Vergangenheit häufig zur Mutationsanalyse von Gewebeproben verwendet wurde, scheint ihre Sensitivität nicht optimal zu sein. Trotz unterschiedlicher Ansätze und der Variation essentieller Parameter (PAA-Konzentration im Gel, Temperatur des Elektrophoresepuffers, Stromstärke und Vorbehandlung der Proben) ist es mit dieser Methode nicht gelungen, die in der Literatur beschriebenen VHL-Mutationen in den Zelllinien zu detektieren.

Offenbar verändert sich das Laufverhalten der einzelsträngigen DNA-Fragmente auch noch durch andere, bislang unbekannte Faktoren. F-BESS erwies sich als eine gute Alternative zur Aufklärung von Mutationen mit Beteiligung eines Thymidins. Mit dieser Methode sind allerdings nur 80-90% aller Mutationen nachweisbar. Die direkte DNA-Sequenzierung, so wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurde, ist daher in jedem Fall vorzuziehen.

5.3.3 Vorteile und Risiken des GFPs als Reporter gen

Als Reporter gen für die durchgeführten Transfektionen und zur Aufklärung der zellulären Lokalisation des VHL-Proteins wurde für die vorliegenden Studien eine abgewandelte Form des *green fluorescent proteins* (EGFP, *enhanced green fluorescent protein*) verwendet (150). Dieses Gen hat den Vorteil, daß das exprimierte Protein leicht zu detektieren ist und somit eine Abschätzung der Transfektionseffizienz schnell erfolgen kann. Damit ist es möglich, die Transfektionsmethoden für jede Zelllinie und jedes untersuchte Gen zu optimieren. Weiterhin konnte die zelluläre Lokalisation des VHL-Genproduktes leicht bestimmt werden. Unsere Ergebnisse unterstützen hierbei die Hypothese, daß pVHL sowohl im Kern, als auch im Cytoplasma exprimiert wird. Eine Verschiebung der zellulären Konzentration ergibt sich wahrscheinlich aus den verschiedenen Funktionen, die das VHL-Protein in der Zelle ausübt. Gleichzeitig muß aber erwähnt werden, daß es Daten gibt, die einen Zusammenhang zwischen der GFP-Expression und einer vorzeitig induzierten Apoptose vermuten lassen (182). Ebenfalls möglich ist eine Funktionsbeeinträchtigung des fusionierten Proteins aufgrund sterischer Veränderungen. Das Fusionsprotein (pEGFP-pVHL) ist naturgemäß größer als das VHL-Protein. Eine damit verbundene Veränderung seiner biologischen Funktion(en) und/ oder seiner Lokalisation ist daher denkbar, wird in der Literatur aber bislang nicht beschrieben (139). Zur Verifizierung der Aussage, ob das verlangsamte *in vitro*- und *in vivo*- Zellwachstum, welches in dieser Arbeit für VHL exprimierende Zellen gezeigt werden konnte, nicht in kausalem Zusammenhang mit der Wirkung des GFPs steht, wurden weitere Transfektionen mit einem anderen eukaryontischen Vektor (pcDNA 3) durchgeführt. Die Klonierung transfizierter Zellen erfolgte hierbei nur über Selektion mit dem Antibiotikum G 418.

Es konnte gezeigt werden, daß es bezüglich der Toxizität keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Vektoren gibt. Weiterhin war auch keine Differenz in der Funktion des VHL-Proteins, welches in pcDNA 3 exprimiert wird, gegenüber dem pEGFP-VHL-Fusionsprotein festzustellen. Nach unseren Ergebnissen eignet sich das *green fluorescent protein* daher uneingeschränkt als Reporter gen für die vorgelegten Studien.

5.4 In vitro Ergebnisse

Sechs humane Nierenkarzinomzelllinien wurden verwendet. Dazu wurde zunächst ihr Genom auf Mutationen des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens untersucht. Mutationen wurden durch „*fluorescence labelled base excision sequence scanning*“ (F-BESS) und direkte DNA-Sequenzierung detektiert. Weiterhin wurde der Expressionsstatus für VHL und VEGF mit RT-PCR ermittelt. Eine Zelllinie ist bezüglich VHL „normal“ (293), der Wildtyp des Gens wird exprimiert. Fünf Zelllinien weisen eine Mutation (Deletion, Insertion, Basenaustausch) auf einem Allel und eine chromosomale Veränderung im Bereich des kurzen Arms von Chromosom 3 auf (KTCTL-26A, Caki-1, Caki-2, 786-0, A-498). Der Expressionsstatus der einzelnen Zelllinien ist sehr heterogen, d. h. das mutierte VHL-Gen wird unterschiedlich stark exprimiert (vgl. Tab. 4 und 5). In der Literatur werden für dieselben Zelllinien teilweise verschiedene Angaben bzgl. der VHL-Mutationen gemacht. Zur besseren Übersicht wird hier die Tabelle 2 noch einmal gezeigt.

Zelllinie	Publizierte Mutationen	F-BESS	Ergebnis der DNA-Sequenzierung
KTCTL-26A	del T, Codon 148, frameshift; (64)	del T, zw bp 5491-5495, Codon 148	bp 5491-5495, Ex 2, del T
Caki-1	VHL-Wildtyp, (46) (s. auch Text)	ins 1 bp, bp 917	bp 917, Ex 1, Ins A, truncation
Caki-2	subst A>T, Codon 177 nonsense; (70)	subst 1 bp, 8732, Codon 177	bp 8732, Ex 3, subst. A>T
786-0	del G, Codon 104 frameshift; (64)	del 1 bp, bp 1023-1027, Codon 104	bp 1024, Ex 1, del G
A-498	del 4 bp, Codon 147 frameshift; (64)	del 4 T, bp 5477 Codon 147	bp 5477, Ex 2, del 4 T
293	VHL-Wildtyp; (56)	VHL-Wildtyp	VHL-Wildtyp

Tab. 2: VHL-Mutationsanalyse der sechs Zelllinien, die für die vorliegenden Studien verwendet wurden und Vergleich mit Literaturangaben.

So wird die Zelllinie 786-0 beispielsweise als VHL-defiziente Nierenkarzinomzelllinie beschrieben (56; 64), während Liakopoulos et al. 1999 aussagen, die Zelllinie exprimiere ein gesundes VHL-Allel (43). Ein weiteres Beispiel ist die Charakterisierung der Nierenkarzinomzelllinie Caki-1: Maxwell et al. beschreiben 1999 Caki-1 als VHL-

Wildtyplinie und verweisen auf Iliopoulos et al. (46; 56). In dieser Publikation von 1995 wird jedoch die genannte Zelllinie mit keinem Wort erwähnt. Als wir allerdings die VHL-DNA der Zelllinie Caki-1 untersuchten, zeigte sich, daß sie eine Mutation im vorderen Bereich der kodierenden Sequenz aufweist, die zu einem stark verkürzten Protein führt. Bekanntermaßen kommt es während der Kultivierung einer Zelllinie immer wieder zu Umbauten ihres Genoms. Auch die Datenblätter der Firmen, welche die Zelllinien kommerziell vertreiben (ATCC, DSMZ) helfen nicht immer weiter, da sich kultivierte Zellen immer wieder verändern. Eine intervallmäßige Überprüfung des interessierenden Genbereichs ist deshalb notwendig und wurde von uns vierteljährlich durchgeführt.

Nach Transfektion der kodierenden Sequenz des VHL-Gens verlangsamte sich bei allen sechs Zelllinien die Proliferation (Abb. 12). Das VHL-Genprodukt übt offenbar einen hemmenden Effekt auf das Zellwachstum aus. Der unveränderte Vektor, der als Kontrollansatz ebenfalls in die Zellen eingebracht wurde, zeigte keinerlei Auswirkungen auf das Zellwachstum. Damit konnte gezeigt werden, daß die aufgetretenen Veränderungen der Wachstumsgeschwindigkeit auf die verstärkte Expression der VHL-mRNA zurückzuführen sind. Die Transfektion des VHL-*antisense* Konstruktes bewirkt einen entgegengesetzten Effekt. Der komplementäre mRNA-Strang bildet mit der cytosolischen VHL-mRNA ein doppelsträngiges Hybrid. Dadurch sinkt die Konzentration an frei verfügbarer VHL-mRNA und die Translation des VHL-Genproduktes wird auf ein Minimum reduziert (Abb. 19 c, d). Die Teilungsaktivität der Zellen wird beschleunigt, so daß es nach kurzer Zeit zu einer völlig dichten *monolayer*-Kultur am Boden des Kulturgefäßes kommt. Auch dies zeigt die Involvierung des VHL-Proteins in Prozesse der Zellteilung, bzw. Zellwachstum. Die Transfektion von VEGF führte zu keinen nachweisbaren Veränderungen des *in vitro* Zellwachstums. Die mRNA von VEGF konnte mittels RT-PCR zwar in der cDNA der transfizierten Zelllinien nachgewiesen werden, histologische Veränderungen oder Änderungen im Wachstumsverhalten der Zellen traten jedoch nicht auf. Eine mögliche Erklärung ist die Wirkung von pVEGF auf das Endothelzellwachstum und die damit verbundene stärkere Vaskularisierung. Da man diese Effekte in Zellkulturversuchen nicht untersuchen kann, wurden zusätzlich die Studien mit Xenotransplantaten durchgeführt. Wie sich gezeigt hat, war dies eine sinnvolle Ergänzung und Ausweitung der Versuchsreihen, da mit unseren Tierversuchen neue und sehr wichtige Daten erhoben werden konnten, welche die gegenseitige Regulation von VHL und VEGF belegen (Kap 5.5).

5.5 In vivo Ergebnisse

Die Ergebnisse der Tierversuche sind sehr aussagekräftig und gut interpretierbar. Aufgrund der schnelleren Wachstumsrate der injizierten Zellen wurden nach einer Testphase (vergleichendes Tumorwachstum in nu/nu-, nu/nu_{rad} - und SCID-Mäusen) nur SCID-Mäuse für die Xenotransplantationen verwendet. Zwar sind mit bestrahlten SCID-Mäusen (SCID_{rad}) noch schnellere Wachstumsraten zu erwarten (183), jedoch ist die Bestrahlung von Versuchstieren nicht unproblematisch, da mit dieser Methode die Gefahr besteht, daß spontane Mutationen induziert werden, welche die Bildung von anderen Tumoren zur Folge haben können.

SCID-Mäuse sind gegenüber Nacktmäusen aufgrund ihres Felles bei Xenotransplantationen etwas ungünstiger zu handhaben. Sie müssen vor der Injektion rasiert werden, damit die Injektion der Tumorzellen leichter zu kontrollieren ist. Innerhalb weniger Tage wächst die rasierte Stelle wieder zu, so daß das Tumorwachstum im frühen Stadium schwer zu dokumentieren ist. Auf eine Nachrasur der Versuchstiere wurde verzichtet, da bei einer Verletzung des Tumors zusätzliche Parameter in die Auswertung einfließen müssen. Hierzu zählt z. B. ein potentiell Infektionsrisiko, eine höhere Wahrscheinlichkeit der Metastasenbildung durch Tumorzellen, die über die Wunde in die Blutbahn geraten oder der Tumor könnte an Volumen einbüßen. Vorteilhaft bleibt aber, daß das Tumorwachstum bei SCID-Mäusen vergleichsweise schneller ist, als bei Nacktmäusen. Die Verwendung von unbestrahlten SCID-Mäusen ist demnach aufgrund ihrer fehlenden B- und T-Zellen (155) vorzuziehen. Unsere Versuche haben gezeigt, daß das Tumorwachstum in einem überschaubaren zeitlichen Rahmen abläuft. Die Tumoren sind, von einigen Ausnahmen abgesehen, innerhalb weniger Wochen so weit gewachsen, daß sie analysiert werden konnten.

Die Haltung der immunsupprimierten Tiere erwies sich als verhältnismäßig unkompliziert. Aufgrund der semisterilen Umgebung in einem speziell konzipierten Isolator und der sachgemäßen Behandlung, blieb die Anzahl der Tiere, die vorzeitig an einer Infektion verstarben, sehr gering (< 3%).

Nach Auswertung aller Versuchsergebnisse zeigte sich eine gegenseitige inverse Abhängigkeit der beiden Genprodukte pVHL und pVEGF. Zudem fördert die

Expression von VEGF in den Tumorzellen das Kapillarwachstum und damit die Vergrößerung des implantierten Tumorgewebes erheblich (Abb. 17).

Besonders nach Transplantation der kotransfizierten humanen Tumorzellen wurde der Zusammenhang zwischen VHL- und VEGF-Expression deutlich: Wie auch im *in vitro* Versuch zeigten sich Unterschiede im Wachstumsverhalten innerhalb einer Zelllinie nach vorangegangener Transfektion. Wurde eine VHL-defiziente Zelllinie (z. B. 786-0) mit VEGF transfiziert, so bildeten sich gut vaskularisierte und schnell wachsende Tumoren im Versuchstier. Die gleiche Zelllinie nachträglich mit VHL transfiziert, führte zu langsamer wachsenden Tumoren mit geringerer Vaskularisierung. Zelllinien, die das VHLwt-Gen exprimierten, führten zu langsam wachsenden Tumoren mit geringerer Gefäßbildung. Nach Einbringen der VHLAS-mRNA beschleunigte sich jedoch das Tumorwachstum dieser Klone und das Kapillarnetz wurde dichter. Abbildung 24 verdeutlicht diese Ergebnisse noch einmal. Gleichzeitig kann man hieraus ein Modell für eine mögliche Gentherapie solider Tumoren ableiten.

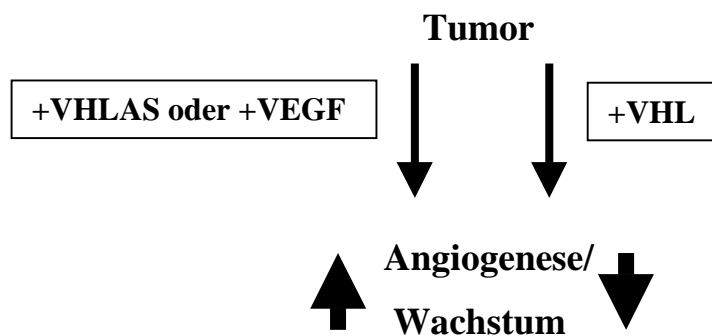


Abb. 24: Modell zur antiangiogenetischen Wirkung des VHL-Genproduktes auf solide Tumoren. Während die Blockade der VHL-mRNA mit VHLAS oder eine Transfektion mit VEGF die Angiogenese und damit das Tumorwachstum fördern, kommt es nach Transfektion von VHL zur einem gegensätzlichen Effekt: Die Angiogenese wird abgeschaltet, der Tumor stellt sein Größenwachstum ein. Das Ziel einer Therapie wäre ein verlangsamtes Tumorwachstum mit anschließendem Absterben des Tumors durch Nährstoffmangel.

5.6 Histopathologische Untersuchungen

33 verschiedene Gewebe, die aus den Versuchstieren gewonnen wurden, sind im pathologischen Institut der Universitätsklinik in Köln untersucht worden. Es erfolgte eine histologische Begutachtung, sowie eine Charakterisierung der Gefäßstruktur. Zusätzlich wurde ein Teil der entnommenen Gewebe mit einem VHL-spezifischen Antikörper bzgl. VHL-Expression und –Lokalisation untersucht.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte auch hier eine Interaktion von VHL und VEGF. Eine durch VHL-*Antisense* Transfektion erreichte Blockade der VHL-mRNA hatte eine Erhöhung der Gefäßstruktur zur Folge. Umgekehrt verringerte das Einbringen von VHLcds die Ausbildung der Gefäßstruktur in den Tumoren, die aufgrund ihrer VHL-Defizienz zuvor eine ausgeprägte Vaskularisierung gezeigt hatten.

Um weitere Beweise für eine inverse Regulation von VHL und VEGF zu erhalten, werden noch zusätzliche Xenotransplantationen durchgeführt und histopathologisch untersucht. Außerdem wird eine zusätzliche IHE mit einem VEGF-spezifischen Antikörper angestrebt.

