

**Molekulare Charakterisierung der hormonellen Regulation von  
VEGF (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR) in der  
Maus-Tumor-Leydig-Zelllinie MA-10**

Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Gopa Chakrabarti

Aus Kalkutta/Indien

Hamburg  
2001

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	1
<b>2. EINLEITUNG</b>	3
2.1 Aufbau des Hodens	3
2.2 Regulation der testikulären Funktion	4
2.3 Signaltransduktion	5
2.4 Biosynthese der Steroidhormone in Leydig-Zellen	6
2.5 Charakterisierung des StAR-Gens und -Proteins	9
2.6 Aktivierung der Steroidhormonrezeptoren	10
2.7 Charakterisierung des VEGF/VPF	10
2.7.1 Struktur, Funktion und Expression der VEGF-Isoformen	10
2.7.2 Die VEGF-Familie	13
2.7.3 Charakterisierung des VEGF-Promotors der Maus	13
2.7.3.1 Familie der Sp1-Transkriptionsfaktoren	14
2.7.3.2 Familie der Egr-Transkriptionsfaktoren	14
2.7.3.3 Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren	15
2.7.4 Angiogenese und VEGF-Expression	15
2.7.5 Physiologische Bedeutung von VEGF	16
2.8 VEGF-Rezeptoren und Signaltransduktion	17
2.9 Ziel der Arbeit	19
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	21
3.1 Zellbiologische Methoden	21
3.1.1 Zelllinie	21
3.1.2 Kulturbedingungen	21
3.1.3 Stimulierung der Zellen	21
3.2 Molekularbiologische Methoden	23
3.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus MA-10-Zellen	23
3.2.2 Reverse Transkription (RT) der isolierten RNA	24
3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
3.2.4 Gelelektrophorese von DNA	26

3.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	27
3.2.6	Klonierung	27
3.2.6.1	Fill-in-Reaktion	27
3.2.6.2	Linearisierung des Vektors	28
3.2.6.3	Ligation	28
3.2.7	Herstellung der kompetenten Bakterien	29
3.2.8	Transformation	30
3.2.9	Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien	31
3.2.10	Minipräparation von Plasmid-DNA (Telt-Präps)	32
3.2.11	Maxipräparation von Plasmid-DNA	32
3.2.12	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	33
3.2.13	DNA-Sequenzierung	34
3.2.14	Transfektion und Luciferaseassay	35
3.2.14.1	Transiente Transfektion von Zellen	35
3.2.14.2	Luciferaseassay	36
3.2.14.3	$\beta$ -Galaktosidaseassay	37
3.2.15	Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen und Durchführung von Northern Blots	38
3.2.16	Radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden: Random-Oligo(N) <sub>6</sub> -Priming	39
3.2.17	Hybridisierung von Northern Blots	40
3.3	Proteinchemische Methoden	41
3.3.1	Kernproteinextraktion aus Zellen	41
3.3.2	Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	42
3.3.2.1	Herstellung der doppelsträngigen Oligonukleotide	42
3.3.2.2	Markierung der Sonden mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP durch T4- Polynukleotidkinase	43
3.3.2.3	Bindungsreaktion	44
3.3.2.4	Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)	45
3.3.3	ELISA	46
3.3.3.1	Progesteron-ELISA	46
3.3.3.2	VEGF-ELISA	47
3.4	Hilfsprogramme	48

<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
4.1 Biosynthese von Progesteron in MA-10 Zellen	49
4.1.1 Messungen von in das Kulturmedium sezerniertem Progesteron nach Stimulation der MA-10-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von hCG und 8-Br-cAMP	49
4.1.2 Zeitkinetik der Freisetzung von Progesteron in das Kulturmedium nach Stimulation mit 8-Br-cAMP	52
4.2 Regulation der VEGF- und StAR-Expression durch hCG/cAMP in MA-10-Zellen	53
4.2.1 Nachweis der VEGF- und StAR-mRNA durch RT-PCR	54
4.2.2 Nachweis der VEGF- und StAR-Transkripte durch Northern Blot-Analysen	56
4.2.3 Expression von VEGF-Protein in MA-10-Zellen	62
4.2.3.1 Messungen von in das Kulturmedium sezerniertem VEGF-Protein nach Stimulation der MA-10-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von hCG und 8-Br-cAMP	63
4.2.4 Zeitkinetik der Stimulation der VEGF-Genexpression durch cAMP	65
4.2.5 Zeitkinetik der VEGF-Proteinfreisetzung in das Kulturmedium nach Stimulation mit 8-Br-cAMP	67
4.3 Regulation der VEGF-Expression durch das Steroidhormon Progesteron	68
4.3.1 Aminoglutethimid, ein Inhibitor der Steroidhormon-Biosynthese, inhibiert die VEGF-mRNA-Expression	68
4.3.2 Aminoglutethimid, ein Inhibitor der Steroidhormon-Biosynthese, inhibiert die VEGF-Proteinproduktion in MA-10-Zellen	70
4.3.3 Effekt der Steroidhormone auf die VEGF-Genexpression	71
4.3.4 Progesteron induziert die VEGF-Proteinproduktion	74
4.4 Regulation der StAR-Genexpression durch das Steroidhormon Progesteron	76
4.4.1 Aminoglutethimid, ein Inhibitor der Steroidhormon-Biosynthese, inhibiert die StAR-mRNA-Expression	76
4.4.2 Effekt der Steroidhormone auf die StAR-Genexpression	78
4.5 Analyse des VEGF-Promotors der Maus	82
4.5.1 Funktionelle Analyse des VEGF-Promotors	84

4.5.2	Bindungsanalysen am murinen VEGF-Promotor	87
4.5.2.1	Untersuchung der Bindungsaktivität des VEGF-Promotors	87
4.5.2.2	Stimulation des VEGF-Promotors mit 8-Br-cAMP	89
4.5.2.3	Untersuchung der Bindungsaktivität in der distalen Promotorregion (-793/-693)	91
4.5.2.4	Analyse der Transkriptionsfaktoren, die an die proximale und die distale Promotorregion binden	92
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>94</b>
5.1	Regulation der VEGF-mRNA-Expression und Proteinsynthese durch cAMP und Progesteron	94
5.2	Regulation des VEGF-Promotors	96
5.2.1	Zusammenfassung der Literatur über die Expression des humanen VEGF-Promotors	97
5.2.2	Regulation des murinen VEGF-Promotors	98
5.3	Regulation der StAR- und 3 $\beta$ -HSD-mRNA-Expression in MA-10-Zellen	100
5.4	Regulation von VEGF durch die von der Proteinkinase A abhängigen Signal-Kaskade	102
5.5	Physiologische Bedeutung von VEGF im Hoden	103
<b>6.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>105</b>
<b>7.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND GLOSSAR</b>	<b>117</b>
7.1	Abkürzungen	117
7.2	Glossar	118
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>120</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>121</b>

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen nicht benutzt und die von mir aus der Literatur entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Hamburg, den 14. September 2001

Gopa Chakrabarti

## 1. Zusammenfassung

Die Hodenfunktion unterliegt einer vielschichtigen und komplexen Kontrolle durch endo-, auto- und parakrine Faktoren. Einer dieser Faktoren könnte VEGF (vascular endothelial growth factor) sein. Da VEGF sehr potente Eigenschaften als Stimulator der vaskulären Permeabilität im Hoden aufweist, könnte er eine Schlüsselfunktion bei der Aufrechterhaltung der Hodenfunktion innehaben.