Patienten, die an einem sporadischen Nierenzellkarzinom erkrankt sind, erkranken häufig im Verlauf ihrer Krankheit zusätzlich an einer Lungenmetastase, welche sich aus abgesiedelten Nierentumorzellen ableitet (184; 185). Um festzustellen, ob dieses Phänomen auch bei den Versuchstieren auftritt, wurden neben den Subkutantumoren auch die Lungen der Tiere auf Tumoren untersucht. Ein Auftreten einer Lungenmetastase ließ sich aber in keinem Fall beobachten. Dies kann entweder daran liegen, daß der Beobachtungszeitraum zu kurz war, d. h. vielleicht hätte sich eine Lungenmetastase entwickelt, wenn die Tiere länger gelebt hätten. Zum anderen kann es aber auch bedeuten, daß die Streuung humaner Tumorzellen in Mäusen aus irgendeinem Grund eingeschränkt ist oder daß humane Tumorzellen kein Potential haben, sich an die Oberflächenrezeptoren muriner Gewebe anzulagern, um dort eine Metastase zu bilden. Ebenfalls erwähnt werden muß die Tatsache, daß das Tumorgewebe nicht in der Niere sondern subkutan herangewachsen ist. Möglicherweise verhält sich Nierengewebe in orthotroper Lokalisation anders.

5.7 Proteindaten

Der einzige kommerziell erhältliche VHL-Antikörper erwies sich für eine Western-Blot Hybridisierung als nicht geeignet. Es kam zu einer unspezifischen Hybridisierung mit dem mitgelieferten Sekundärantikörper. Aufgrund dieser Eigenschaft, die auch von anderen Autoren beschrieben wird (186), wurde in dieser Arbeit ein immunhistochemischer Nachweis des VHL- und VEGF-Proteins durchgeführt. Dazu wurde an die beiden Genprodukte ein spezifischer Antikörper gebunden und diese Komplexe mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den Western Blots war der immunhistochemische Nachweis der beiden Proteine so sensitiv, daß man daraus Rückschlüsse auf die Expression von pVHL und pVEGF ziehen kann. Anhand der immunhistochemischen Ergebnisse zeigte sich, daß die zelluläre Lokalisation des VHL-Genproduktes variieren kann. Es scheint eine Verschiebung der Lokalisation zwischen Kern und Cytoplasma in Abhängigkeit von der Wachstumsdichte der Zellen zu bestehen. Im Zentrum einer *Monolayer*-Kultur mit großer Zelldichte wurde hauptsächlich eine cytoplasmatische Lokalisation des VHL-Proteins detektiert, während in einzeln liegenden Zellen am Rand des Kulturgefäßes auch nukleäre Expression des VHL-Genproduktes gefunden werden konnte. Diese Beobachtungen decken sich mit bekannten Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen, die dieses Phänomen ebenfalls beschreiben (73; 77). Die Bedeutung des unterschiedlichen Auftretens des VHL-Genproduktes ist bislang unklar. Diskutiert werden sowohl die Möglichkeit, daß pVHL ein Transportprotein ist, welches andere Proteine, wie z. B. angiogene Faktoren, durch die Kernmembran schleust (77). Eine andere Hypothese besagt, daß der bereits angesprochene VHL-Elongin B/C-Cul-2-Komplex im Nukleus an Target mRNAs bindet, für deren Abbau im Cytoplasma er dann verantwortlich ist (140). Es gilt nun nachzuweisen, welche der möglichen Funktionen des VHL-Proteins mit seiner zellulären Lokalisation korreliert und ob eventuell Unterschiede der Lokalisation bei verschiedenen Tumorformen auftreten (187).

5.8 Potentielle Interaktionen von VHL mit potentiellen Targetgenen

Von den drei Genen, deren mögliche Interaktion mit VHL untersucht wurde, zeigte vor allem VEGF eine große Wechselwirkung mit VHL. Die gegenseitige Abhängigkeit der beiden Gene konnte sehr gut nachgewiesen werden. Dabei ergab sich ein direkter Hinweis auf den „*Angiogenic Switch*“, wie er von Folkman postuliert wurde (86). Diese Hypothese beruht dabei auf der Tatsache, daß in einem gesunden Organismus Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese in einem Gleichgewicht stehen. Durch Mutationen und/ oder veränderten Expressionsregulationen kann sich auf der einen oder anderen Seite ein Übergewicht ergeben, das eine Verstärkung oder Verminderung der Angiogenese zur Folge hat (Abb. 25).

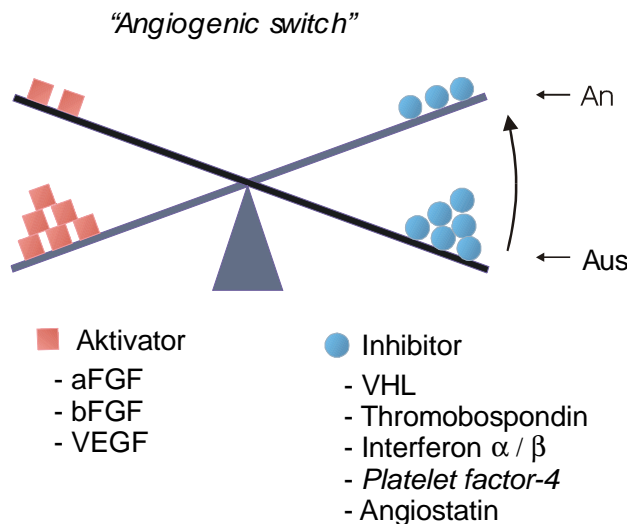


Abb. 25: *Angiogenic Switch* nach Folkman, 1996 (86); die Hypothese besagt, daß Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese im Normalfall im Gleichgewicht stehen. Überwiegt jedoch die eine oder andere Seite, so wirkt sich das entweder fördernd oder hemmend auf das Kapillarwachstum eines Gewebes aus.

Bekommt einer der Inhibitoren das Übergewicht, so können Krankheiten auftreten, die auf eine mangelnde Gefäßversorgung zurückzuführen sind (Kap. 1), verschiebt sich das Gleichgewicht jedoch zu Gunsten der Aktivatoren, so treten Läsionen auf, die durch verstärktes Kapillarwachstum gekennzeichnet sind (z. B. Hämangiome oder vaskularisierte Tumoren).

Eine gesteigerte Angiogenese in einem Gewebe, in dem bereits eine *in situ*-Läsion vorliegt, kann zu einer optimalen Versorgung der entarteten Zellen führen, was das ungehinderte Heranwachsen eines Tumors zur Folge haben kann. In den hier vorgestellten *in vivo*-Studien wurde durch die Transfektion von VEGF die Expressionsrate dieses Gens erhöht. Die Folge waren stark durchblutete Tumoren, die durch schnelles Wachstum charakterisiert waren. Umgekehrt zeigten Zellen, die das VHL Wildtyp-Protein exprimierten, ein langsames Wachstum, die Tumoren waren nicht gut vaskularisiert.

Um sicherzugehen, daß die beiden Gene VHL und VEGF in direkter Abhängigkeit stehen, wurden Zelllinien, die zuvor mit VEGF transfiziert waren, nachträglich mit VHL transfiziert und ihr Wachstumsverhalten beobachtet. Dabei zeigte sich, daß völlig unterschiedliche Wachstumsraten zwischen VEGF-transfizierten und VHL-VEGF-transfizierten Zellen auftraten. Die zusätzliche Expression von VHL bewirkte ein wesentlich langsames Wachstum als die Kontrollzellen, die nur mit VEGF transfiziert wurden.

Weiterhin bewirkt die Expression einer VHL-*antisense*-mRNA eine Verminderung der intrazellulären pVHL-Konzentration, was zu einem gleichzeitigen Anstieg der VEGF-mRNA führt.

Eine grafische Zusammenfassung der Ergebnisse ist auf der folgenden Seite gezeigt (Abb. 26):

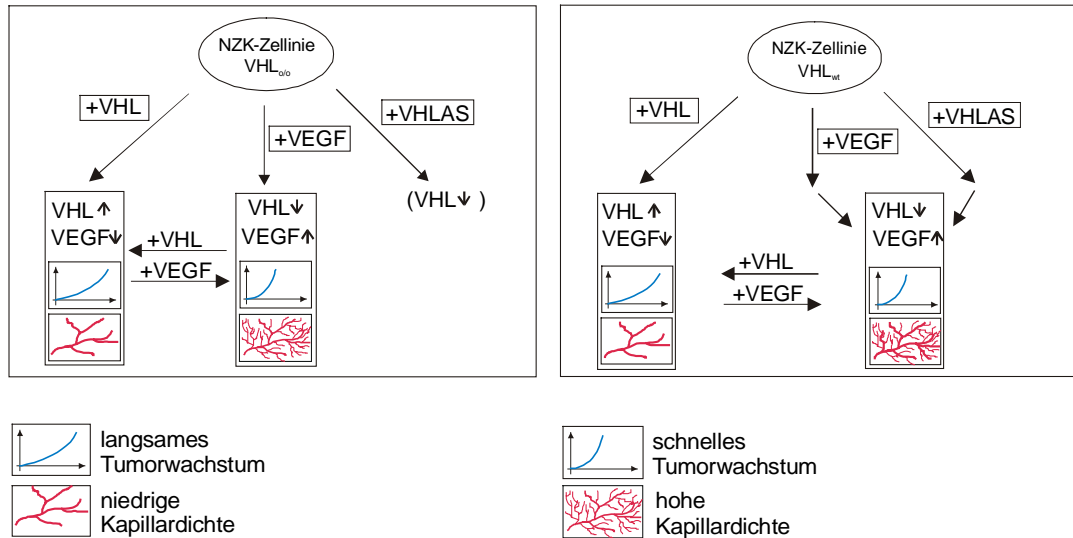


Abb. 26: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den *in vitro* und *in vivo* Studien. Der linke Teil der Abbildung zeigt die Veränderungen bei VHL-defizienten Zelllinien: Nach Transfektion mit der VHL-cDNA steigen die mRNA-Konzentration und die Translation von pVHL, gleichzeitig verringern sich beide Faktoren bei VEGF. Die Xenotransplantate wachsen langsam und sind nur schwach vaskularisiert.

Eine Transfektion mit VEGF-cDNA bewirkt ein Absinken der VHL-mRNA und des VHL-Genproduktes, hingegen steigen beide Parameter bei VEGF. Die Xenotransplantate wachsen schnell und sind mit vielen Blutgefäßen durchzogen. Eine nachträgliche Transfektion mit dem jeweils anderen Gen führt zu den gezeigten Expressions- und Translationsveränderungen, auch die Tumoren aus zweifach transfizierten Zellen zeigen eine andere Wachstumsgeschwindigkeit und Kapillardichte. Die Transfektion von VHLAS hat auf das mutierte VHL-Gen keine Auswirkungen, es kommt lediglich zu einem Absinken der (mutierten) VHL-mRNA, jedoch sind keine Veränderungen des Tumorwachstums in den Versuchstieren nachweisbar.

Der rechte Teil der Abbildung zeigt die Effekte nach Transfektion einer VHL-Wildtyp-Zelllinie: VHL_{cds} bewirkt einen Anstieg der VHL-mRNA und des -Proteins, VEGF wird gleichzeitig downreguliert. Die Tumoren aus den Versuchstieren sind schwach vaskularisiert und wachsen verhältnismäßig langsam (vgl. Abb. 16). Die Transfektion mit VEGF oder VHLAS bewirkt bei dieser Zelllinie einen Anstieg von VEGF und ein Absinken von VHL. Zudem führt diese Transfektion zu gut vaskularisierten, schnell wachsenden Tumoren. Auch hier treten nach einer zweiten Transfektion mit dem jeweils anderen Gen *in vitro* die umgekehrten Effekte auf.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß VHL und VEGF in einem direkten Zusammenhang stehen, wobei eine inverse Regulation zu bestehen scheint. Zudem lassen sich Expression und Translation der beiden Gene durch Transfektion gegenseitig beeinflussen.

Ein Zusammenhang zwischen einer Expressionsminderung von VHL bei gleichzeitigem mRNA-Anstieg der beiden Onkogene c-fos und c-myc ließ sich durch die *in vitro* und *in vivo* Versuche nicht beweisen. Vielmehr traten Unregelmäßigkeiten bei der Expression der untersuchten mRNAs auf, die keine Interpretation der Daten zulassen. Es scheint, als ob die Expressionsregulation der beiden Onkogene neben dem VHL-abhängigen Mechanismus noch von anderen Faktoren abhängt. Möglicherweise gibt es innerhalb des Zellzyklus zeitliche Unterschiede bei der Transkription. Das könnte bedeuten, daß VHL, c-fos und c-myc in einigen Fällen interagieren, unter bestimmten Bedingungen jedoch nicht. Diese Hypothese zu untersuchen, muß das Ziel weiterer Forschung sein.

5.9 Antiangiogenetische Forschungen als Perspektive für eine Krebstherapie

Obwohl die Angiogenese seit etwa 25 Jahren erforscht wird, sind zentrale Fragen bislang offen. So weiß man trotz neu entdeckter Substanzen, welche antiangiogenetische Wirkung zeigen (85; 188), heute noch zu wenig darüber, wie sich der Prozeß der Gefäßneubildung kontrollieren ließe, bzw. wie man ihm entgegenwirken könnte. So ist beispielsweise noch nicht geklärt, wieso manche Tumoren (Cervixkarzinom) mit der Produktion von VEGF-mRNA und mit der Gefäßneubildung wesentlich früher beginnen als andere (189). Außerdem weiß man heute noch nicht, ob die neu entdeckten Angiogeneseinhibitoren einer klinischen Prüfung standhalten können. Substanzen, die sich bei der Maus negativ auf das Kapillarwachstum auswirken, müssen nicht zwingend beim Menschen eine antiangiogene Wirkung zeigen. Trotzdem kann dieser Ansatz als zusätzliche Möglichkeit der Krebsbekämpfung angesehen werden. Die Entdeckung neuer Angiogenesehemmer könnte auch gegen andere angiogene Krankheiten, wie z. B. Diabetes oder verschiedene benigne Tumoren, zum Einsatz kommen. Weitere Studien an möglichen Genen, die als Gegenspieler von VEGF wirken, sind deshalb sinnvoll. Hierbei könnte sich das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgen als ein geeigneter Kandidat erweisen.

Nach den vorliegenden Daten aus den *in vivo* Versuchen besteht eine Interaktion der beiden Genprodukte. Die Transfektion des VHL TSGs in Tumoren, die VHL-defizient und durch starke Vaskularisierung gekennzeichnet sind, bewirkt eine Abschwächung des Kapillarnetzes, mit dem der Wirtsorganismus (SCID-Maus) den Tumor versorgt (Abb. 17). Tumoren, die eine verstärkte VHL-Expression aufweisen, wachsen außerdem wesentlich langsamer, als Tumoren ohne funktionierendes VHLwt-Protein (Abb. 16).

Das VHL-Genprodukt hat demnach eine antiangiogenetische Funktion. Wünschenswert wäre eine Methode, bei der man sich diese Funktion des VHL-Genproduktes zu Nutze machen könnte, um angiogene Vorgänge in einem Tumor zu unterbinden. Ein Absterben des Tumors durch mangelnde Versorgung wäre ein guter Therapieerfolg. Ähnliche Wirkungen wurden bereits für andere potentielle Angiogeneseinhibitoren dokumentiert (85; 188; 190).

Leider sind die bislang bekanntesten Kandidaten (Angiostatin und Endostatin) nur in Tierversuchen erfolgversprechend angewendet worden (191-193). In klinischen Studien wurden noch keine Ergebnisse erzielt, sodaß die Frage aufkommt, ob die beiden Faktoren eventuell im menschlichen Organismus keine antiangiogenen Eigenschaften aufweisen.

Neben Angiostatin und Endostatin werden zur Zeit noch weitere Faktoren mit antiangiogenetischer Wirkung getestet – selbst Thalidomid ist in den Focus der modernen Krebsforschung gerückt – jedoch wurden bislang keine durchbrechenden Therapieerfolge erzielt. Aus diesem Grund sollte vielleicht das VHL-Genprodukt bei der Suche nach Kandidaten für eine Gentherapie stärker berücksichtigt werden. Möglicherweise ist dieses Protein geeignet, die Blutgefäßversorgung solider und stark vaskularisierter Tumoren einzuschränken, um damit zur Heilung dieser Krebserkrankung beizutragen.