Die geplante Forschungsarbeit hat das Ziel, VEGF und seine hormonelle Regulation im Hoden, speziell in Leydig-Zellen, zu charakterisieren. Dafür wurde als Modellsystem die Tumor-Leydig-Zelllinie MA-10 verwendet.

Im ersten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe von RT-PCR und Northern-Hybridisierung bestimmt, welche VEGF-Isoformen in Leydig-Zellen vorkommen. Weiter wurde untersucht, durch welche Signalkaskade die Expression von VEGF in Leydig-Zellen reguliert wird. Durch Stimulation der Leydig-Zellen mit einem Gonadotropinhormon, Steroiden und Inhibitoren der Steroidbiosynthese konnte gezeigt werden, dass die Expression von VEGF durch das Gonadotropinhormon hCG über eine cAMP-abhängige Proteinkinase A-Signalkaskade und durch das Steroidhormon Progesteron reguliert wird. Ausserdem wurden vergleichende Untersuchungen über die Expression der Gene von StAR (steroidogenic acute regulatory protein) und 3 $\beta$ -HSD (3 Beta-Hydroxydehydrogenase), die einer LH/hCG-vermittelten Regulation unterliegen, durchgeführt. StAR ist für den Transport des Cholesterins von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran (der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Steroidbiosynthese) verantwortlich und 3 $\beta$ -HSD ist ein Enzym, das an der Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron beteiligt ist. Die Expression von StAR und 3 $\beta$ -HSD wurden durch Northern-Blot-Analysen untersucht.

Band-Shift-Analysen und Transfektionsstudien zeigten, dass die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 konstitutiv an die proximale Region des Maus-VEGF-Promotors binden und durch cAMP, nicht aber durch Progesteron, innerhalb von 6 Stunden stimuliert werden konnten. Die cytosinreiche Sequenz -723/-693 in der distalen Promotorregion, die im humanen VEGF-Promotor nicht vorhanden ist, wurde auch durch cAMP reguliert. Funktionelle Analysen zeigten eine basale Repression

der distalen Region, die durch den stimulatorischen Effekt von cAMP wieder aufgehoben wurde. An der basalen Repression könnte die cytosinreiche Sequenz -723/-693 beteiligt sein. Jedoch muss diese Annahme weiter untersucht werden.

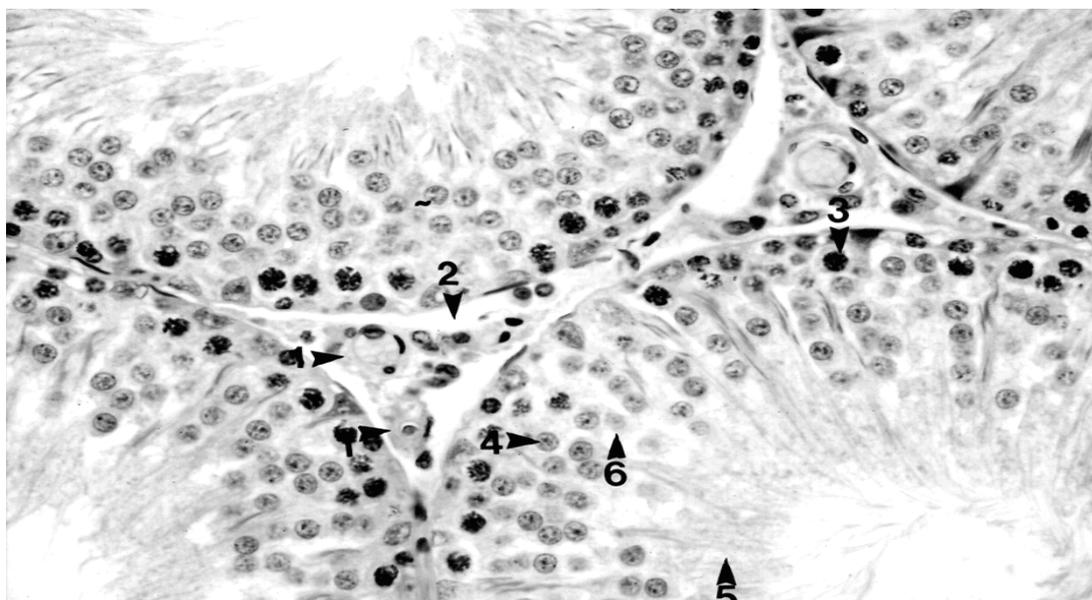
Zusammenfassend zeigen meine Daten, dass die VEGF-Expression sowohl durch Gonadotropin als auch durch das Steroidhormon Progesteron reguliert wird. Die Gonadotropin-vermittelte VEGF-Expression wurde durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A-Signalkaskade und zusätzlich durch Progesteron über einen unbekanntem Signalweg stimuliert. Die VEGF-Expression wurde durch cAMP induziert, indem es die Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an den Promotor aufregulierte. Zusätzlich konnte ein 50 kDa großes, noch nicht identifiziertes Protein an die distale cytosinreiche Sequenz binden. Auch diese konstitutive, basale Bindung konnte durch cAMP weiter stimuliert werden. Welche Rolle die cytosinreiche Sequenz sowie die Repression des distalen Promotorbereichs in der VEGF-Expression spielt, bedarf weiterer Untersuchungen.

## 2. Einleitung

### 2.1 Aufbau des Hodens

Der Hoden ist eine endokrine Drüse. Er ist von einer Bindegewebshülle umgeben, von welcher zarte Scheidewände in die Tiefe ziehen und mehr als 200 Läppchen abgrenzen. In jedem Läppchen findet man 2-3 gewundene Tubuli seminiferi (Hodenkanälchen), in deren Epithel während des Reifevorgangs aus Ursamenzellen Spermien entstehen (Spermatogenese). Zwischen den Tubuli seminiferi, im Interstitium, liegen die Leydig-Zellen, die das männliche Steroidhormon Testosteron produzieren.

Der Hoden wird wegen seiner unterschiedlichen Aufgaben in zwei Kompartimente, die Tubuli seminiferi und das Interstitium, unterteilt (Abb.1). In den Tubuli seminiferi befinden sich sowohl Keimzellen als auch Sertolizellen, die miteinander in Kontakt stehen. Das Interstitium besteht neben den Leydig-Zellen noch aus Blut- und Lymphkapillaren, Nerven, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und Mesenchymzellen.



**Abb. 1** Querschnitt durch den Hoden (nach Payne et al., 1996):

1. Blutgefäße im Interstitium, 2. Leydig-Zellen, 3. Spermatogonien,
4. Spermatozyten, 5. Spermien, 6. Sertoli-Zellen

## 2.2 Regulation der testikulären Funktion

Kontrolle und Regulierung der testikulären Funktion erfolgen überwiegend durch die Hormone des Hypophysenvorderlappens LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikel-stimulierendes Hormon). FSH reguliert die Spermatogenese und die Sertoli-Zellfunktion. LH ist für die Regulation der Testosteronsynthese in Leydig-Zellen verantwortlich. Ferner gibt es eine Vielzahl autokrin und parakrin wirkender Substanzen, die an der Regulation der Hodenfunktion beteiligt sind (Ergün et al., 1994, 1996). Die beiden Gewebekompartimente, die Tubuli seminiferi und das Interstitium, sind beim Menschen hauptsächlich durch die Mikrovaskulatur und bei anderen Spezies, wie der Ratte oder der Maus, zusätzlich durch Lymphgefäße miteinander verbunden. Um eine optimale Produktion des Steroidhormons Testosteron zu gewährleisten, sind die Leydig-Zellen auf eine ausreichende Blutversorgung zur Nährstoff- und Sauerstoffaufnahme angewiesen (Ergün et al., 1995). Daher ist anzunehmen, dass die Permeabilität der Mikrovaskulatur im Hoden eine wichtige Rolle für die Funktion der Leydig-Zellen spielt (Ergün et al., 1994).

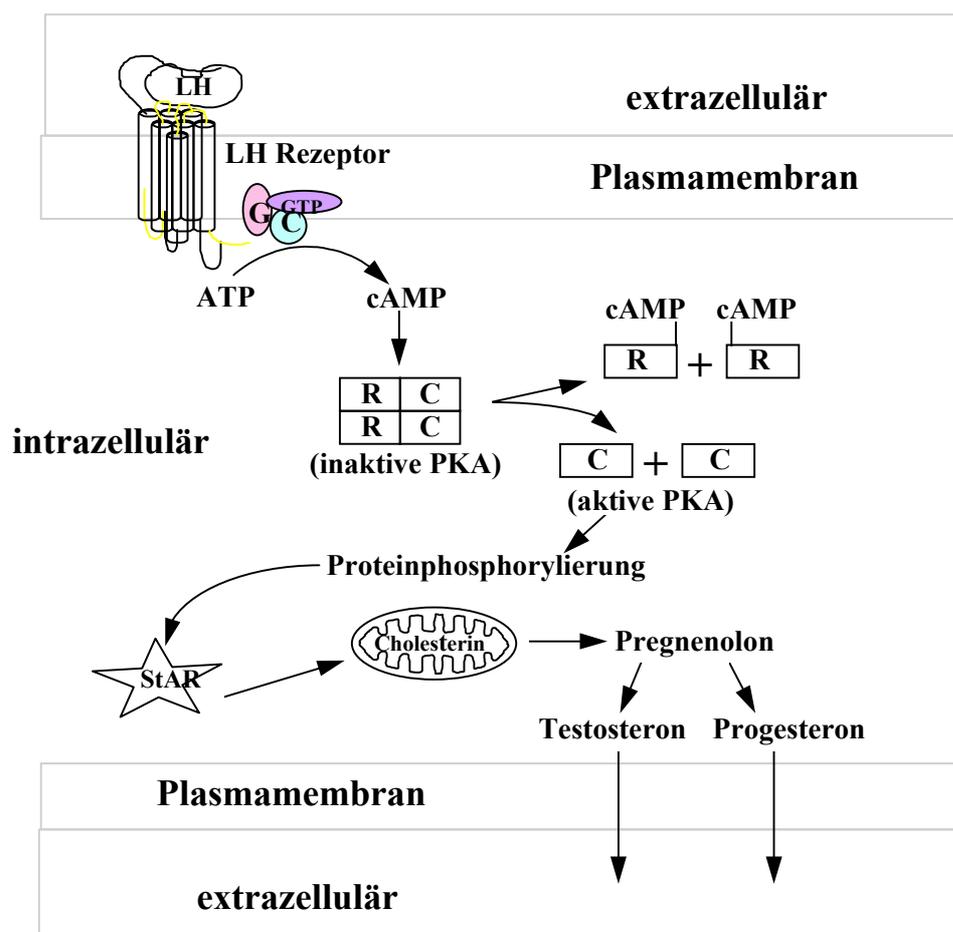
Die Mikrovaskulatur des Hodens ist dadurch gekennzeichnet, dass sie eine enge Beziehung zu den Leydig-Zellen und zu den Tubuli seminiferi aufweist (Ergün et al., 1996). Die Leydig-Zellen im Interstitium bilden dichte, von Fibrozyten gesäumte Zellverbände, die die Blutkapillaren umschließen. Außerdem wird vermutet, dass die Mikrovaskulatur Mechanismen enthält, die wichtig für endo- und parakrine Regulationen sind. Es gibt Hinweise, dass die Mikrovaskulatur mit Rezeptoren für Androgene und Östrogene ausgestattet ist (Ergün et al., 1994; Bergh et al., 1992). Die Mikrovaskulatur wird nicht nur von Steroidhormonen, die von Leydig-Zellen sezerniert werden, sondern auch von vasoaktiven Substanzen (Mukhopadhyay et al. 1995; Saez et al., 1994) beeinflusst. Die enge Assoziation zwischen Kapillaren und Leydig-Zellen ist auch aus Untersuchungen des Hodens einiger Tiere mit saisonal bedingten reversiblen Regressionen ersichtlich. Ebenso sind auch proliferierende Tumore des Hodens auf eine ausreichende Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr angewiesen, die nur durch eine dichte Kapillarisation (Tumor-Angiogenese) gewährleistet werden kann. Diese Daten deuten auf eine zentrale Rolle der Leydig-Zellen in der Gefäßbiologie und in der Angiogenese von Tumoren im Testes hin.

Vermutlich wirken Wachstumsfaktoren und die gefäßaktiven Substanzen hierbei zusammen.

### 2.3 Signaltransduktion

Die Signale des LH-Rezeptors werden durch G-Proteine vermittelt (Dixon et al., 1986). Charakteristisch für einen Rezeptor mit G-Protein-gekoppelter Signaltransduktion, wie den LH-Rezeptor, ist seine Struktur mit sieben putativen Transmembrandomänen (Dixon et al., 1986). Das aminoternale Ende des Peptids ist extrazellulär und das carboxyterminale Ende intrazellulär. Es wurde nachgewiesen, dass nicht nur Leydig-Zellen, sondern auch Endothelzellen der Kapillaren im Hoden mit LH-Rezeptoren ausgestattet sind (Ghinea et al., 1995; Breucker, 1982).