5.10 Ausblick

Zur Aufklärung der Pathogenese des sporadischen Nierenzellkarzinoms müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Vor allem NZKs mit verminderter Expression des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens werden weiterhin im Focus unserer Forschung stehen. Dabei wird der Schwerpunkt auf der Quantifizierung von RNA- und Proteinkonzentration vor, bzw. nach Transfektion mit VHL und/ oder VEGF liegen.

Genregulationsuntersuchungen finden in der modernen Medizin immer mehr Beachtung. Man kennt heute zahlreiche genetisch bedingte Erkrankungen, die sich auf weitere Generationen vererben können. In diesem Zusammenhang werden vor allem hereditäre Krebsformen immer interessanter. Somit bekommt auch das von Hippel-Lindau Syndrom, dessen Inzidenz mit etwa 1: 39.000 in der Bevölkerung eher niedrig ist, große Bedeutung für die moderne Krebsforschung. Denn aufgrund der starken Expression des VHL-Gens in anderen Organen (53), die von sporadischen Tumoren betroffen sein können (Lunge, Gehirn, Prostata), verdient es große Beachtung. Außerdem besteht der Verdacht, daß Mutationen des VHL-Gens durch chemische Substanzen (TRI, Trichlorethylen) induziert werden können (194-196). Die Grundlagenforschung mit diesem Gen ist deshalb ein wichtiger Aspekt innerhalb der modernen Medizin. Daraus können Erkenntnisse gewonnen werden, die möglicherweise in Zukunft auf häufigere Erbkrankheiten übertragbar sind. Es wäre als großer Erfolg anzusehen, wenn mit der Aufklärung des Pathomechanismus des VHL-Genproduktes neben den NZKs auch andere sporadische Tumorformen mit nachweisbaren VHL-Mutationen, wie z. B. Colon- oder Lungenkarzinome, sowie Hämangioblastome des ZNS therapiert werden könnten (197-200). Aufbauend auf den dargestellten Ergebnissen können weitere funktionelle Studien angeschlossen werden, die sich mit dem Pathomechanismus und der Regulation des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens befassen:

Zunächst werden die Xenograftstudien mit möglichst großer Fallzahl vervollständigt, wobei vor allem zusätzlichen Kotransfektionen eine große Bedeutung zukommt.

Besondere Berücksichtigung finden hierbei die Kotransfektionen von VHLcds und VEGF, bzw. VHLAS und VHLcds (s. Abb. 14). Diese Versuche sind bisher für die Zelllinien KTCTL-26A, Caki-1, 786-0 und 293 durchgeführt worden. Es ist geplant, diese Studien mit den Zelllinien Caki-2 und A-498 zu vervollständigen. Außerdem ist

die Untersuchung von Zelllinien anderer sporadischer Tumorformen mit verminderter VHL-Expression (Lunge, Dickdarm) ein interessanter zusätzlicher Ansatz.

Die entstehenden Tumoren müssen molekularbiologisch sowie pathologisch aufgearbeitet werden und bezüglich der verschiedenen Veränderungen von VHL und VEGF untersucht werden. Zusätzlich sind ELISAs durchzuführen, mit denen das Blut der Versuchstiere auf seinen VEGF-Gehalt untersucht wird. Es interessiert hierbei besonders die Frage, ob ein humaner Tumor den Wirtsorganismus zur Bildung murinen VEGFs stimulieren kann. Um eine sichere Auskunft bezüglich der beiden Genprodukte von VHL und VEGF geben zu können, müssen Western Blot-Hybridisierungen mit neuen VHL-spezifischen Antikörpern (187) etabliert werden, die eine Quantifizierung der beiden Proteine erlauben.

Von besonderem Interesse ist auch das Auftreten der beiden Spleißprodukte des VHL-Gens und ob ihre unterschiedliche Lokalisation im Organismus (35; 53) in Zusammenhang mit einer Funktion des Genproduktes steht.

Um weitere Daten zu erhalten, die einen Aufschluß zur Tumorgenese geben, arbeiten wir im Moment daran, mit Hilfe des CreLox-Systems ein konditioniertes Tiermodell zu etablieren: Wir versuchen eine homozygote VHL-*knock out* Maus zu generieren, bei der das VHL-Gen unter Kontrolle eines nierenspezifischen Promotors steht (201; 202). Damit sollen zunächst einmal weitere Einblicke in die molekularpathologischen Ursachen und ihre klinischen Zusammenhänge aufgezeigt werden. Aus den sich daraus ergebenden Daten wollen wir ein Modell entwickeln, um die Etablierung einer Genterapie und die Entwicklung therapeutischer Proteine gegen das sporadische Nierenzellkarzinom zu beschleunigen.

6. Zusammenfassung

Nierenzellkarzinome sind häufig gekennzeichnet durch den Funktionsverlust des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens. Man kennt heute eine Reihe potentieller Kandidatengene, die in Wechselwirkung mit dem VHL-Genprodukt stehen.

Darunter fallen der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF, sowie die beiden zellulären Onkogene c-fos und c-myc.

Ein Zusammenhang zwischen VHL und VEGF läßt sich aus der Tatsache ableiten, daß klarzellige NZKs häufig gut vaskularisiert sind. Offensichtlich wird die Angiogenese in diesen Tumoren durch den Ausfall eines Regulationsproteins verstärkt. Eine verstärkte Expression von VEGF-mRNA in Tumoren mit verminderter VHL-mRNA ist für andere sporadische Tumoren (z. B. Hämangioblastome) bereits gezeigt worden.

Die Transkription der beiden Onkogene c-fos und c-myc wird über die Elongation reguliert. Da für pVHL eine Beteiligung an der Elongationsregulation schon beschrieben wurde, vermutet man einen Einfluß des VHL-TSGs auf die Expression dieser Onkogene.

Zur Aufklärung der molekularen Vorgänge, die zur Pathogenese des klarzelligen Nierenzellkarzinoms beitragen, wurden sechs NZK-Zelllinien untersucht. Mit Expressionsvektoren (pEGFP-N1, pcDNA3) wurden eine Reihe von Vektorkonstrukten generiert und in die Zelllinien hineintransfiziert, um das *in vitro* und *in vivo* Wachstumsverhalten vor und nach der Transfektion zu beobachten. Für die *in vivo* Studien wurden immunsupprimierte Mäuse verwendet (SCID). Sowohl die Wachstumsgeschwindigkeit, als auch die Expression von VHL und VEGF wurde bei den verschiedenen Ansätzen dokumentiert. Im Tierversuch lag ein Schwerpunkt zusätzlich auf möglichen Veränderungen der Kapillarisdichte der Tumoren. Außerdem wurden die Xenotransplantate histopathologisch bzgl. ihrer Gefäßdichte und der Expression der Genprodukte von VHL und VEGF untersucht. Mit Hilfe des GFP-Fusionsproteins wurden zusätzlich Hinweise auf die intrazelluläre Lokalisation des VHL-Genproduktes erbracht.

Nach Abschluß der vorliegenden Studien zeigte sich eine Abhängigkeit der beiden Gene VHL und VEGF. Sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Ansätze weisen auf eine Interaktion der beiden Gene hin. Dies läßt sich sowohl mit den Ergebnissen unserer RNA-Untersuchungen, wie auch mit dem immunhistochemischen Nachweis der beiden Proteine belegen. Es zeigte sich, daß die beiden Gene in inverser Korrelation zueinander

stehen. Eine Abschwächung des einen Gens durch eine Verringerung der intrazellulären mRNA hat die verstärkte Expression des anderen zur Folge.

So kam es beispielsweise durch Blockierung der VHL-mRNA mit einem komplementären *antisense*-Strang zu einer verstärkten Expression von VEGF-mRNA und zu einer erhöhten Bildung des VEGF-Genproduktes. Xenotransplantate aus den so veränderten Zellen waren zudem durch einen erhöhten Kapillarierungsgrad gekennzeichnet. Umgekehrt bewirkte die Transfektion des VHL-Gens in VHL-defiziente Zelllinien mit hoher Kapillarierung einen Rückgang der VEGF-Expression und eine Abnahme der Gefäßdichte. Damit konnte erstmalig die inverse Korrelation dieser beiden Gene experimentell gezeigt werden.

Die Frage nach einer Interaktion von pVHL mit den Genprodukten von c-fos und c-myc läßt sich jedoch nicht eindeutig beantworten. Die Expressionsveränderungen dieser Gene erfolgten scheinbar willkürlich, eine Interaktion konnte nicht bestätigt werden.

Die Lokalisation des VHL-Genproduktes war von Fall zu Fall unterschiedlich, ein Zusammenhang mit den verschiedenen Funktionen (u. a. Proteindegradation, Proteintransport, Zellzykluskontrolle) des VHL-Gens ist demnach wahrscheinlich. So variierte die zelluläre Lokalisation des VHL-Proteins *in vitro* in Abhängigkeit von der Dichte der Zellkultur. Auch in den Xenotransplantaten wurde pVHL in Kern und Cytoplasma gefunden. In der Literatur wird für pVHL unter anderem eine Rolle als Transportprotein für andere Proteine zwischen Nukleus und Cytoplasma postuliert. Diese Hypothese wird durch die unterschiedliche Lokalisation des VHL-Proteins in der Zelle gestützt.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgen eine Rolle bei der Kontrolle der Angiogenese spielt, eine Interaktion mit VEGF ist mehr als wahrscheinlich. Dabei scheint auch ein negativer *feedback* Effekt der beiden Gene zu bestehen. Die Expression des einen Gens kann nach den dargestellten Ergebnissen auch durch nachträgliche Transfektion des anderen Gens verringert werden. Es scheint, als ob die Regulation über die Gendosis, d. h. über die Menge frei verfügbarer mRNA im Fließgleichgewicht der Zelle erfolgt.

Zukünftig sind deshalb bei der Aufklärung des Pathomechanismus von Nierenzellkarzinomen Untersuchungen wichtig, die dem von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgen als Angiogeneseinhibitor eine zentrale Bedeutung bei der Heilung sporadischer Tumoren mit starker Vaskularisierung beimessen.

7. Literatur

1. Meloni, A., Bridge, J., and Sandberg, A.A. Reviews on Chromosome Studies in Urological Tumors. I. Renal Tumors. *J.Urol.*, 148: 253-265, 1992.
2. Balzarini, P., Dal-Cin, P., Roskams, T., Polito, P., Van-Poppel, H., Van-Damme, B., Baert, L., and Van-den-Berghe, H. Histology may depend on the presence of partial monosomy or partial trisomy 3 in renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.*, 105: 6-10, 1998.
3. Grawitz, P. Die sogenannten Lipome der Nieren. *Virchows.Arch.path.Anat.*, 93: 39-62, 1883.
4. Weiss, L.M., Gelb, A.B., and Medeiros, L.J. Adult Renal Epithelial Neoplasms. *Anatomic Pathology*, 103: 624-635, 1994.
5. McLaughlin, J.K., Mandel, J.S., Blot, W.J., Schuman, L.M., Mehl, E.S., and Fraumeni, J.F., Jr. A population--based case--control study of renal cell carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.*, 72: 275-284, 1984.
6. Rodriguez, R.F., Diez, C.F., Martin, M.A., Abad, J.I., and Berian, J.M. Incidentally detected renal cell carcinoma. *Br.J Urol.*, 78: 29-32, 1996.
7. Franklin, J.R., Figlin, R., and Belldegrun, A. Renal cell carcinoma: basic biology and clinical behavior. *Semin.Urol.Oncol.*, 14: 208-215, 1996.
8. Richie, J.P., Stolbach, L., Atkins, M.B., and Rose, M.A. Cancer of the kidney. In: R.T. Osteen (ed.), *Cancer Manual*, pp. 274-283, Boston: American Cancer Society. 1990.
9. Ohjimi, Y., Iwasaki, H., Ishiguro, M., Hara, H., Ohgami, A., Kikuchi, M., and Kaneko, Y. Deletion (X)(p11): Another Case of Renal Adenocarcinoma with Involvement of Xp11. *Cancer Genet Cytogenet.*, 70: 77-78, 1993.
10. Sene, A.P., Hunt, L., McMahon, R.F., and Carroll, R.N. Renal carcinoma in patients undergoing nephrectomy: analysis of survival and prognostic factors. *Br.J.Urol.*, 70: 125-134, 1992.
11. Henschler, D., Vamvakas, S., Lammert, M., Dekant, W., Kraus, B., Thomas, B., and Ulm, K. Increased incidence of renal cell tumors in a cohort of cardboard workers exposed to trichloroethene. *Arch Toxicol.*, 69: 291-299, 1995.
12. Dayal, H. and Kinman, J. Epidemiology of kidney cancer. *Semin.Oncol.*, 10: 366-377, 1983.
13. La Vecchia, C., Negri, E., D'Avanzo, B., and Franceschi, S. Smoking and Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.*, 50 : 5231-5233, 1991.
14. Abi Aad, A.S., Belldegrun, A.S., and deKernion, J.B. Renal cell carcinoma: physiology, diagnosis and therapy. *World J.Urol.*, 9: 168-172, 1991.

15. Lümmen, G., Goepel, M., Mollhoff, S., Hinke, A., Otto, T., and Rübber, H. Phase II study of interferon-gamma versus interleukin-2 and interferon-alpha 2b in metastatic renal cell carcinoma. *J Urol.*, 155: 455-458, 1996.
16. Lümmen, G., Sperling, H., Luboldt, H., Otto, T., and Rübber, H. Interferon-alpha and Interferon-gamma in Advanced Renal Cell Carcinoma: Treatment Results, Survival, and Prognostic Factors in 81 Patients. *Onkologie*, 20: 466-471, 1997.
17. Motzer, R.J., Bander, N.H., and Nanus, D.M. Renal-cell carcinoma. *N.Engl. J.Med.*, 335: 865-875, 1996.
18. Schuler, M. and Huber, Ch. Immuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms. *Onkologie*, 4: 251-255, 1998.
19. Thoenes, W. and Storkel, S. [Pathology of benign and malignant renal cell tumors]. *Urologe A*, 30: W41-W50; 1991.
20. Guinan, P.D., Vogelzang, N.J., Fremgen, A.M., Chmiel, J.S., Sylvester, J.L., Sener, S.F., and Imperato, J.P. Renal cell carcinoma: tumor size, stage and survival. Members of the Cancer Incidence and End Results Committee. *J.Urol.*, 1995.
21. Thoenes, W., Storkel, S., and Rumpelt, H.J. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol Res.Pract.*, 181: 125-143, 1986.
22. Störkel, S., Eble, J., Adlakha, K., Amin, M., Blute, M., Bostwick, D.G., Darson, M., Delahunt, B., and Iczkowski, K. Report of Workgroup 1. Classification of Renal Cell Cancer. *Cancer*, 1997.
23. Levinson, A.K., Johnson, D.E., Strong, L.C., Pathak, S., Huff, V., and Saunders, G.F. Familial renal cell carcinoma: hereditary or coincidental. *J.Urol.*, 144: 849-851, 1990.
24. Li, F.P., Decker, H.J., Zbar, B., Stanton, V.P.J., Kovacs, G., Seizinger, B.R., Aburatani, H., Sandberg, A.A., Berg, S., Hosoe, S., and Brown, R.S. Clinical and genetic studies of renal cell carcinomas in a family with a constitutional chromosome 3;8 translocation. *Genetics of familial renal carcinoma. Ann.Intern.Med.*, 118: 106-111, 1993.
25. Maher, E.R. and Yates, J.R.W. Familial renal cell carcinoma: clinical and molecular genetic aspects. *Br.J.Cancer*, 63: 176-179, 1991.