Wie Abb. 2 zeigt, führt die Bindung von LH an seinen Rezeptor, der in der Zellmembran der Leydig-Zellen integriert ist, zur Aktivierung des stimulierenden G-Proteins (Gs). G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ). Die durch LH verursachte Konformationsänderung des Rezeptors bewirkt, dass ein gebundenes GDP der  $\alpha$ -Untereinheit durch GTP ersetzt wird, was zur Abdissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit von dem Gs-Komplex führt (Strosberg, 1996). Die stimulierte  $\alpha$ -Untereinheit lagert sich an die Adenylatzyklase an. Das durch die  $G\alpha$ -Untereinheit aktivierte Enzym katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP, so dass der Anstieg des intrazellulären cAMPs ein frühes, messbares Ereignis darstellt (Milligan et al., 1989). Der intrazelluläre "second messenger" cAMP leitet das Signal in der Zelle weiter, indem er die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Diese Proteinkinase besteht aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten. Wenn jeweils zwei cAMP-Moleküle an die regulatorischen Untereinheiten binden, dissoziieren die katalytischen Einheiten ab und phosphorylieren Proteine, die unter anderem auch die Steroidbiosynthese erhöhen (Swillens et al., 1990). Die Zeit von der Aktivierung des Rezeptors durch LH bis zur Steroidproduktion dauert nur wenige Minuten (Watermann, 1995; Austin et al., 1979).



**Abb. 2 Regulation der Steroidbiosynthese in Leydig-Zellen**

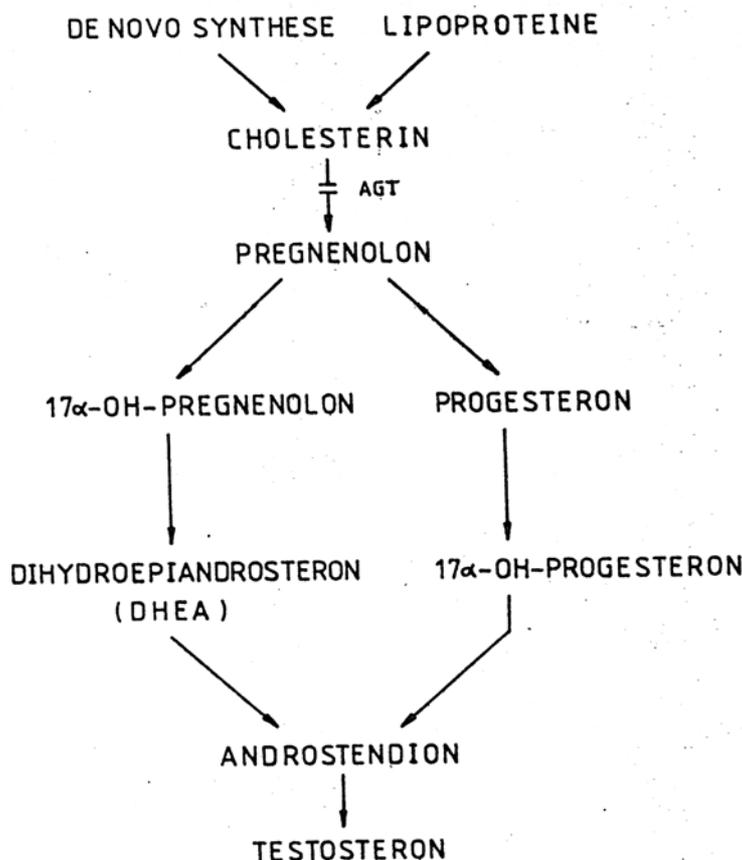
Die nähere Beschreibung der schematischen Darstellung siehe obigen Text

PKA: Proteinkinase A besteht aus zwei regulatorischen (R) und zwei katalytischen (C) Untereinheiten

## 2.4 Biosynthese der Steroidhormone in Leydig-Zellen

Hormone sind chemisch sehr unterschiedlich und werden in drei Gruppen eingeteilt. Einige sind niedermolekulare Aminosäureabkömmlinge, wie z.B. Adrenalin und Thyroxin. Andere sind Polypeptide oder Proteine, z.B. Oxytocin, Insulin und das thyroïdstimulierende Hormon (TSH). Die dritte Gruppe der Hormone, die Steroide, besteht aus Cholesterinderivaten. Zur Gruppe der Steroidhormone gehören die Glucocorticoide, Mineralocorticoide und alle Sexualsteroidhormone, wie z.B. Östrogen, Testosteron und Progesteron. Sie werden in der Nebennierenrinde, in den männlichen und weiblichen Keimdrüsen und während der Schwangerschaft auch in der Plazenta gebildet.

Cholesterin, die Ausgangssubstanz für die Steroidbiosynthese, wird den verschiedenen Organen und Geweben über zwei Wege zur Verfügung gestellt: über die *de novo* Synthese aus Acetyl-CoA oder über die Mobilisierung des "Low Density Lipoproteins" (LDL), bei Nagetieren durch das "High Density Lipoprotein" (HDL) (Gwynne und Mahaffe, 1989). Cholesterin wird durch LDL bzw. HDL als Cholesterinester transportiert, in die Zellen durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und anschließend als vesikulärer Lipidtropfen im Zytoplasma gespeichert. Die Synthese der Steroidhormone in den Zellen findet hauptsächlich in den Mitochondrien statt (Simpson und Boyd, 1966,1967; Yago und Ichii, 1969; Churchill und Kimura, 1979). Während der Steroidproduktion wird der Cholesterinester durch das Enzym Cholesterinesterhydrolase im Zytosol in Cholesterin umgewandelt (Stone und Hechter, 1954) und gelangt in löslicher Form zur äusseren Mitochondrienmembran (van Meer, 1989; Schroeder et al., 1991; Jefcoate et al., 1992). StAR (steroidogenic acute regulatory protein) vermittelt dann den Transport von Cholesterin von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran (Liscum und Dahl, 1992; Jefcoate et al., 1992; Stocco und Clark, 1996), wo es an der Matrix auf das Enzym P450<sub>scc</sub> trifft (side chain cleavage enzym) (Ferguson 1962, 1963; Garren et al., 1965, 1966). Der erste Schritt der Biosynthese ist die Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon (Stone und Hetcher, 1954), die durch dieses Enzym katalysiert wird. Anschließend wird Pregnenolon durch das Enzym 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) in Progesteron umgewandelt (Sulimovici et al., 1973; Chapman et al., 1992; Cherradi et al., 1994, 1995, 1997; Sauer et al., 1994). Spätestens nach der Pregnenolon-Umwandlung erfolgt der Transfer des gebildeten Progesterons aus den Mitochondrien in das endoplasmatische Retikulum zur Synthese von Testosteron (Abb. 3). Progesteron, das weibliche Sexualhormon, wird in Mineral- sowie Glucocorticoide umgewandelt. In den Leydig-Zellen dient Progesteron hauptsächlich als Ausgangssubstanz für Testosteron. Zielzellen können Testosteron über zytoplasmatische Rezeptoren aufnehmen und in Dihydroxytestosteron (DHT) umwandeln. Zusätzlich findet in den Leydig-Zellen eine geringe Produktion von Gestagenen und Östrogenen statt.