26. Maher, E.R., Iselius, L., Yates, J.R., Littler, M., Benjamin, C., Harris, R., Sampson, J., Williams, A., Ferguson Smith, M.A., and Morton, N. Von Hippel-Lindau disease: a genetic study. *J.Med Genet*, 28: 443-447, 1991.
27. von Hippel, E. Vorstellung eines Patienten mit einem sehr ungewöhnlichen Netzhaut- bzw. Aderhautleiden. *Ber.dtsch.ophtal.Ges.*, 24: 269-269, 1895.
28. Lindau, A. Studien über Kleinhirncysten. Bau, Pathogenese und Beziehung zur Angiomatosis retinae. *Acta pathol.microbiol.scand.*, 1926.
29. Webster, A.R., Maher, E.R., and Moore, A.T. Clinical characteristics of ocular angiomatosis in von Hippel-Lindau disease and correlation with germline mutation. *Arch.Ophthalmol.*, 117: 371-378, 1999.
30. Maher, E.R. and Kaelin, W.G., Jr. von Hippel-Lindau disease. *Medicine Baltimore.*, 76: 381-391, 1997.
31. Melmon, K.L. and Rosen, S.W. Lindau's Disease. Review of the Literature and Study of a Large Kindred. *Am.J.Med.*, 36: 595-617, 1964.
32. Decker, H.J., **Weidt, E.J.**, and Brieger, J. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. A rare and intriguing disease opening new insight into basic mechanisms of carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet*, 93: 74-83, 1997.
33. Piotrowski, W. and Röhrborn, G. Eine Familienstudie des klassischen Falles von v. Hippel-Lindau Syndroms. *Langenbecks Arch Klin Chir*, 311: 310-322, 1965.
34. Brauch, H., Kishida, T., Glavac, D., Chen, F., Pausch, F., Höfler, H., Latif, F., Lerman, M., Zbar, B., Neumann, H.P.H., Hofler, H., Lerman, M.I., and Neumann, H.P. von Hippel-Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. *Hum Genet*, 95: 551-556, 1995.
35. Neumann, H.P., Lips, C.J., Hsia, Y.E., and Zbar, B. Von Hippel-Lindau syndrome. *Brain Pathol*, 5: 181-193, 1995.
36. Herman, J.G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M.I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D.S., Gnarr, J.R., Linehan, W.M., et al, and et al Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl.Acad Sci.U.S.A*, 91: 9700-9704, 1994.
37. Krumm, A. and Groudine, M. Tumor suppression and transcription elongation: the dire consequences of changing partners. *Science*, 269: 1400-1401, 1995.

38. Witzigmann Voos, S., Breier, G., Risau, W., and Plate, K.H. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res.*, 55: 1358-1364, 1995.
39. Plate, K.H. and Risau, W. Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia*, 15: 339-347, 1995.
40. Schoenfeld, A., Davidowitz, E.J., and Burk, R.D. A second major native von Hippel-Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95: 8817-8822, 1998.
41. **Weidt, E.J.**, Brieger, J., Schwerdtle, R.F., Huber, C., and Decker, H.J.H. Downregulation of the VHL tumor suppressor gene mRNA might be responsible for the upregulation of VEGF and several oncogenes in renal cell carcinomas. *European Journal of Cell Biology*, 75: 10 [26]1998.
42. Pause, A., Lee, S., Worrell, R.A., Chen, D.Y., Burgess, W.H., Linehan, W.M., and Klausner, R.D. The von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins. *Proc Natl.Acad Sci.U.S.A.*, 94: 2156-2161, 1997.
43. Liakopoulos, D., Busgen, T., Brychzy, A., Jentsch, S., and Pause, A. Conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8 to cullin-2 is linked to von Hippel-Lindau tumor suppressor function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96: 5510-5515, 1999.
44. Kamura, T., Koepp, D.M., Conrad, M.N., Skowyra, D., Moreland, R.J., Iliopoulos, O., Lane, W.S., Kaelin-WG, J., Elledge, S.J., Conaway, R.C., Harper, J.W., and Conaway, J.W. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science*, 284: 657-661, 1999.
45. Skowyra, D., Koepp, D.M., Kamura, T., Conrad, M.N., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Elledge, S.J., and Harper, J.W. Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1. *Science*, 284: 662-665, 1999.
46. Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., and Ratcliffe, P.J. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399: 271-275, 1999.
47. Krieg, M., Marti, H.H., and Plate, K.H. Coexpression of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in nervous system tumors associated with von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Blood*, 92: 3388-3393, 1998.

48. Pal, S., Claffey, K.P., Cohen, H.T., and Mukhopadhyay, D. Activation of Sp1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor transcription requires specific interaction with protein kinase C zeta. *J Biol.Chem.*, 273: 26277-26280, 1998.
49. Arico, M. Acute megakaryoblastic leukemia and clonal trisomy 21 in a phenotypically normal infant. *Blood*, 77: 2542-2543, 1991.
50. Knudson, A.G.Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 68: 820-823, 1971.
51. Comings, D.E. A general theory of carcinogenesis. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*, 12: 3324-3328, 1973.
52. Cavenee, W.K., Dryja, T.P., Phillips, R.A., Benedict, W.F., Godbout, R., Gallie, B.L., Murphee, A.L., Strong, L.C., and White, R.L. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, 305: 779-784, 1983.
53. Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Masahiro, Y., Duh, F.M., Orcutt, M.L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., Schmidt, L., Zhou, F., Li, H., Wei, M.H., Chen, F., Glenn, G., Choyke, P., Walther, M.M., Weng, Y., Duan, D.S.R., Dean, M., Glavac, D., Richards, F.M., Crossey, P.A., Ferguson-Smith, M.A., Paslier, D.L., Chumakov, I., Cohen, D., Chinault, C., Maher, E., Linehan, W.M., Zbar, B., and Lerman, M.I. Identification of the von Hippel-Lindau Disease Tumor Suppressor Gene. *Science*, 260: 1317-1320, 1993.
54. Shimizu, M., Yokota, J., Mori, N., Shuin, T., Shinoda, M., Terada, M., and Oshimura, M. Introduction of normal chromosome 3p modulates the tumorigenicity of a human renal cell carcinoma cell line YCR. *Oncogene*, 5: 185-194, 1990.
55. Yoshida, M.A., Shimizu, M., Ikeuchi, T., Tonomura, A., Yokota, J., and Oshimura, M. In vitro growth suppression and morphological change in a human renal cell carcinoma cell line by the introduction of normal chromosome 3 via microcell fusion. *Mol Carcinog.*, 9: 114-121, 1994.
56. Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S., and Kaelin, W.G. Tumour suppression by the human von Hippel Lindau gene product. *Nature Medicine*, 1: 822-826., 1995.
57. Chen, F., Kishida, T., Duh, F.M., Renbaum, P., Orcutt, M.L., Schmidt, L., and Zbar, B. Suppression of growth of renal carcinoma cells by the von Hippel- Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res.*, 55: 4804-4807, 1995.

58. Kiechle-Schwarz, M., Neumann, H.P., Decker, H.J., Dietrich, C., Wullich, B., and Schempp, W. Cytogenetic studies on three pheochromocytomas derived from patients with von Hippel-Lindau syndrome. *Hum Genet*, 82: 127-130, 1989.
59. Decker, H.J., Neumann, H.P., Walter, T.A., and Sandberg, A.A. 3p involvement in a renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau syndrome. Region of tumor breakpoint clustering on 3p. *Cancer Genet Cytogenet*, 33: 59-65, 1988.
60. King, C.R., Schimke, R.N., Arthur, T., Davoren, B., and Collins, D. Proximal 3p deletion in renal cell carcinoma cells from a patient with von Hippel-Lindau disease. *Cancer Genet Cytogenet*, 27: 345-348, 1987.
61. Decker, H.J., Gemmill, R.M., Neumann, H.P., Walter, T.A., and Sandberg, A.A. Loss of heterozygosity on 3p in a renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*, 39 : 289-293, 1989.
62. Seizinger, B.R., Smith, D.I., Filling Katz, M.R., Neumann, H., Green, J.S., Choyke, P.L., Anderson, K.M., Freiman, R.N., Klauck, S.M., Whaley, J., and et al Genetic flanking markers refine diagnostic criteria and provide insights into the genetics of Von Hippel Lindau disease. *Proc Natl.Acad Sci.U.S.A*, 88: 2864-2868, 1991.
63. Crossey, P.A., Richards, F.M., Foster, K., Green, J.S., Prowse, A., Latif, F., Lerman, M., Zbar, B., Affara, N.A., Ferguson-Smith, M.A., Maher, E.R., Lerman, M.I., Ferguson Smith, M.A., and et al Identification of intragenic mutations in the Von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Mol Genet*, 3,8 : 1303-1308, 1994.
64. Gnarr, J.R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M.H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F.M., Lubensky, I., Duan, D.R., Florence, C., Pozzatti, R., Walther, M.M., Bander, N.H., Grossman, H.B., Brauch, H., Pomer, S., Brooks, J.D., Isaacs, W.B., Lerman, M.I., Zbar, B., and Linehan, W.M. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nature Genet*, 7: 85-89, 1994.
65. Seizinger, B.R., Rouleau, G.A., Ozelius, L.J., Lane, A.H., Farmer, G.E., Lamiell, J.M., Haines, J., Yuen, J.W., Collins, D., Majoor Krakauer, D., and et al. Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature*, 332: 268-269, 1988.
66. Decker, H.J. and Störkel, St. Molekulargenetische Diagnostik und Histopathologie epithelialer Nierentumoren. *Onkologe*, 4: 214-220, 1998.
67. Gnarr, J.R., Lerman, M.I., Zbar, B., and Linehan, W.M. Genetics of renal-cell carcinoma and evidence for a critical role for von Hippel-Lindau in renal tumorigenesis. *Semin.Oncol.*, 22: 3-8, 1995.

68. **Weidt, E. J.** Nachweis des Verlustes der Expression des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens in sporadischen Nierenzellkarzinomen. 1996. Diplomarbeit
69. Kishida, T., Stackhouse, T.M., Chen, F., Lerman, M.I., and Zbar, B. Cellular proteins that bind the von Hippel Lindau disease gene product: Mapping of binding domains and the effect of missense mutations. *Cancer Research*, 55: 4544-4548., 1995.
70. Whaley, J.M., Naglich, J., Gelbert, L., Hsia, Y.E., Lamiell, J.M., Green, J.S., Collins, D., Neumann, H.P., Laidlaw, J., Li, F.P., and et al Germ-line mutations in the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene are similar to somatic von Hippel-Lindau aberrations in sporadic renal cell carcinoma *Am.J.Hum Genet*, 55: 1092-1102, 1994.
71. Kuzmin, I., Duh, F.M., Latif, F., Geil, L., Zbar, B., and Lerman, M.I. Identification of the promoter of the human von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Oncogene*, 10: 2185-2194, 1995.
72. Cohen, H.T., Zhou, M., Welsh, A.M., Zarghamee, S., Scholz, H., Mukhopadhyay, D., Kishida, T., Zbar, B., Knebelmann, B., and Sukhatme, V.P. An important von Hippel-Lindau tumor suppressor domain mediates Sp1-binding and self-association. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 266 : 43-50, 1999.
73. Duan, D.R., Humphrey, J.S., Chen, D.Y., Weng, Y., Sukegawa, J., Lee, S., Gnarr, J.R., Linehan, W.M., and Klausner, R.D. Characterization of the VHL tumor suppressor gene product: localization, complex formation, and the effect of natural inactivating mutations. *Proc Natl.Acad Sci.U.S.A*, 92: 6459-6463, 1995.
74. Gao, J., Naglich, J., Laidlaw, J., Whaley, J.M., Seizinger, B.R., Kley, N., and Naglich, J.G. Cloning and Characterization of a Mouse Gene with Homology to the Human von Hippel-Lindau Disease Tumor Suppressor Gene: Implications for the Potential Organization of the Human von Hippel-Lindau Gene. *Cancer Res.*, 55: 743-747, 1995.
75. Walker, C., AHN, Y.T., Everitt, J., and Yuan, X. Renal cell carcinoma development in the rat independent of alterations at the VHL gene locus. *Mol.Carcinog.*, 15: 154-161, 1996.
76. Pause, A., Lee, S., Lonergan, K.M., and Klausner, R.D. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95: 993-998, 1998.

77. Lee, S., Chen, D.Y.T., Humphrey, J.S., and Klausner, R.D. Nuclear/cytoplasmic localization of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product is determined by cell density. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 93: 1770-1775, 1996.
78. Folkman, J. and D'Amore, P.A. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *.Cell*, 87: 1153-1155, 1996.
79. Klagsbrun, M. Angiogenesis and cancer: AACR special conference in cancer research. American Association for Cancer Res. *Cancer Res.*, 59: 487-490, 1999.
80. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386: 671-674, 1997.
81. Plate, K.H., Breier, G., and Risau, W. Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol.*, 4: 207-218, 1994.
82. Benoy, I., Vermeulen, P., Wuyts, H., and Dirix, L. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) serum concentrations change according to the phase of the menstrual cycle. *Eur.J Cancer*, 34: 1298-1299, 1998.
83. Ferrara, N., Chen, H., Davis, S.T., Gerber, H.P., Nguyen, T.N., Peers, D., Chisholm, V., Hillan, K.J., and Schwall, R.H. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat.Med.*, 4: 336-340, 1998.
84. Cheresh, D.A. Death to a blood vessel, death to a tumor. *Nat.Med.*, 4: 395-396, 1998.
85. O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., and Folkman, J. Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* 88, 277-285. 1997.
86. Hanahan, D. and Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *.Cell*, 86: 353-364, 1996.
87. Dachs, G.U., Patterson, A.V., Firth, J.D., Ratcliffe, P.J., Townsend, K.M., Stratford, I.J., and Harris, A.L. Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nat.Med.*, 3: 515-520, 1997.
88. Maxwell, P.H., Dachs, G.U., Gleadle, J.M., Nicholls, L.G., Harris, A.L., Stratford, I.J., Hankinson, O., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 94: 8104-8109, 1997.

89. Weidner, N. and Folkman, J. Tumoral Vascularity as a Prognostic Factor in Cancer. In: V. De-Vita, S. Hellman and S.A. Rosenberg (eds.), *Important Advances in Oncology*, pp. 167-190, Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996.
90. O'Byrne, K.J., Dobbs, N., Propper, D., Smith, K., and Harris, A.L. Vascular endothelial growth factor platelet counts, and prognosis in renal cancer. *Lancet*, 353: 1494-1495, 1999.
91. Conn, G., Bayne, M.L., Soderman, D.D., Kwok, P.W., Sullivan, K.A., Palisi, T.M., Hope, D.A., and Thomas, K.A. Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 87: 2628-2632, 1990.
92. Arora, N., Masood, R., Zheng, T., Cai, J., Smith, D.L., and Gill, P.S. Vascular endothelial growth factor chimeric toxin is highly active against endothelial cells. *Cancer Res.*, 59: 183-188, 1999.
93. Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C., and Abraham, J.A. The human gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol.Chem.*, 266: 11947-11954, 1991.
94. Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Hayashi, Y., Yamashita, T., Yamashita, J., and Yamamoto, H. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol.Chem.*, 270: 28316-28324, 1995.
95. Fujimoto, K., Hosotani, R., Wada, M., Lee, J.U., Koshiba, T., Miyamoto, Y., Tsuji, S., Nakajima, S., Doi, R., and Imamura, M. Expression of two angiogenic factors, vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor in human pancreatic cancer, and its relationship to angiogenesis. *Eur.J Cancer*, 34: 1439-1447, 1998.
96. Takahashi, A., Sasaki, H., Kim, S.J., Tobisu, K.I., Kakizoe, T., Tsukamoto, T., Kumamoto, Y., Sugimura, T., and Terada, M. Markedly Increased Amounts of Messenger RNAs for Vascular Endothelial Associated Factor and Placenta Growth Factor in Renal Cell Carcinoma Associated Angiogenesis. *Cancer Res.*, 54: 4233-4237, 1994.
97. Suzuki, K., Hayashi, N., Miyamoto, Y., Yamamoto, M., Ohkawa, K., Ito, Y., Sasaki, Y., Yamaguchi, Y., Nakase, H., Noda, K., Enomoto, N., Arai, K., Yamada, Y., Yoshihara, H., Tujimura, T., Kawano, K., Yoshikawa, K., and Kamada, T. Expression of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor in Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.*, 3004-3009, 1996.

98. Berger, D.P., Herbstritt, L., Dengler, W.A., Marme, D., Mertelsmann, R., and Fiebig, H.H. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human tumor models of different histologies. *Ann Oncol.*, 6: 817-825, 1995.
99. Simon, M., Grone, H.J., Jhren, O., Kullmer, J., Plate, K.H., Risau, W., and Fuchs, E. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in human renal ontogenesis and in adult kidney. *Am J Physiol.*, 268: F240-F250, 1995.
100. Relf, M., LeJeune, S., Scott, A.E., Fox, S., Smith, K., Leek, R., Mogghadam, A., Whitehouse, R., Bicknell, R., and Harris, A.L. Expression of the Angiogenic Factors Vascular Endothelial Cell Growth Factor, Acidic and Basic Fibroblast Growth Factor, Tumor Growth Factor b-1, Plateled Derived Endothelial Cell Growth Factor, Placenta Growth Factor, and Pleiotropin in human Primary Brest Cancer and its Relation to Angiogenesis. *Cancer Resrarch*, 57: 963-969, 1997.
101. Sunderkotter, C., Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardwaj, R., and Sorg, C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc.Biol.*, 55: 410-422, 1994.
102. Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., and Semenza, G.L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol.Cell Biol.*, 16: 4604-4613, 1996.
103. Mukhopadhyay, D., Tsiokas, L., and Sukhatme, V.P. High cell density induces vascular endothelial growth factor expression via protein tyrosine phosphorylation. *Gene Expr.*, 7: 53-60, 1998.
104. Roberts, W.G. and Palade, G.E. Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res.*, 57: 765-772, 1997.
105. Nicol, D., Hii, S.I., Walsh, M., Teh, B., Thompson, L., Kennett, C., and Gotley, D. vascular endothelial growth factor expression is increased in renal cell carcinoma. *J.Urol.*, 157: 1482-1486, 1997.
106. Berse, B., Brown, L.F., Van-de-Water, L., Dvorak, H.F., and Senger, D.R. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol.Biol.Cell*, 3: 211-220, 1992.
107. Kramer, B.K., Bucher, M., Sandner, P., Ittner, K.P., Riegger, G.A., Ritthaler, T., and Kurtz, A. Effects of hypoxia on growth factor expression in the rat kidney in vivo. *Kidney Int.*, 51: 444-447, 1997.
108. Levy, A.P., Levy, N.S., Wegner, S., and Goldberg, M.A. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol.Chem.*, 270: 13333-13340, 1995.

109. Mukhopadhyay, D., Nagy, J.A., Manseau, E.J., and Dvorak, H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated signaling in mouse mesentery vascular endothelium. *Cancer Res.*, 58: 1278-1284, 1998.
110. Keyt, B.A., Nguyen, H.V., Berleau, L.T., Duarte, C.M., Park, J., Chen, H., and Ferrara, N. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol.Chem.*, 271: 5638-5646, 1996.
111. Fielder, W., Graeven, U., Ergun, S., Verago, S., Kilic, N., Stockschlader, M., and Hossfeld, D.K. Expression of FLT4 and its ligand VEGF-C in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 11: 1234-1237, 1997.
112. Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E.C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R.K., and Seed, B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell*, 94: 715-725, 1998.
113. Brekken, R.A., Huang, X., King, S.W., and Thorpe, P.E. Vascular endothelial growth factor as a marker of tumor endothelium. *Cancer Res.*, 58: 1952-1959, 1998.
114. Ohh, M., Takagi, Y., Aso, T., Stebbins, C.E., Pavletich, N.P., Zbar, B., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Kaelin-WG, J. Synthetic peptides define critical contacts between elongin C, elongin B, and the von Hippel-Lindau protein. *J.Clin.Invest.*, 104: 1583-1591, 1999.
115. Garrett, K.P., Tan, S., Bradsher, J.N., Lane, W.S., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. Molecular cloning of an essential subunit of RNA polymerase II elongation factor SIII. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91: 5237-5241, 1994.
116. Aso, T., Lane, W.S., Weliky, J., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. Elongin (SIII): A Multisubunit Regulator of Elongation by RNA Polymerase II. *Science*, 269: 1439-1443, 1995.
117. Reines, D., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. The RNA polymerase II general elongation factors. *Trends Biochem.Sci.*, 12: 351-356, 1996.
118. Takagi, Y., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. A novel activity associated with RNA polymerase II elongation factor SIII. SIII directs promoter-independent transcription initiation by RNA polymerase II in the absence of initiation factors. *J Biol.Chem.*, 270: 24300-24305, 1995.
119. Garrett, K.P., Aso, T., Bradsher, J.N., Foundling, S.I., Lane, W.S., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. Positive regulation of general transcription factor SIII by a tailed ubiquitin homolog. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 92: 7172-7176, 1995.

120. Takagi, Y., Pause, A., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. Identification of elongin C sequences required for interaction with the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J.Biol.Chem.*, 272: 27444-27449, 1997.
121. Krumm, A., Hickey, L.B., and Groudine, M. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II defines a general rate-limiting step after transcription initiation. *Genes Dev.*, 9: 559-572, 1995.
122. Spencer, C.A. and Groudine, M. Transcription elongation and eukaryotic gene regulation. *Oncogene*, 5: 777-785, 1990.
123. Aso, T., Haque, D., Barstead, R.J., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. The inducible elongin A elongation activation domain: structure, function and interaction with the elongin BC complex. *EMBO J.*, 15: 5557-5566, 1996.
124. Duan, D.R., Pause, A., Burgess, W.H., Aso, T., Chen, D.Y.T., Garrett, K.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Linehan, W.M., and Klausner, R.D. Inhibition Of Transcription Elongation By The VHL Tumor Suppressor Protein. *Science*, 269: 1402-1406., 1995.
125. Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J.A., and Kaelin, W.G. Binding Of The Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein To Elongin B And C. *Science*, 269: 1444-1446., 1995.
126. Stebbins, C.E., Kaelin-WG, J., and Pavletich, N.P. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science*, 284: 455-461, 1999.
127. Renbaum, P., Duh, F.M., Latif, F., Zbar, B., Lerman, M.I., and Kuzmin, I. Isolation and characterization of the full-length 3' untranslated region of the human von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Hum.Genet*, 98: 666-671, 1996.
128. Lee, S., Neumann, M., Stearman, R., Stauber, R., Pause, A., Pavlakis, G.N., and Klausner, R.D. Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for the function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol.Cell Biol.*, 19: 1486-1497, 1999.
129. Tsuchiya, H., Iseda, T., and Hino, O. Identification of a novel protein (VBP-1) binding to the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene product. *Cancer Res.*, 56: 2881-2885, 1996.
130. Neckers, L.M. aHIF: the missing link between HIF-1 and VHL? *J Natl.Cancer Inst.*, 91: 106-107, 1999.
131. Levy, A.P., Levy, N.S., and Goldberg, M.A. Hypoxia-inducible protein binding to vascular endothelial growth factor mRNA and its modulation by the von Hippel-Lindau protein. *J Biol.Chem.*, 271: 25492-25497, 1996.

132. Zubiaga, A.M., Belasco, J.G., and Greenberg, M.E. The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol.Cell Biol.*, 15: 2219-2230, 1995.
133. Roy, N., Laflamme, G., and Raymond, V. 5' untranslated sequences modulate rapid mRNA degradation mediated by 3' AU-rich element in v-/c-fos recombinants. *Nucleic.Acids.Res.*, 20: 5753-5762, 1992.
134. Shaw, G. and Kamen, R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective undegradation. *Cell*, 46: 659-667, 1986.
135. Wilson, T. and Treisman, R. removal of Poly(a) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU rich sequences. *Nature*, 336: 396-399, 1988.
136. Klein, N., Curatola, A.M., and Schneider, R.J. Calcium-induced stabilization of AU-rich short-lived mRNAs is a common default response. *Gene Expr.*, 7: 357-365, 1999.
137. Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G., and Schneider, R.J. Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, 284: 499-502, 1999.
138. Katz, D.A., Theodorakis, N.G., Cleveland, D.W., Lindsten, T., and Thompson, C.B. AU-A, an RNA-binding activity distinct from hnRNP A1, is selective for AUUUA repeats and shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Nucleic.Acids.Res.*, 22: 238-246, 1994.
139. Groulx, I., Bonicalzi, M.E., and Lee, S. Ran-mediated nuclear export of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein occurs independently of its assembly with cullin-2. *J.Biol.Chem.*, 275 : 8991-9000, 2000.
140. Lonergan, K.M., Iliopoulos, O., Ohh, M., Kamura, T., Conaway, J.W., and Kaelin, W.G., Jr. Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing Elongins B/C and Cul2. *Mol.Cell.Biol.*, 18: 732-741, 1998.
141. Levy, A.P., Levy, N.S., Iliopoulos, O., Jiang, C., Kaplin, W.G., Jr., and Goldberg, M.A. Regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia and its modulation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Kidney Int.*, 51: 575-578, 1997.
142. Brieger, J., **Weidt, E.J.**, Schirmacher, P., Storkel, S., Huber, C., and Decker, H.J. Inverse regulation of vascular endothelial growth factor and VHL tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinomas is correlated with vascular growth: an in vivo study on 29 tumors. *J.Mol.Med.*, 77: 505-510, 1999.

143. Raymond, R. and Millhorn, D. Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression during hypoxia: role of Ca²⁺ and PKC. *Kidney Int.*, *51*: 536-541, 1997.
144. Mukhopadhyay, D., Knebelmann, B., Cohen, H.T., Ananth, S., and Sukhatme, V.P. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. *Mol.Cell Biol.*, *17*: 5629-5639, 1997.
145. Kley, N., Gavin, B., Gao, J., Whaley, J., Naglich, J., and Seizinger, B.R. Characterization of the VHL Tumor Suppressor Gene and VHL Knock-Out Mice. Second International vHL Symposium.
146. Kessler, P.M., Vasavada, S.P., Rackley, R.R., Stackhouse, T., Duh, F.M., Latif, F., Lerman, M.I., Zbar, B., and Williams, B.R. Expression of the Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene, VHL, in human fetal kidney and during mouse embryogenesis. *Mol.Med.*, *1*: 457-466, 1995.
147. Gnarr, J.R., Ward, J.M., Porter, F.D., Wagner, J.R., Devor, D.E., Grinberg, A., Emmert Buck, M.R., Westphal, H., Klausner, R.D., and Linehan, W.M. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, *94*: 9102-9107, 1997.
148. Lammer, D., Mathias, N., Laplaza, J.M., Jiang, W., Liu, Y., Callis, J., Goebel, M., and Estelle, M. Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev.*, *12*: 914-926, 1998.
149. Kaelin-WG, J. Cancer. Many vessels, faulty gene. *Nature*, *399*: 203-204, 1999.
150. Cheng, L., Fu, J., Tsukamoto, A., and Hawley, R.G. Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nat.Biotechnol.*, *14*: 606-609, 1996.
151. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, *263*: 802-805, 1994.
152. Steipe, B. Das grün fluoreszierende Protein. *Biospektrum*, *1-97*: 28-30, 1997.
153. Sckell, A., Safabakhsh, N., Dellian, M., and Jain, R.K. Primary tumor size-dependent inhibition of angiogenesis at a secondary site: an intravital microscopic study in mice. *Cancer Res.*, *58*: 5866-5869, 1998.
154. Lieubeau-Teillet B., Rak, J., Jothy, S., Iliopoulos, O., Kaelin, W., and Kerbel, R.S. von Hippel-Lindau gene-mediated growth suppression and induction of differentiation in renal cell carcinoma cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.*, *58*: 4957-4962, 1998.

155. Bosma, G.C., Custer, R.P., and Bosma, M.J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, *301*: 527-530, 1983.
156. Freshney, R.I. *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. New York: A.R.Liss, 1987.
157. Pollard, J.W. and Walker, J.M. *Basic Cell Culture Protocols*. Humana Press, 1997.
158. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
159. Neuhaus, C. *Molekulargenetische und Chromosomale Untersuchungen von Nierenzellkarzinomen. Bedeutung des von Hippel-Lindau Tumorsuppressor-Genes*. 1996. Johannes Gutenberg - Universität Mainz. Thesis/Dissertation
160. Decker, H.J., Neuhaus, C., Jauch, A., Speicher, M., Ried, T., Bujard, M., Brauch, H., Storkel, S., Stockle, M., Seliger, B., and Huber, C. Detection of a germline mutation and somatic homozygous loss of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene in a family with a de novo mutation. A combined genetic study, including cytogenetics, PCR/SSCP, FISH, and CGH. *Hum.Genet.*, *97*: 770-776, 1996.
161. Brieger, J., **Weidt, E.J.**, Gansen, K., Decker-HJ, A.B., Univ, M., Dept, H., Obere, Z.S., Mainz, and Germany Detection of a novel germline mutation in the von Hippel-Lindau tumour-suppressor gene by fluorescence-labelled base excision sequence scanning (F-BESS). *ClinicalGenetics*, *56*: 210-215, 1999.
162. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *74*: 5463-5467, 1977.
163. Yang, F., Moss, L.G., and Phillips-GN, J. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat.Biotechnol.*, *14*: 1246-1251, 1996.
164. Brieger J., **Weidt E.J.**, and Decker J. Fast, non-toxic, and inexpensive n-butanol preparation of recombinant plasmids. *Genetics and Molecular Biology*, *23*, 2, 299-300, 2000.
165. Perlman, D. Use of antibiotics in cell culture media. *Methods Enzymol.*, *58*: 110-116, 1979.
166. Schold-SC, J., Kokkinakis, D.M., Rudy, J.L., Moschel, R.C., and Pegg, A.E. Treatment of human brain tumor xenografts with O6-benzyl-2'-deoxyguanosine and BCNU. *Cancer Res.*, *56*: 2076-2081, 1996.

167. Felker, G.M., Friedman, H.S., Dolan, M.E., Moschel, R.C., and Schold, C. Treatment of subcutaneous and intracranial brain tumor xenografts with O6-benzylguanine and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 32: 471-476, 1993.
168. MacLeod, M.C. A possible role in chemical carcinogenesis for epigenetic, heritable changes in gene expression. *Mol Carcinog.*, 15: 241-250, 1996.
169. Graff, J.R., Herman, J.G., Myohanen, S., Baylin, S.B., and Vertino, P.M. Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *J.Biol.Chem.*, 272: 22322-22329, 1997.
170. Schroeder, M. and Mass, M.J. CpG methylation inactivates the transcriptional activity of the promoter of the human p53 tumor suppressor gene. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 235: 403-406, 1997.
171. Brauch, H., Weirich, G., Brieger, J., Glavac, D., Rodl, H., Eichinger, M., Feurer, M., Weidt, E., Puranakanittha, C., Neuhaus, C., Pomer, S., Brenner, W., Schirmacher, P., Storkel, S., Rotter, M., Maser, A., Gugeler, N., and Decker, H.J. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: Association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res.*, 60: 1942-1948, 2000.
172. Bertherat, J. Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and transcription elongation: new insights into regulation of gene expression. *Eur.J.Endocrinol.*, 134: 157,159, 1996.
173. Plet, A., Eick, D., and Blanchard, J.M. Elongation and premature termination of transcripts initiated from c-fos and c-myc promoters show dissimilar patterns. *Oncogene*, 10: 319-328, 1995.
174. Aso, T., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. Role of core promoter structure in assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. A common pathway for formation of preinitiation intermediates at many TATA and TATA- less promoters. *J.Biol.Chem.*, 269: 26575-26583, 1994.
175. Klein, C. and Struhl, K. Increased recruitment of TATA-binding protein to the promoter by transcriptional activation domains in vivo. *Science*, 266: 280-282, 1994.
176. Clifford, S.C., Prowse, A.H., Affara, N.A., Buys, C.H., and Maher, E.R. Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumourigenesis. *Genes Chromosomes.Cancer*, 22: 200-209, 1998.
177. Dynan, W.S. and Tjian, R. Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell*, 32: 669-680, 1983.