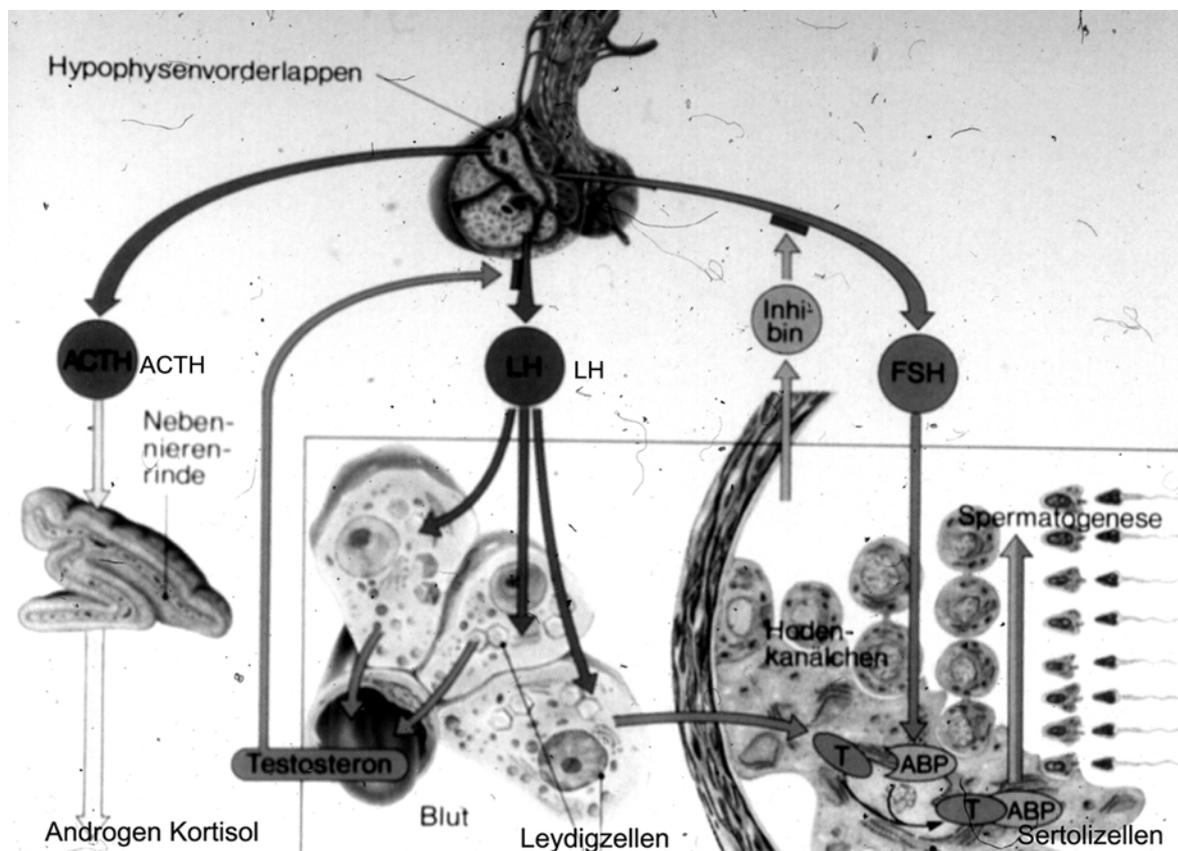


**Abb. 3 Testosteronsynthese in Leydig-Zellen**

Aminogluthethimid (AGT) inhibiert das P450 scc-Enzym und damit die Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon

Die in Abb. 3 gezeigte Biosynthese wird hauptsächlich durch gonadotrope Hormone reguliert. Die Androgensynthese, durch die das Endprodukt Testosteron gebildet wird, wird durch einen Rückkopplungsmechanismus der Hypothalamus-Adenohypophysen-Achse kontrolliert. Im Hypothalamus wird das „Gonadotropin Releasing Hormon“ (GnRH) gebildet und ausgeschüttet. Es gelangt in die Hypophyse und bewirkt dort die Freisetzung von LH und FSH, die auf dem Blutweg zu den Leydig-Zellen gelangen und dort an ihre spezifischen Rezeptoren in der Plasmamembran binden (Abb. 4). Bereits eine 1%ige Besetzung der Rezeptoren reicht aus, um eine maximale Stimulation der Steroidbiosynthese zu erzielen (Mendelson et al., 1975). *In vitro* kann die Testosteronsynthese in Leydig-Zellen neben LH auch durch das humane Choriongonadotropin (hCG) stimuliert werden (Sharpe et al., 1976, Purvis et al., 1977; Haour et al., 1977). Das hCG ist ein Proteinhormon, das von der Plazenta gebildet wird. Da reines LH aus der Hypophyse nur schwer erhältlich ist, wird hCG in

der Forschung häufig verwendet, weil es die gleiche Wirkung wie LH hat und sich leicht aus dem Harn schwangerer Frauen gewinnen lässt. LH und hCG binden und stimulieren denselben Rezeptor.



**Abb. 4** Schematische Darstellung der hormonellen Regulation der Hoden-Funktion (modifiziert nach Matsumoto et al., 1992)

wie im obigen Text näher beschrieben

## 2.5 Charakterisierung des StAR (steroidogenic acute regulatory protein) -Gens und -Proteins

StAR ist ein 30 kDa großes Protein, welches aus den Mitochondrien einer Maus-Tumor-Leydig-Zelllinie (MA-10-Zellen) gereinigt wurde (Clark et al., 1994). Die das StAR-Protein kodierende DNA wurde aus Maus (Clark et al., 1994), Mensch (Sugawara et al., 1995) und Rind (Hartung et al., 1995) isoliert. Die aus den Nukleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen im Vergleich dieser Spezies eine fast 84 %ige Homologie untereinander. Die Genstruktur von StAR wurde bei Maus und Mensch charakterisiert (Sugawara et al., 1995a, b; Caron et al.,

1997). Das gesamte Gen besteht aus 7 Exons und 6 Introns, wobei die Exons 3-6 bei Maus und Mensch in der Größe identisch sind. Das StAR-Gen befindet sich auf dem humanen Chromosom an Position 8p 11.2. Ein StAR-Pseudogen wurde auf Chromosom 13 entdeckt. Die cDNA ist 1456 bp lang. Das offene Leseraster (ORF) von 852 Nukleotiden kodiert für 284 Aminosäuren.

Die Expression von StAR wird hauptsächlich durch die Proteinkinase A (PKA)-abhängige Signaltransduktion reguliert. Daneben spielt auch die Proteinkinase C (PKC) eine Rolle für die Regulation der StAR-Expression (Kiriakidou et al., 1996).

## **2.6 Aktivierung der Steroidhormonrezeptoren**

Im Gegensatz zu den Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen befinden sich die Steroidhormonrezeptoren im Zytosol oder im Zellkern. Die Rezeptoren, die kein Hormon gebunden haben, sind Teil eines Multiproteinkomplexes, der aus dem Rezeptor, zwei Molekülen Hsp90 (heat shock protein, Molekulargewicht von 90 kDa) und mehreren anderen Hsp-Proteinen (Hsp 70, Hsp 56) besteht. Nach Bindung des Liganden dissoziieren die Hsp-Proteine vom aktivierten Rezeptor. Der Rezeptor bindet dann als Dimer an sein Response-Element im Promotor und aktiviert die Transkription des Zielgens.