178. Mantovani, R. An RNA polymerase II in vitro transcription system. *Methods Mol Biol.*, 31: 289-298, 1994.
179. Dynan, W.S. and Tjian, R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*, 35: 79-87, 1983.
180. Plate, K.H., Breier, G., Weich, H.A., Mennel, H.D., and Risau, W. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *Int.J Cancer*, 59: 520-529, 1994.
181. Suzuma, K., Takagi, H., Otani, A., Oh, H., and Honda, Y. Expression of thrombospondin-1 in ischemia-induced retinal neovascularization. *Am J Pathol.*, 154: 343-354, 1999.
182. Liu, H.S., Jan, M.S., Chou, C.K., Chen, P.H., and Ke, N.J. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 260: 712-717, 1999.
183. Taghian, A., Budach, W., Zietman, A., Freeman, J., Gioioso, D., Ruka, W., and Suit, H.D. Quantitative comparison between the transplantability of human and murine tumors into the subcutaneous tissue of NCr/Sed-nu/nu nude and severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.*, 53: 5012-5017, 1993.
184. Sekido, Y., Bader, S., Latif, F., Gnarr, J.R., Gazdar, A.F., Linehan, W.M., Zbar, B., Lerman, M.I., and Minna, J.D. Molecular analysis of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene in human lung cancer cell lines. *Oncogene*, 9: 1599-1604, 1994.
185. Minna, J.D. The molecular biology of lung cancer pathogenesis. *Chest*, 103: 449S-456S, 1993.
186. Los, M., Jansen, G.H., Kaelin, W.G., Lips, C.J., Blijham, G.H., and Voest, E.E. Expression pattern of the von Hippel-Lindau protein in human tissues. *Lab.Invest.*, 75: 231-238, 1996.
187. Sakashita, N., Takeya, M., Kishida, T., Stackhouse, T.M., Zbar, B., and Takahashi, K. Expression of von Hippel-Lindau protein in normal and pathological human tissues. *Histochem.J*, 31: 133-144, 1999.
188. O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H., and Folkman, J. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 79: 315-328, 1994.
189. Kodama, J., Seki, N., Tokumo, K., Hongo, A., Miyagi, Y., Yoshinouchi, M., Okuda, H., and Kudo, T. Vascular endothelial growth factor is implicated in early invasion in cervical cancer. *Eur.J Cancer*, 35: 485-489, 1999.

190. O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Chen, C.C., and Folkman, J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Med.*, 2: 689-692, 1996.
191. Taddei, L., Chiarugi, P., Brogelli, L., Cirri, P., Magnelli, L., Raugei, G., Ziche, M., Granger, H.J., Chiarugi, V., and Ramponi, G. Inhibitory effect of full-length human endostatin on in vitro angiogenesis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 263: 340-345, 1999.
192. Dhanabal, M., Ramchandran, R., Waterman, M.J., Lu, H., Knebelmann, B., Segal, M., and Sukhatme, V.P. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol.Chem.*, 274: 11721-11726, 1999.
193. O'Mahony, C.A., Albo, D., Tuszynski, G.P., and Berger, D.H. Transforming growth factor-beta 1 inhibits generation of angiostatin by human pancreatic cancer cells. *Surgery*, 124: 388-393, 1998.
194. Bruning, T., Golka, K., Makropoulos, V., and Bolt, H.M. Preexistence of chronic tubular damage in cases of renal cell cancer after long and high exposure to trichloroethylene. *Arch Toxicol.*, 70: 259-260, 1996.
195. Bruning, T., Weirich, G., Hornauer, M.A., Hofler, H., and Brauch, H. Renal cell carcinomas in trichloroethene (TRI) exposed persons are associated with somatic mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene. *Arch.Toxicol.*, 71: 332-335, 1997.
196. Schraml, P., Zhaou, M., Richter, J., Bruning, T., Pommer, M., Sauter, G., Mihatsch, M.J., and Moch, H. Analysis of kidney tumors in trichloroethylene exposed workers by comparative genomic hybridization and DNA sequence analysis. *Verh.Dtsch.Ges.Pathol.*, 83: 218-224, 1999.
197. Zhuang, Z., Emmert Buck, M.R., Roth, M.J., Gnarra, J., Linehan, W.M., Liotta, L.A., and Lubensky, I.A. von Hippel-Lindau disease gene deletion detected in microdissected sporadic human colon carcinoma specimens. *Hum.Pathol.*, 27: 152-156, 1996.
198. Corless, C.L., Kibel, A.S., Iliopoulos, O., and Kaelin, W.G., Jr. Immunostaining of the von Hippel-Lindau gene product in normal and neoplastic human tissues. *Hum.Pathol.*, 28: 459-464, 1997.
199. Brauch, H., Pomer, S., Hieronymus, T., Schadt, T., Lohrke, H., and Komitowski, D. Genetic alterations in sporadic renal-cell carcinoma: molecular analyses of tumor suppressor gene harboring chromosomal regions 3p, 5q, and 17p. *World J.Urol*, 12: 162-168, 1994.
200. Prowse, A.H., Webster, A.R., Richards, F.M., Richard, S., Olschwang, S., Resche, F., Affara, N.A., and Maher, E.R. Somatic inactivation of the VHL gene in Von Hippel-Lindau disease tumors. *Am.J.Hum.Genet.*, 60: 765-771, 1997.

201. Buchholz, F., Angrand, P.O., and Stewart, A.F. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis . *Nat.Biotechnol.*, *16*: 657-662, 1998.
202. Sepulveda, A.R., Huang, S.L., Lebovitz, R.M., and Lieberman, M.W. A 346-base pair region of the mouse gamma-glutamyl transpeptidase type II promoter contains sufficient cis-acting elements for kidney-restricted expression in transgenic mice. *J Biol.Chem.*, *272*: 11959-11967, 1997.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACE	Adenylierungskontrollelement
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	<i>antisense</i>
ATCC	<i>American tissue culture society</i>
AUBPs	<i>Adenyl-Uracyl-binding proteins</i>
ARE	<i>AU-rich elements</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cmm	Kubikmillimeter
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cds	coding sequence
CPE	cytoplasmatisches Polyadenylierungselement
Cul-2	Cullin 2
DAPI	4'6-Diamidino-2-phenylindol
d. h.	das heißt
del	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
diff.	differenziert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleinacid</i>
dNTP	Didesoxynucleintriphosphat
ds	<i>double stranded</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>
EGFP	<i>enhanced GFP</i>
E	<i>Effectene</i>

EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
Ex	Exon
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	fötales Kälberserum
F-BESS	<i>fluorescence labelled base excision sequence scanning</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Flt-1	<i>fms like tyrosinkinase</i>
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Glut-1	Glucosetransporter 1-Protein
HCl	Hydroxychlorid
Hif-1	<i>hypoxia inducible factor 1</i>
IHE	Immunhistochemie
ins	Insertion
inkl.	inklusive
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KDR	<i>kinase insert domain containing receptor</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
l	Spur (<i>>lane</i>)
LB	Luria Bertonii
LF	Lipofektamin
Lsg.	Lösung
M	Marker, Größenstandard
MAPK	mitogen aktivierende Proteinkinase
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEM	Minimal essentielles Medium
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minuten

ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
µm	Mikrometer
Mops	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
n. b.	nicht beurteilbar
ng	Nanogramm
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NZK	Nierenzellkarzinom
nu/nu	Nacktmaus, homozygot
ORF	<i>open reading frame</i>
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphat saline buffer</i>
PDGF	placenta growth factor
PIDGF	plateled derived growth factor
Pfu	Pyrococcus furiosis
PKC	Proteinkinase C
P/S	Penicillin/ Streptavidin
pVHL	Protein des VHL-TSGs
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	<i>ribonucleinacid</i>
RT-PCR	<i>reverse transcribed polymerase chain reaction</i>
Rbx-1	Ringboxprotein 1
s.	siehe
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
sec.	Sekunden
SF	Superfect

SP1	Spezifitätsprotein 1
ss	<i>single stranded</i>
SSC	<i>sodiumchlorid-sodiumcitrat</i>
SSCP	<i>single stranded conformation polymorphism</i>
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
subst	Substitution
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Trisacetat
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tfl	<i>Thermus flavus</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetraethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
TSG	Tumorsuppressorgen
tub.	tubulär
U	Uracil
u. a.	unter anderem
u. ä.	und ähnliche
UTR	untranslatierte Region
ÜN	über Nacht
unterschiedl.	unterschiedlich
ÜT	über Tag
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHL	von Hippel-Lindau
VHLBP	<i>VHL binding protein</i>
VHLS	von Hippel-Lindau Syndrom
VPF	<i>vascular permeability factor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Die Subtypen epithelialer Nierentumoren, (Thoenes und Störkel, 1986)
- Abb. 2: Modell der „Zwei-Schritt-Hypothese“
- Abb. 3: Schematische Darstellung der Tumorangiogenese;
- Abb. 4: Wirkmechanismus von pVHL bei der Transkription/ Elongation
- Abb. 5.: Molekulare Basis der Funktion des VHL-Genproduktes
- Abb. 6: SSCP-Analyse
- Abb. 7: Elektropherogramm der F-BESS-Analyse
- Abb. 8: Kontrolle der Vektorkonstrukte
- Abb. 9: Bestimmung der optimalen Geneticinkonzentration
- Abb. 10: Expression des *green fluorescent proteins*
- Abb. 11: stabil transfizierte Zelllinie mit homogener GFP-Expression
- Abb. 12: *in vitro*-Zellwachstum in NZK-Linien nach Transfektion
- Abb. 13: Expressionsveränderung von VHL nach Transfektion *in vitro*
- Abb. 14: Expressionsveränderungen nach Kotransfektion
- Abb. 15: Wachstum humaner Tumorzellen in immunsupprimierten Mäusen
- Abb. 16: Auswirkung der Transfektion auf das *in vivo*-Zellwachstum;
- Abb. 17: Tumoren humaner Nierenkarzinomzellen bei Scid-Mäusen; Xenograft-Modell,
- Abb. 18: Expressionsveränderung von VHL nach Transfektion *in vivo*;
- Abb. 19: Expression von pVHL nach immunohistochemischer Markierung
- Abb. 20: immunohistochemischer Nachweis des VEGF Proteins
- Abb.21: immunhistochemische Auswertung der Xenotransplantate
- Abb. 22: Expression des VHL-GFP-Fusionsproteins
- Abb. 23: cytoplasmatische und nukleäre Lokalisation des VHL Proteins
- Abb. 24: Modell zur antiangiogenetischen Wirkung des VHL-Genproduktes
- Abb. 25: *Angiogenic Switch* nach Folkman, 1996
- Abb.26: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den *in vitro* und *in vivo* Studien.

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach dem TNM-System

Tab. 2: DNA-Mutationen im VHL-Gen

Tab. 3: optimale Transfektionsbedingungen der Zelllinien

Tab. 4: Expressionsänderungen von VHL und VEGF nach Transfektion mit pEGFP-N1

Tab. 5: Expressionsänderungen von VHL und VEGF nach Transfektion mit pcDNA3

Tab. 6: Expressionsveränderungen von VHL und VEGF in Xenotransplantaten

Tab. 7.: Histopathologische Untersuchungen der Xenotransplantate

8.4 VHL-Sequenz und verwendete Primer

8.4.1 SSCP-Analyse

Exon 1

```

421  TCCAAAAAAA AAAAAAACA CCAAACCTTA GAGGGGTGAA AAAAAATTTT ATAGTGGA
    AGGTTTTTTT TTTTTTTTGT GGTTTGAAT CTCCCCTT TTTTTTAAA TATCACCTT

481  TACAGTAACG AGTTGGCCTA GEx 1/ I 5'CCTCGCCTC CGTTACAACA GCCTACGGTG CTGGAGGATC
    ATGTCATTGC TCAACCGGAT CGGAGCGGAG GCAATGTTGT CGGATGCCAC GACCTCCTAG

541  CTTCTGCGCA CGCGCACAGC CTCCGGCCGG CTATTTCCGC GAGCGCGTTC CATCCTCTAC
    GAAGACGCGT GCGCGTGTCT GAGGCCGGCC GATAAAGGCG CTCGCGCAAG GTAGGAGATG

601  CGAGCGCGCG CGAAGACTAC GGAGGTCGAC TCGGGAGCGC GCACGCAGCT CCGCCCCGGC
    GCTCGCGCGC GCTTCTGATG CCTCCAGCTG AGCCCTCGCG CGTGCCTCGA GGCGGGGCGC

661  TCCGACCCGC GGATCCCGCG GCGTCCGGCC CGGGEx 1/ II 5'TGCTCT CGATCCCGCA CGGAATGCC
    AGGCTGGGCG CCTAGGGCGC CGCAGGCCGG GCCACCAGA CCTAGCGCCT CCCTTACGGG

721  CGGAGGGCGG AGAACTGGGA CGAGCCGAG GTAGGCGCGG AGGAGGCAGG CGTCGAAGAG
    GCCTCCCGCC TCTTGACCCT GCTCCGGCTC CATCCGCGCC TCCTCCGTCC GCAGCTTCTCEx 1/ I 3'

781  TACGGCCCTG AAGAAGACGG CGGGGAGGAG TCGGGCGCGG AGGAGTCCGG CCGGAAGAG
    ATGCCGGGAC TTCTTCTGCC GCCCTCCTC AGCCCGCGGC TCCTCAGGCC GGCCTTCTC

841  TCCGGCCCGG AGGAACTGGG CGCCGAGGAG GAGATGGAGG CCGGGCGGCC GCGGCCCGTGEx 1/ III 5'
    AGGCCGGGCC TCCTTGACCC GCGGCTCCTC CTCTACCTCC GGCCCGCCGG CGCCGGGCAC

901  CTGCGCTCGG TGAACEx 1/ II 3'TCGG CGAGCCCTCC CAGGTCATCT TCTGCAATCG CAGTCCGCGC
    GACGCGAGCC ACTTGAGCGC GCTCGGGAEx 1/ II 3'GC CTCAGTAGA AGACGTTAGEx 1/ III 3' CTCAGGCGCG

961  GTCGTGCTGC CCGTATGGCT CAACTTCGAC GCGGAGCCGC AGCCCTACCC AACGCTGCCG
    CAGCACGACG GGCATACCGA GTTGAAGCTG CCGCTCGGCG TCGGATGGG TTGCGACGGC

1021 CCTGGCACGG GCCGCCGAT CCACAGCTAC CGAGGTACGG GCCCGGCGCT TAGGCCCGAC
    GGACCGTGCC CGGCGGCGTA GGTGTCGATG GCTCEx 1/ III 3'CATGCC CGGGCCGCGA ATCCGGGCTG

1081 CCAGCAGGGA CGATAGCACG GTCTGAAGCC CCTCTACCGC CCCGGGTCC ATTTTGAGA
    GGTCGTCCCT GCTATCGTGC CAGACTTCGG GGAGATGGCG GGGCCCCAGG TAAAACGTCT

1141 CGGGAACTG AGGCCCTTG AGGCAGGACA CATCCAGGGT GACGCTGCTC GTAAGCGTCA
    GCCCCTTGAC TCCGGGGAAC TCCGTCCTGT GTAGGTCCA CTGCGACGAG CATTCGCAGT

1201 GAGCATTCTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TCTGAGACGG AGTCTCGCTC TGTCGCCAG
    CTCGTAAGAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AGACTCTGCC TCAGAGCGAG ACAGCGGGTC

```

Exon 2

5221 TTTTGTGATT TTTAGTAGAG ACGAGGTTTC ACCACGTTAG CCAGGACGGT CTTGATCTCC
AAAAACATAA AAATCATCTC TGCTCCAAAG TGGTGCAATC GGTCCTGCCA GAACTAGAGG

5281 TGACCTCATG ATCCGCCTGC CTCGCCTCC CAAAGTGCTG GGATTACAGG TGTGGGCCAC
ACTGGAGTAC TAGGCGGACG GAGCCGGAGG GTTTCACGAC CCTAATGTCC ACACCCGGTG

5341 CGTGCCAGC CACCGGTGTG ^{Ex 2 5'} GCTCTTTAAC AACCTTTGCT TGTCCCGATA GGTACCTTT
GCACGGGTCG GTGGCCACAC CGAGAAATTG TTGGAAACGA ACAGGGCTAT CCAGTGGAAA