## **2.7 Charakterisierung des Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor (VEGF/VPF)**

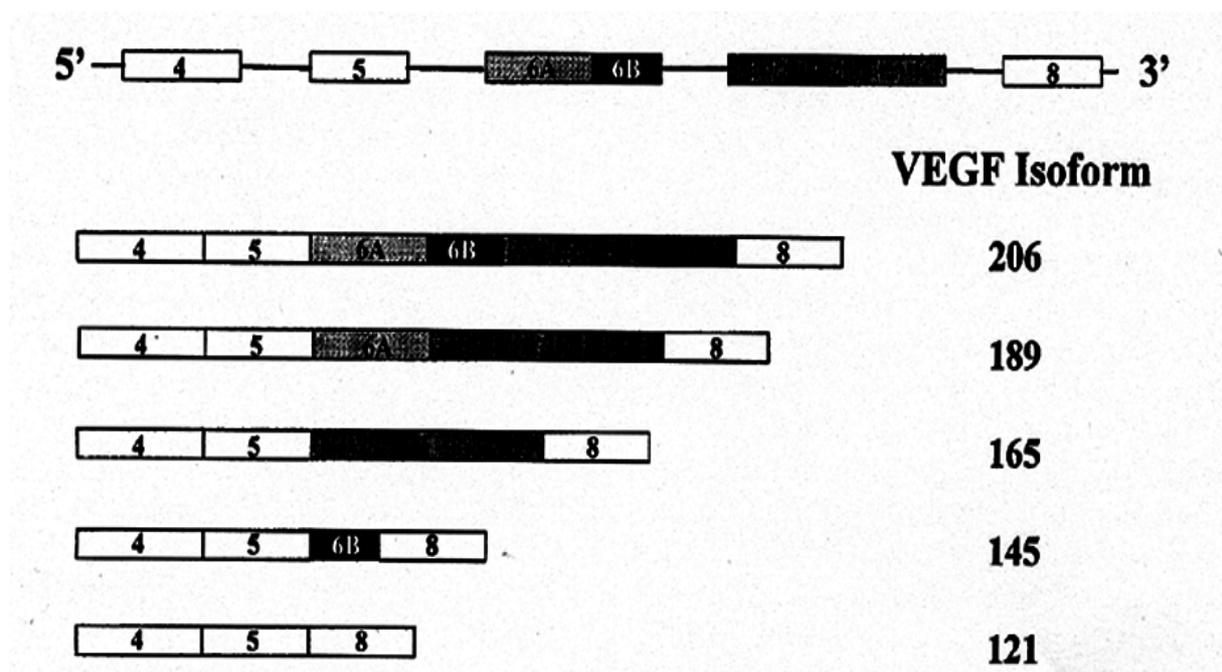
### **2.7.1 Struktur, Funktion und Expression der VEGF-Isoformen**

Für den physiologischen Ablauf der Angiogenese (der Bildung neuer Blutgefäße) und für das Wachstum von Tumoren spielen angiogenetische Faktoren wie VEGF, ECGF (Endothelial Cell Growth Factor) und PDGF (Platelet Derived Growth Factor) eine wichtige Rolle. VEGF weist sehr potente Eigenschaften als Stimulator der vaskulären Permeabilität auf (Ergün, 1994). Als ein Permeabilitätsfaktor ist VEGF 50.000-fach potenter als Histamin. Daher wird VEGF auch VPF (Vascular Permeability Factor) genannt (Connolly et al., 1989; Senger et al., 1983). VEGF ist ein Homodimer und besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken miteinander

verbunden sind. Es ist ein Heparin bindendes Glykoprotein und ist stabil gegen Hitze und Säuren. Durch SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) wurde festgestellt, dass sein Molekulargewicht 46 kDa beträgt (Ferrara et al., 1992; Shifern et al., 1994).

Das VEGF-Gen befindet sich auf dem humanen Chromosom an Position 6p 12 (Wei et al., 1996). Das VEGF-Gen besteht aus acht Exons, die durch sieben Introns voneinander getrennt sind (Abb. 5). Durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen verschiedene Isoformen des VEGF-Polypeptids mit jeweils unterschiedlicher Länge (Tisher et al., 1991; Houck et al., 1992). Aufgrund der Länge der abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden die Namen der VEGF-Isoformen vergeben (Keith et al., 1991). VEGF<sub>206</sub> wird durch alle acht Exons und ein zusätzliches Exon 6A kodiert. Dem VEGF<sub>189</sub>-Transkript fehlt Exon 6A. Dem Transkript, das für VEGF<sub>165</sub> kodiert, fehlen die Exons 6 und 6A. Der vierten VEGF-Isoform VEGF<sub>145</sub> fehlt Exon 7. Einer anderen VEGF-Isoform, VEGF<sub>121</sub>, fehlen die Exons 6, 6A und 7. Die Isoformen VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub> kommen am häufigsten vor, VEGF<sub>189</sub> in geringerem Maße. Eine sehr selten vorkommende Isoform ist VEGF<sub>206</sub>. Die Spleißvarianten wurden nach ihrer Bindungsaffinität zu Heparin charakterisiert (Poltorak et al., 1997). Die größeren Isoformen (VEGF<sub>206</sub> und VEGF<sub>189</sub>) sind stark basisch und als zelluläre oder perizelluläre Heparinsulfat-Proteoglykane in der extrazellulären Matrix gebunden. Die kleineren Isoformen (VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>145</sub>) haben dagegen eine geringere Affinität zu Heparinsulfat, weswegen sie in der extrazellulären Flüssigkeit löslich sind und frei diffundieren können (Houck et al., 1992; Klagsbrun et al., 1993; Park et al., 1993). VEGF<sub>165</sub> nimmt eine Zwischenstellung ein, wobei einige der Moleküle frei diffundieren und andere an der extrazellulären Matrix gebunden werden (Park et al., 1993).

Alle Isoformen von VEGF wirken mitogen auf Endothelzellen und erhöhen die Permeabilität der Blutgefäße (Houck et al., 1992). VEGF spielt bei der Regulation der Proliferation von Endothelzellen, sowohl in differenzierten als auch in entarteten Geweben, eine wichtige Rolle (Bacic et al., 1995; Keyt et al., 1996). Sowohl die matrixgebundenen Isoformen, die durch proteolytische Prozesse freigesetzt werden, als auch die kleineren frei diffundierenden wirken an ihren Zielzellen über ihre Rezeptoren.



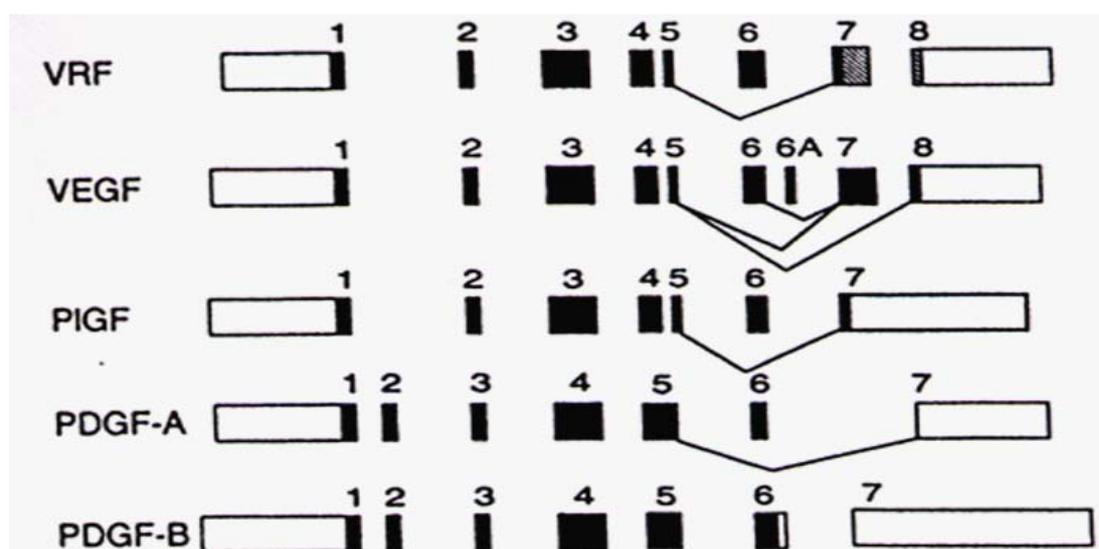
**Abb. 5 Genstruktur der verschiedenen Isoformen von humanem VEGF**  
(nach Whittle et al, 1999)

Alle Varianten stammen von dem gleichen Gen ab und entstehen durch alternatives Spleißen.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der VEGF-Isoformen der Nagetiere sind gegenüber den humanen jeweils um eine Aminosäure verkürzt, wie z.B. VEGF<sub>188</sub>, VEGF<sub>164</sub> und VEGF<sub>120</sub>. Fast alle Gewebe der Nagetiere exprimieren die verschiedenen Spleiß-Varianten (Bacic et al., 1995). Die VEGF-Isoform, die hauptsächlich im Herz und in der Lunge der Ratte vorkommt, kodiert für VEGF<sub>188</sub> (ca. 50% der gesamten VEGF-mRNA). Im Gehirn und in der Niere kommt VEGF<sub>164</sub> zu ca. 25% vor. In der Milz sind VEGF<sub>164</sub> und VEGF<sub>120</sub> in vergleichbarer Menge vertreten. VEGF<sub>120</sub> kommt außerdem in der Niere, Lunge, im Herz und im Gehirn vor. Im Pankreas werden die kleineren Isoformen von VEGF (VEGF<sub>120</sub> und VEGF<sub>164</sub>) sehr stark exprimiert (Bacic et al., 1995; Keyt et al., 1996). Bis jetzt wurde die Expression der Isoform VEGF<sub>145</sub> im humanen Uterus (Charnock-Jones et al., 1993), der Plazenta und in mehreren Tumorzelllinien aus den weiblichen Reproduktionsorganen beobachtet. Vor kurzer Zeit wurde die Expression von VEGF<sub>145</sub> in Lunge und Penis der Ratte beschrieben. VEGF<sub>206</sub> wird wie VEGF<sub>145</sub> in humaner fötaler Leber und Plazenta sowie in der Lunge und dem Penis der Ratte exprimiert (Burchardt et al., 1999).

## 2.7.2 Die VEGF-Familie

Zur VEGF-Familie gehören vier weitere Wachstumsfaktoren: PDGF (platelet derived growth factor), PIGF (placenta growth factor), VEGF-B und VEGF-C (Abb.6). Sie werden allgemein auch VRF (vascular related factor) genannt. Die Aminosäuresequenzen von VEGF und PIGF zeigen eine limitierte, aber deutliche Homologie von 18% bzw. 53% zu den Sequenzen der A- bzw B-Kette von PDGF (Maglione et al., 1991).



**Abb. 6 Genstruktur der Mitglieder der humanen VEGF-Familie (nach Townson et al., 1996)**

Alle Mitglieder werden von jeweils einem Gen kodiert und zeigen untereinander eine deutliche Homologie in ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenz. Die dargestellten Transkripte kodieren für verschiedene Spleiß-Varianten von vascular related factor (VRF), vascular endothelial growth factor (VEGF), placenta growth factor (PIGF), platelet derived growth factor (PDGF-A und PDGF-B).

## 2.7.3 Charakterisierung des VEGF-Promotors der Maus

Shima et al. isolierten 1996 das Gen für VEGF aus der Maus. Sie zeigten, dass eine 1.2 kb lange 5'-flankierende Sequenz ausreichend für die Promotoraktivität war. Ähnlich wie der humane VEGF-Promotor enthält der murine Promotor weder eine TATA-Box noch eine CCAAT-Konsensussequenz für die RNA-Polymerase II-initiierte Transkription. Jedoch befinden sich GC-reiche Regionen, die

Konsensusbindungsmotive für den Transkriptionsfaktor Sp1 sein könnten, 50-80 bp stromaufwärts relativ zur Transkriptionsstartstelle. Sequenzanalysen der 1,2 kb langen Region enthüllten die Anwesenheit einer Anzahl potentieller cis-regulatorischer Elemente. Konsensusbindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, Sp3, AP-2, AP-1, HIF-1, GCN-4, RAP-1, Egr und Gata-1 sind vorhanden. Im Gegensatz zum humanen Promotor gibt es zusätzlich zwei Konsensusbindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B an den Positionen -90 und -185 bp relativ zu der Startstelle im murinen Promotor.

Die „Primer-Extensionsanalyse“ der Transkriptionsinitiationsstelle zeigt, dass die mRNAs aus Mensch und Maus eine ungewöhnlich lange untranslatierte 5'-Region (5'-UTR) von ca. 1 kb besitzen (Tisher et al., 1991).

Die Transkriptionsinitiationsstelle und zahlreiche Regionen innerhalb des proximalen murinen Promotors teilen signifikante Ähnlichkeiten in Sequenz und Organisation mit dem humanen Homolog, wobei die Promotoren insgesamt eine Ähnlichkeit von 66.1% aufweisen.

### **2.7.3.1 Familie der Sp1-Transkriptionsfaktoren**

Sp1 ist ein sequenz-spezifischer Transkriptionsfaktor, der an das Konsensus-Motiv 5'-GGGGCGGGGC-3' bindet. Die Sequenzspezifität für diese GC-Boxen ist durch die Zinkfinger-DNA-Bindungsdomäne gegeben. Sp1 gehört zu den Faktoren, die durch Phosphorylierung an den Promotor gebunden werden (Kadonaga et al., 1987). Weitere Mitglieder der Sp-Genfamilie sind Sp2, Sp3 und Sp4. Sp3 kann auch als Repressor die Transkription negativ regulieren (Hagen et al., 1987).