5401 GGCTCTTCAG AGATGCAGGG ACACACGATG GGCTTCTGGT TAACCAAACCT GAATTATTTG
CCGAGAAGTC TCTACGTCCC TGTGTGCTAC CCGAAGACCA ATTGTTTTGA CTTAATAAAC

5461 TGCCATCTCT CAATGTTGAC GGACAGCCTA TTTTGGCAA TATCACACTG CCAGGTAAGT
ACGGTAGAGA GTTACAACCTG CCTGTCGGAT AAAACCGGTT ATAGTGTGAC GGTCATGAC

5521 ACGTTTTACT TTTTAAAAAG ATAAGGTTGT TGTGGTAAGT ACAGGATAGA CCACTTGAAA
TGCAAAATGA AAAATTTTTC TATTCCAACA ^{Ex 2 3'} ACACCATTCA TGTCCATATCT GGTGAACTTT

5581 AATTAAGCCC AGTTCCTCAAT TTTTGCCTGA TGTGAGGCAC GGTATCCAAT CTTTTTGTAT
TTAATTCGGG TCAAGAGTTA AAAACGGACT ACAGTCCGTG CCATAGGTTA GAAAAACATA

5641 CCTATTCTCT ACCATAAATA AAATGGAAGT GATGTATTTG TACGTTATGT GTTAAAGGTG
GGATAAGAGA TGGTATTTAT TTTACCTTCA CTACATAAAC ATGCAATACA CAATTTCCAC

Exon 3

8521 CACTGCCACA TACATGCACT CACTTTTTTTT CTTTAAACCTA AAGTGAGATC CATCAGTAGT
GTGACGGTGT ATGTACGTGA GTGAAAAAAA GAAATTGGAT TTCACTCTAG GTAGTCATCA

8581 ACAGGTAGTT GTTGGCAAAG CCTCTGTTC GTTCCTTGTA CTGAGACCCT AGTCTGTAC
TGTCCATCAA CAACCGTTTC GGAGAACAAG CAAGGAACAT GACTCTGGGA TCAGACAGTG

8641 TGAGGATTTG GTTTTTGTCC ^{Ex 3 5'} TTCCAGTGTA TACTCTGAAA GAGCGATGCC TCCAGGTTGT
ACTCCTAAAC CAAAAACGGG AAGGTCACAT ATGAGACTTT CTCGCTACGG AGGTCCAACA

8701 CCGGAGCCTA GTCAAGCCTG AGAATTACAG GAGACTGGAC ATCGTCAGGT CGCTCTACGA
GGCCTCGGAT CAGTTCGGAC TCTTAATGTC CTCTGACCTG TAGCAGTCCA GCGAGATGCT

8761 AGATCTGGAA GACCACCAA ATGTGCAGAA AGACCTGGAG CGGCTGACAC AGGAGCGCAT
TCTAGACCTT CTGGTGGGTT TACACGTCTT TCTGGACCTC GCCGACTGTG TCCTCGCGTA

8821 TGCACATCAA CGGATGGGAG ATTGAAGATT TCTGTTGAAA CTTACACTGT TTCATCTCAG
ACGTGTAGTT GCCTACCCTC ^{Ex 3 3'} TAACTTCTAA AGACAACCTT GAATGTGACA AAGTAGAGTC

8881 CTTTTGATGG TACTGATGAG TCTTGATCTA GATACAGGAC TGGTTCCTTC CTTAGTTTCA
GAAAACCTACC ATGACTACTC AGAACTAGAT CTATGTCTCTG ACCAAGGAAG GAATCAAAGT

8941 AAGTGTCTCA TTCTCAGAGT AAAATAGGCA CCATTGCTTA AAAGAAAGTT AACTGACTTC
TTCACAGAGT AAGAGTCTCA TTTTATCCGT GGTAACGAAT TTTCTTTCAA TTGACTGAAG

8.4.2 F-BESS-Analyse

Exon 1

421 TCCAAAAAAA AAAAAAACA CCAAACCTTA GAGGGGTGAA AAAAAATTTT ATAGTGAAAA
 AGGTTTTTTT TTTTTTTTGT GGTTTGGAAT CTCCCCTT TTTTTTAAAA TATCACCTTT

481 TACAGTAACG AGTTGGCCTA GCCTCGCCTC CGTTACAACA GCCTACGGTG CTGGAGGATC
 ATGTCATTGC TCAACCGGAT CGGAGCGGAG GCAATGTTGT CGGATGCCAC GACCTCCTAG

541 CTTCTGCGCA CGCGCACAGC CTCCGGCCGG CTATTTCCGC GAGCGGTTTC CATCCTCTAC
 GAAGACGCGT GC CGCGTGTCG GAGGCCGGCC GATAAAGGCG CTCGCGCAAG GTAGGAGATG
 Exon 1a 5'

601 CGAGCGCGCG CGAAGACTAC GGAGGTCGAC TCGGGAGCGC GCACGCAGCT CCGCCCCGCG
 GCTCGCGCGC GCTTCTGATG CCTCCAGCTG AGCCCTCGCG CGTGCCTCGA GCGGGGCGCG

661 TCCGACCCGC GGATCCCGCG GCGTCCGGCC CGGGTGGTCT GGATCGCGGA GGGATGCCC
 AGGCTGGGCG CCTAGGGCGC CGCAGGCCGG GCCCACCAGA CCTAGCGCCT CCCTTACGGG

721 CGGAGGGCGG AGAACTGGGA CGAGCCGAG GTAGGCGCGG AGGAGGCAGG CGTCGAAGAG
 GCCTCCCGCC TCTTGACCCT GCTCCGGCTC CATCCGCGCC TCCTCCGTCC GCAGCTTCTC

781 TACGGCCC TG AGAAGACCG GCGGAGGAG TCGGGCGCGG AGGAGTCCGG CCCGGAAGAG
 ATGCCGGGAC TTCTTCTGCC GCCCTCCTC AGCCCGCGG TCCTCAGGCC GGCCTTCTC
 Exon 1b 5'

841 TCCGCCCGG AGGAACTGGG CGCCGAGGAG GAGATGGAGG CCGGGCGGCC GCGGCCGTG
 AGGCCGGGCG TCCTTGACCC GCGGCTCCTC CTCTACCTCC GGC CGCGCGG CGCCGGGCAC
 Exon 1a 3'

901 CTGCGCTCGG TGAATCGCG CGAGCCCTCC CAGGTCATCT TCTGCAATCG CAGTCCGCGC
 GACGCGAGCC ACTTGAGCGC GCTCGGGAGG GTCCAGTAGA AGACGTTAGC GTCAGGCGCG

961 GTCGTGCTGC CCGTATGGCT CAACTTCGAC GCGGAGCCGC AGCCCTACCC AACGCTGCCG
 CAGCACGACG GGCATACCGA GTTGAAGCTG CCGCTCGGCG TCGGGATGGG TTGCGACGGC

1021 CCTGGCACGG GCCGCCGAT CCACAGCTAC CGAGGTACGG GCCCGCGCT TAGGCCCGAC
 GGACCGTGCC CGGCGGCGTA GGTGTCGATG GCTCCATGCC CGGGCCGCGA ATCCGGGCTG

1081 CCAGCAGGGA CGATAGCACG GTCTGAAGCC CCTCTACCGC CCCGGGGTCC ATTTTGCAGA
 GGTCGTCCCT GCTATCGTGC CAGACTTCGG GGAGATGGCG GGGCCCCAGG TAAAACGTCT
 Exon 1b 3'

1141 CGGGGAACTG AGGCCCTTG AGGCAGGACA CATCCAGGT GACGCTGCTC GTAAGCGTCA
 GCCCTTGAC TCCGGGGAAC TCCGTCCTGT GTAGGTCCA CTGCGACGAG CATTCGAGT

1201 GAGCATTCTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TCTGAGACGG AGTCTCGCTC TGTCGCCAG
 CTCGTAAGAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AACTCTGCC TCAGAGCGAG ACAGCGGTC

Exon 2

5221 TTTTGTGATT TTTAGTAGAG ACGAGGTTTC ACCACGTTAG CCAGGACGGT CTTGATCTCC
 AAAAAATAA AAATCATCTC TGCTCCAAAG TGGTGAATC GGTCCTGCCA GAACTAGAGG

5281 TGACCTCATG ATCCGCCTGC CTCGCCTCC CAAAGTGCTG GGATTACAGG TGTGGGCCAC
 ACTGGAGTAC TAGGCGGACG GAGCCGGAGG GTTTCACGAC CCTAATGTCC ACACCCGGTG

5341 CGTGCCAGC CACCGG^{Exon 2}TGTG ^{5'}GCTCTTAAAC AACCTTTGCT TGTCCCGATA GGTCACTTTT
 GCACGGGTCG GTGGCCACAC CGAGAAATTG TTGGAAACGA ACAGGGCTAT CCAGTGGAAA

5401 GGCTCTTCAG AGATGCAGGG ACACACGATG GGCTTCTGGT TAACCAAACCT GAATTATTTG
 CCGAGAAGTC TCTACGTCCC TGTGTGCTAC CCGAAGACCA ATTGTTTTGA CTTAATAAAC

5461 TGCCATCTCT CAATGTTGAC GGACAGCCTA TTTTGGCCAA TATCACACTG CCAGGTTACTG
 ACGGTAGAGA GTTACAACCTG CCTGTCCGAT AAAAACGGTT ATAGTGTGAC GGTCATGAC

5521 ACGTTTTACT TTTTAAAAAG ATAAGGTTGT TGTGGTAAGT ACAGGATAGA CCACTTGAAA
 TGCAAAATGA AAAATTTTTC TATTCCAACA ^{Exon 2}ACACCATTCA ^{3'}TGTCCTATCT GGTGAACTTT

5581 AATTAAGCCC AGTTCCTCAAT TTTTGCCTGA TGTCAAGCAC GGTATCCAAT CTTTTTGTAT
 TTAATTCGGG TCAAGAGTTA AAAACGGACT ACAGTCCGTG CCATAGGTTA GAAAAACATA

5641 CCTATTCTCT ACCATAAATA AAATGGAAGT GATGTATTTG TACGTTATGT GTTAAAGGTG
 GGATAAGAGA TGGTATTTAT TTTACCTTCA CTACATAAAC ATGCAATACA CAATTTCCAC

Exon 3

8521 CACTGCCACA TACATGCACT CACTTTTTTTT CTTTAAACCTA AAGTGAGATC CATCAGTAGT
 GTGACGGTGT ATGTACGTGA GTGAAAAAAA GAAATTGGAT TTCACTCTAG GTAGTCATCA

8581 ACAGGTAGTT GTTGGCAAAG CCTCTGTTC GTTCCTTGTA CTGAGACC^{CT} ^{Exon 3}AGTCTGTAC^{5'}
 TGTCCATCAA CAACCGTTTC GGAGAACAAG CAAGGAACAT GACTCTGGGA TCAGACAGTG

8641 TGAGGATTTG ^{CT}TTTTTGCCC TTCCAGTGTA TACTCTGAAA GAGCGATGCC TCCAGGTTGT
 ACTCCTAAAC CAAAAACGGG AAGGTCACAT ATGAGACTTT CTCGCTACGG AGGTCCAACA

8701 CCGGAGCCTA GTCAAGCCTG AGAATTACAG GAGACTGGAC ATCGTCAGGT CGCTCTACGA
 GGCTTCGGAT CAGTTCGGAC TCTTAATGTC CTCTGACCTG TAGCAGTCCA GCGAGATGCT

8761 AGATCTGGAA GACCACCCAA ATGTGCAGAA AGACCTGGAG CGGCTGACAC AGGAGCGCAT
 TCTAGACCTT CTGGTGGGTT TACACGTCTT TCTGGACCTC GCCGACTGTG TCCTCGCGTA

8821 TGCACATCAA CGGATGGGAG ATTGAAGATT TCTGTTGAAA CTTACACTGT TTCATCTCAG
 ACGTGTAGTT GCCTACCCTC TAACTTCTAA AGACAA^{CTTT} ^{Exon 3}GAATGTGACA AAGTAGAGTC^{3'}

8881 CTTTTGATGG TACTGATGAG TCTTGATCTA GATACAGGAC TGGTTCCTTC CTTAGTTTCA
 GAAAACCTACC ATGACTACTC AGAACTAGAT CTATGTCTCTG ACCAAGGAAG GAATCAAAGT

8941 AAGTGTCTCA TTCTCAGAGT AAAATAGGCA CCATTGCTTA AAAGAAAGTT AACTGACTTC
 TTCACAGAGT AAGAGTCTCA TTTTATCCGT GGTAACGAAT TTTCTTTCAA TTGACTGAAG

8.4.3 DNA-Sequenzierung

Exon 1

421 TCACAAAAA AAAAAAACA CCAACCTTA GAGGGTGAA AAAAAATTT ATAGTGGAAA
 AGGTTTTTTT TTTTTTTTGT GGTTTGGAAT CTCCCACCTT TTTTTTAAAA TATCACCTTT

481 TACAGTAACG AGTTGGCCTA GCCTCGCCTC CGTTACAACA GCCTACGCTG CTGGAGGATC
 ATGTCATTGC TCAACCGGAT CGGAGCGGAG GCAATGTTGT CGGATGCCAC GACCTCCTAG

541 CTTCTGCGCA CGCGCACAGC CTCCGGCCGG CTATTTCCGC GAGCGCGTTC CATCCTCTAC
 GAAGACGCGT GCGCGTGTCT GAGGCCGGCC GATAAAGGCG CTCGCGCAAG GTAGGAGATG

601 CGAGCGCGCG CGAAGACTAC GGAGGTCGAC TCGGGAGCGC GCACGCAGCT CCGCCCCGGC
 GCTCGCGCGC GCTTCTGATG CCTCCAGCTG AGCCCTCGCG CGTGCCTCGA GCGGGGGCGC

661 TCCGACCCGC GGATCCCGCG GCGTCCGGCC CGGGTGGTCT GGATCGCGGA GGGATGCCC
 AAGTGGGGC CCTAGGGCGC CGCAGGCCGG GCCCACCAGA CCTAGCGCCT CCCTTACGGG

721 CGGAGGGCGG AGAAGTGGGA CGAGCCGAG GTAGGCGCGG AGGAGGCAGG CTGCAAGAG
 GCCTCCCGCC TCTTGACCCT GCTCCGGCTC CATCCGCGCC TCCTCCGTCC GCAGCTTCTC

781 TACGGCCCTG AAGAAGACGG CGGGAGGAG TCGGGCGCCG AGGAGTCCGG CCGGAAGAG
 ATGCCGGGAC TTCTTCTGCC GCCCTCTCTC AGCCCGCGGC TCCTCAGGCC GGGCCTTCTC

841 TCCGCCCCGG AGGAAGTGGG CGCCGAGGAG GAGATGGAG CCGGCGGCC GCGGCCGTG
 AGGCCGGGCC TCCTTGACCC GCGGCTCTCT CTCTACCTCC GGCCCGCCGG CGCCGGGCAC

901 CTGCGCTCGG TGAAGTCCGG CGAGCCCTCC CAGGTCATCT TCTGCAATCG CAGTCCGCGC
 GACCGGAGCC ACTTGAGCGC GCTCGGGAGG GTCCAGTAGA AGACGTTAGC GTCAGGCGCG

961 GTCGTGCTGC CCGTATGGCT CAACTTCGAC GCGGAGCCGC AGCCCTACCC AACGCTGCCG
 CAGCACGACG GGCATACCGA GTTGAAGCTG CCGCTCGGCG TCGGGATGGG TTGCGACGGC

1021 CCTGGCACGG GCCGCCGAT CCACAGCTAC CGAGGTACGG GCCCGCGCT TAGGCCCGAC
 GGACCGTGCC CGGCGGCGTA GGTGTCGATG GCTCCATGCC CCGGCCGCGA ATCCGGGCTG

1081 CCAGCAGGGA CGATAGCACG GTCTGAAGCC CCTCTACCGC CCCGGGGTCC ATTTTGCAGA
 GGTGCTCCCT GCTATCGTGC CAGACTTCGG GGAGATGGCG GGGCCCCAGG TAAAACGTCT

1141 CGGGGAACTG AGGCCCTTG AGGCAGGACA CATCCAGGT GACGCTGCTC GTAAGCGTCA
 GCCCTTGAC TCCGGGGAAC TCCGTCCTGT GTAGGTCCCA CTGCGACGAG CATTCGCAGT

1201 GAGCATTCTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TCTGAGACGG AGTCTCGCTC TGTCGCCAG
 CTCGTAAGAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AACTCTGCTC TCAGAGCGAG ACAGCGGGTC

Primer 1. PCR Nested M13 Primer

Exon 2

5221 TTTTGTATT TTTAGTAGAG ACGAGGTTTC ACCACGTTAG CCA**GGACGGT** **CTTGATCTCC**
 AAAAACATAA AAATCATCTC TGCTCCAAAG TGGTGCAATC GGTCTGCCA GAACTAGAGG

5281 **TGACCTCATG** ATCCGCCTGC CTCGGCCTCC CAAAGTGCTG GGATTACAGG TGTGGGCCAC
 ACTGGAGTAC TAGGCGGACG GAGCCGGAGG GTTTCACGAC CCTAATGTCC ACACCCGGTG

5341 CGTGCCAGC CACCGGTGTG GCTCTTTAAC AACCTTTGCT TGTCCCGATA **GGTACCTTT**
 GCACGGGTCG GTGGCCACAC CGAGAAATTG TTGGAACGA ACAGGGCTAT **CCAGTGGAAA**

5401 **GGCTCTTCAG AGATGCAGGG ACACACGATG GGCTTCTGGT TAACCAA**ACT **GAATTATTTG**
CCGAGAAGTC TCTACGTCCC TGTGTGCTAC CCGAAGACCA ATTGGTTTGA CTTAATAAAC

5461 **TGCCATCTCT CAATGTTGAC GGACAGCCTA TTTTTC**CAA **TATCACACTG CCAGG**TA**CTG**
ACGGTAGAGA GTTACAACTG **CCTGTCGGAT AAAAACGGTT ATAGTGTGAC GGTC**CATGAC

5521 ACGTTTTACT TTTTAAAAAG ATAAGGTTGT TGTGGTAAGT ACAGGATAGA CCACTTGAAA
 TGCAAAATGA AAAATTTTTC TATTCCAACA ACACCATTCA TGTCTATCT GGTGAACTTT

5581 AATTAAGCCC AGTTCTCAAT TTTTGCCTGA TGTGAGGCAC GGTATCCAAT CTTTTTGTAT
 TTAATTCGGG TCAAGAGTTA AAAACGGACT ACAGTCCGTG CCATAGGTTA GAAAAACATA

5641 CCTATTCTCT ACCATAAATA AAATGGAAGT GATGTATTTG TACGTTATGT GTTAAAGGTG
 GGATAAGAGA **TGGTATTTAT TTTA****CCTTCA** **CTACATAAAC AT****GCAATACA** CAATTTCCAC

Primer 1. PCR **Nested M13 Primer**

Exon 3

8521 CACTGCCACA TACATGCACT CACTTTTTTTT CTTTAACTA AAGTGAGATC **CATC****AGTAGT**
 GTGACGGTGT ATGTACGTGA GTGAAAAAAA GAAATTGGAT TTCACTCTAG GTAGTCATCA

8581 **ACAGGTAGTT GTTGGC**AAAG CCTCTGTTC GTTCCTTGTA CTGAGACCCT AGTCTGTCAC
 TGTCATCAA CAACCGTTTC GGAGAACAAG CAAGGAACAT GACTCTGGGA TCAGACAGTG

8641 TGAGGATTTG GTTTTTGCC TCCAG**TGTA** **TACTCTGAAA GAGCGATGCC TCCAGGTTGT**
 ACTCCTAAAC CAAAAACGGG AAGGTC**ACAT** **ATGAGACTTT CTCGCTACGG AGTCCAACA**

8701 **CCGGAGCCTA GTCAAGCCTG AGAATTACAG GAGACTGGAC ATCGTCAGGT CGCTCTACGA**
GGCCTCGGAT CAGTTCGGAC TCTTAATGTC CTCTGACCTG TAGCAGTCCA GCGAGATGCT

8761 **AGATCTGGAA GACCACCCAA ATGTGCAGAA AGACCTGGAG CGGCTGACAC AGGAGCGCAT**
TCTAGACCTT CTGGTGGGTT TACACGTCTT TCTGGACCTC GCCGACTGTG TCCTCGCGTA

8821 **TGCACATCAA CGGATGGGAG ATTGA**AGATT TCTGTTGAAA CTTACACTGT TTCATCTCAG
ACGTGTAGTT GCCTACCCTC TAACTTCTAA AGACAACCTT GAATGTGACA AAGTAGAGTC

8881 CTTTTGATGG TACTGATGAG TCTTGATCTA GATACAGGAC TGGTTCCTTC CTTAGTTTCA
 GAAAACTACC ATGACTACTC AGAACTAGAT CTATGTCTCTG ACCAAGGAAG **GAAT****CAAAGT**

8941 AAGTGCTCA TTCTCAGAGT AAAATAGGCA CCATTGCTTA AAAGAAAGTT AACTGACTTC
TTCACAGAGT AAGAG**TC**TCA TTTTATCCGT GGTAACGAAT TTTCTTCAA TTGACTGAAG

Primer 1. PCR **Nested M13 Primer**

8.5 Danksagung

8.6 Lebenslauf

Name: Weidt, Eberhard Joachim

geboren: 1969

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schule: 1975-1979 Grundschule
1979-1988 Gymnasium
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1990-1996 Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz,
Abschluß als Diplombiologe im Oktober 1996
Prüfungsfächer: Genetik, Zoologie, Biochemie, Pharmakologie

Wissenschaftliche Beschäftigung:

01.02 – 31.10.1996 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz

seit 01.11.1996 Wissenschaftlicher Angestellter an der Universitätsklinik Mainz

8.7 Publikationen

Posterbeiträge auf internationalen Kongressen

Decker, H.J., Neuhaus, C., **Weidt, E.J.**, Brauch, H., Huber, C. The von Hippel-Lindau syndrome – an attractive gene model, Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, März 1996, Göttingen

Decker H.J., Neuhaus C., Brauch H., **Weidt E.J.**, Störkel S., Brenner W., Huber C., Mutational analysis of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in 106 sporadic renal cell carcinomas: involvement of the clear cell type as well as the chromophilic type. Second International von Hippel-Lindau Symposium, Juni 1996, Honolulu.

Schwerdtle, R., Neuhaus, C., Störkel, S., Brauch, H., **Weidt, E.J.**, Stöckle, M., Huber, C., and Decker, H.J. High frequency of loss of heterozygosity defines a subtype of renal cell carcinomas: specific loss at chromosomal regions 1p, 2p, 6p, 10p, 13q, 14q, 17p, and 21q characterizes the chromophobe carcinoma subtype. European Journal of Human Genetics, 1996.

Decker, H.J., Neuhaus, C., Schwerdtle, R., Störkel, S., Brenner, W., **Weidt, E.J.**, and Huber, C. A genetic model for tumorigenesis of renal tumors. Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, 1996.

Decker H.J., Schwerdtle R, Brieger J, **Weidt E.J.**, Grün F, Neuhaus C, Puranakittha C, Störkel S, Brenner W, Huber C: Genetic basis of a histogenetic model of tumorigenesis of epithelial renal tumors. 7th International Workshop on Chromosomes in Solid Tumors, Tucson, AZ, 20.-22.1.97.

Decker, H.J., Schwerdtle, R., Brieger, J., **Weidt, E.J.**, Neuhaus, C., Puranakittha, C., Störkel, S., Brenner, W., Winterpacht, A., Zabel, B., and Huber, C. Genotyping of renal tumors - a genetic classification system with clinical relevance. Journal of Molecular Medicine, 1997; 75 (5): B105.

Decker, H.J., Schwerdtle, R., Neuhaus, C., Puranakittha, C., Brieger, J., **Weidt, E.J.**, Grün, F., Brenner, W., Störkel, S., and Huber, C. A model for tumorigenesis of sporadic renal cell carcinomas. Med.Genet. 1997; 1:46.

Decker, H.J., Neuhaus, C., **Weidt, E.J.**, Puranakittha, C., Brieger, J., Reifenrath, C., Reutzel, D., Naumann, S., Winterpacht, A., Zabel, B., Brenner, W., Störkel, S., and Huber, C. Die genetische Klassifikation von Nierentumoren und ihre klinische Bedeutung. 10.Deutsch/Österreichische Tumorzytogenetische Arbeitstagung, Friedrichsdorf, 1997.

Brieger, J., **Weidt, E.J.**, Winterpacht, A., Zabel, B., Störkel, S., Huber, C., and Decker, H.J. Inverse Correlation of Vascular Endothelial Growth Factor and von Hippel-Lindau Gene Expression in Sporadic Renal Cell Carcinomas. Proceedings of the AACR meeting, San Diego, 1997 38:279, 1997

Decker HJH, Neuhaus C, Schwerdtle R, Puranakanittha C, Brieger J, **Weidt E.J.**, Grün F, Brenner W, Störkel S, Huber C: Subtyping of renal tumors by Cytogenetics, and molecular techniques is helpful for disease management. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 77: 158.

Brieger J, **Weidt E.J.**, Huber C, Decker H: Decreased von Hippel Lindau and increased Vascular Endothelial Growth Factor gene expression in sporadic Renal Cell Carcinomas. 6th International Workshop on Multiple Endocrine Neoplasia and von Hippel-Lindau Disease, 25.-28.6.97, Noordwijkerhout, Niederlande.

Weidt E.J., Brieger J, Huber C, Decker H: Upregulation of c-fos, c-myc, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in sporadic renal cell carcinomas with downregulation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene expression. *Eur J Cell Biol* 1997; 74, suppl 47: 177.

Schwerdtle R, Brieger J, **Weidt E.J.**, Adryan B, Winterpacht A, Schirmacher P, Brenner W, Zabel B, Huber C, Decker HJH: Gene expression profiling in human tumor cell lines using high-density cDNA arrays. Workshop on methods and applications of microarray technology; Tuscon/Arizona, 11.-13. 1. 98.

Brieger, J., Schreiner, S., Naumann, A., **Weidt, E.J.**, Schwerdtle, R.F., Huber, C., and Decker, H.J.H. Differentiation dependent expression and cytoplasmatic localization of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene protein in haematopoetic cells. *European Journal of Cell Biology* 48(75):79-(215), 1998.

Weidt, E.J., Brieger, J., Schwerdtle, R.F., Huber, C., and Decker, H.J.H. Downregulation of the VHL tumor suppressor gene mRNA might be responsible for the upregulation of VEGF and several oncogenes in renal cell carcinomas. *European Journal of Cell Biology* 75(48):10-[26], 1998.

Decker HJH, Schwerdtle R, Brieger J, Puranakanittha C, **Weidt E.J.**, Reutzel D, Naumann S, Brenner W, Zabel B, Störkel S, Huber C: Genetic progression markers and the 1998 WHO classification system of epithelial renal tumors. 10. Jahrestagung der Gesellschaft für Tumorgenetik, 25.-28. 3. 98, Jena.

Brieger J, Schreiner S, Naumann A, **Weidt E.J.**, Schwerdtle R, Huber C, and Decker HJ: Cytoplasmatic localization of the von Hippel-Lindau tumorsuppressor gene product in normal and malignant haematopoetic cells. *Proc Am Ass Cancer Res* 1998; 39: 221.

Schwerdtle R, Brieger J, **Weidt E.J.**, Adryan B, Winterpacht A, Schirmacher P, Brenner W, Zabel B, Huber C, Decker HJH: Analysis of gene expression profiles in sporadic renal cell carcinomas using a high-density cDNA filter array. *Proc Am Ass Cancer Res* 1998; 39: 3092.

Brieger J., Schreiner S., Naumann, A., **Weidt E.J.**, Fischer T., Weidmann E., Huber C., Decker H.J. The von Hippel-Lindau tumorsuppressor gene protein is expressed in the cytoplasm of myeloid leukemias and might be celltype specific localised. *Ann hemat* 1998; 77 suppl 2: 522

Brieger J, Schreiner S, Naumann A, **Weidt E.J.**, Huber C, and Decker HJ: Expression of the VHL (von Hippel-Lindau Tumorsuppressor gene) protein in the cytoplasm of myeloid leukemias. FEBS 1998, Copenhagen.

Reutzel D, Naumann S, Puranakanitsha C, **Weidt EJ**, Löbber R, Holl M, Brenner W, Zabel B, Huber C, Decker HJH. Comparative Genomic Hybridisation, Cytogenetics and molecular studies on a Wilms tumor cell line and epithelial renal tumors. 6th European Conference on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors, Abstractbook, Oct. 15-18 1998, Saarbrücken, Germany.

Brieger J., **Weidt E.J.**, Gansen K., Huber C., Decker H.J.: Detection of a novel von Hippel-Lindau (VHL) gene mutation by F-BESS. Biochimie 1999, 81 suppl 6: 202.

Weidt EJ, Brieger J, Gansen K, Decker HJ, Huber C: Increased expression of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in renal cell carcinoma cell lines is directly correlated with decreased expression of the vascular endothelial growth factor. 43rd International congress of the European Tissue Culture Society (ETCS), Okt 1998, Genf; cancelled.

Decker Jochen; Brieger J, Weirich G, **Weidt E J**, Brenner W, Störkel S, Schirmacher P, Neuhaus C, Brauch H: A Novel Hot Spot VHL Mutation in Sporadic Human Clear Cell Renal Cell Cancer and Clinical Implications; Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 22.-25.3.00, Lübeck;

Brieger J, Fürer S, **Weidt EJ**, Gansen K, Decker HJ: Identification of proteins potentially interacting with pVHL (von Hippel-Lindau tumorsuppressor gene protein). 91st meeting of the AACR, April 1-5 2000

Artikel in Fachzeitschriften

Decker, H.J., **Weidt, E.J.**, and Brieger, J. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. A rare and intriguing disease opening new insight into basic mechanisms of carcinogenesis. Cancer Genet Cytogenet 93(1):74-83, 1997.

Brieger J, **Weidt E.J.**, Gansen K, Huber C, Decker HJ: Detection of a novel germline mutation in the von Hippel-Lindau Tumor suppressor gene by fluorescence labelled base excision sequence scanning (F-BESS). Clin Genet. 56 (3), 210 – 215, 1999

Brieger J, **Weidt E.J.**, Störkel S, Schirmacher P, Huber C, Decker HJ: Inverse regulation of vascular endothelial growth factor and von Hippel Lindau tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinomas is correlated with vascular growth: an in vivo study on 29 tumors. J Mol Med; 77 (6): 505-510, 1999

Brauch H., Weirich G., Brieger J., Glavc D., Rödl H., Eichinger M., Feuerer M., **Weidt EJ**, Puranakanisthra C., Neuhaus C., Pomer S., Brenner W., Schirmacher P., Störkel S., Rotter M., Gugeler N., Decker HJ: VHL Alterations in Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Association with Advanced Tumor Stage and a Novel Hot Spot Mutation. Cancer Research; 60 (7): 1942-8, April 2000.

Brieger J, **Weidt EJ**, Decker HJ: Fast, non-toxic, and inexpensive n-butanol preparation of recombinant plasmids. *Genet Mol Biol*; 23 (2), 299-300, 2000

Weidt E.J., Brieger J, Schirmacher P, Decker HJ.; Increased expression of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in renal cell carcinoma cell lines is directly correlated with decreased expression of the vascular endothelial growth factor. In preparation 2000.

Decker, H.J., Neuhaus, C., Schwerdtle, R., Störkel, S., Puranakanitstha, C., Reifenrath, C., **Weidt, E.J.**, Naumann, S., Reutzel, D., Schirmacher, P., Brenner, W., Hohenfellner, R., and Huber, C. Cytogenetic and molecular studies provide the genetic basis for the immunohistogenetic classification system of epithelial renal tumors. In preparation, 2000.

Diplomarbeit

Nachweis des Expressionverlustes des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens in sporadischen Nierenzellkarzinomen

Promotion

Funktionelle Zusammenhänge zwischen Expressionsveränderungen des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens und dessen potentiellen Zielgenen in sporadischen Nierenzellkarzinomen