### **2.7.3.2 Familie der Egr-Transkriptionsfaktoren**

Die Mitglieder der Egr-Familie binden an die Konsensus-Sequenz 5'-GCGGGGCGAGCGGGGCG-3'. Auch diese Transkriptionsfaktoren haben als DNA-Bindungsdomäne eine Zinkfingerstruktur, die derjenigen des Sp1-Faktors sehr ähnlich ist. Zu dieser Familie gehören die Transkriptionsfaktoren Egr-1, Egr-2, Egr-3 und Egr-4 (Joseph et al., 1988; Patwardhan et al., 1991). Tourtellotte et al. (2000)

beobachteten erniedrigte Konzentrationen von LH und Testosteron im Serum männlicher Egr-4/Egr-1-mutierter Mäuse. Diese Daten demonstrierten, dass die LH-Hormon-Regulation und die Steroidbiosynthese in Leydig-Zellen auch von Egr-1 und Egr-4 abhängig sind. Egr-1 kann auch als Repressor auf die Transkription gewisser Gene wirken, indem er die Bindung von Sp1 an die mit dem Egr-1-Motiv überlappende Sp1-Bindungsstelle verhindert und folglich die Stimulation durch Sp1 hemmt (Huang et al., 1997).

### 2.7.3.3 Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren

AP-2-Transkriptionsfaktoren binden spezifisch an die DNA-Konsensus-Sequenz 5'-CCCCAGGC-3'. Zu den Mitgliedern der AP-2-Familie gehören AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  und AP-2 $\gamma$ . AP-2 wird durch zwei verschiedene Signalkaskaden aktiviert: Die eine involviert die durch Phorbol ester und Diazylglyzerin aktivierte Proteinkinase C und die andere die cAMP-abhängige Proteinkinase A (Christenson et al., 1997).

Faktoren	MW	Faktoren	MW
Sp1	95/105* kDa	Sp3	90 kDa
Egr-1	75-80 kDa	AP-2 $\alpha$	50 kDa
Egr-2	56 kDa	AP-2 $\beta$	50 kDa
Egr-3	46 kDa	AP-2 $\gamma$	54 kDa

**Tabelle I** Molekulargewicht (MW) der verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die potentielle Bindungsaktivität für den murinen VEGF-Promotor besitzen. \*phosphoryliert.

### 2.7.4 Angiogenese und VEGF-Expression

Während der embryonalen Entwicklung ist die Kapillarisierung oder die Bildung der Blutgefäße (Angiogenese) sehr stark von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) abhängig (Ferrara et al., 1989; Mayerhofer A. et al., 1990). In adulten Organismen ist sie sehr selten. VEGF kommt in adulten Organismen in den meisten Tumorzellen vor, wie z.B. in Lungen-, Blasen- und Fibrokarzinomen, Leukämien,

Gliomen und Lymphomen. Ein weiteres Beispiel für die Bildung neuer Gefäße im adulten Organismus ist die Wundheilung von geschädigten Geweben (Shweiki et al., 1992; Folkmann et al., 1992). In den weiblichen Reproduktionsgeweben werden z. B. in verschiedenen Phasen des Menstruationszyklus Blutgefäße gebildet. Im Ovar und Uterus gibt es klare Beweise für zyklusabhängiges Wachstum und Regression der Blutgefäße (Folkmann et al., 1992; Ferrara et al., 1997).

In differenzierten Zellen ist VEGF z.B. in Endothelzellen, aktivierten Makrophagen, Keratinozyten, glatten Muskelzellen und Leydig-Zellen nachweisbar (Shweiki et al., 1993). Bei Krankheiten wie z.B. Krebs, Retinopathia Diabetis und rheumatoider Arthritis kann Angiogenese vorkommen, die durch eine verringerte Sauerstoffkonzentration im Gewebe (Hypoxie) induziert wird (Dvorak et al., 1991; Shweiki et al., 1992) und so die notwendige Versorgung der entarteten Zellen gewährleistet.

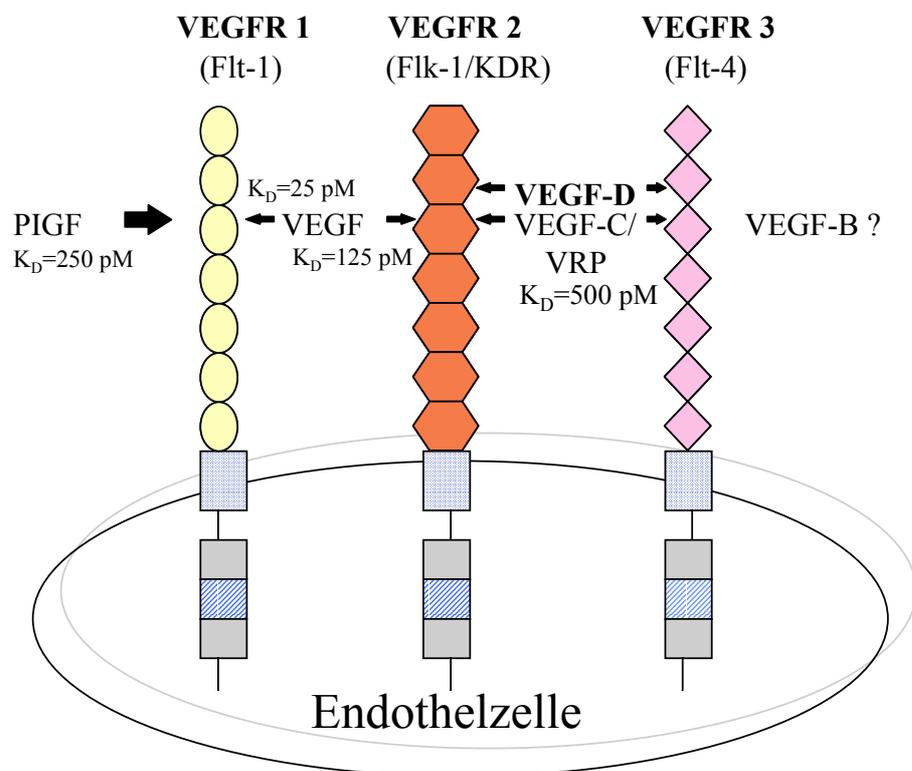
### 2.7.5 Physiologische Bedeutung von VEGF

Durch Stimuli wie Hypoxie, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone werden Expression und Sekretion von VEGF induziert. Dabei werden die Isoformen VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub> löslich und diffundieren. Diese Proteine aktivieren sowohl interstitielle Kollagenasen, Plasminogenaktivatoren (PA) und Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) als auch Plasmaproteine. Aus aktiviertem Plasminogen entsteht Plasmin, das die an der extrazellulären Matrix gebundenen VEGF-Isoformen, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub>, abspaltet. Bei diesem Prozess wird das proteolytische Spaltprodukt VEGF<sub>110</sub> frei, das diffundieren kann. Dieses Spaltprodukt wurde zuerst *in vivo* beobachtet (Keyt et al., 1996). Bei endothelialen Zellen werden daher zwei verschiedene Mechanismen für die VEGF-Expression postuliert: 1. Expression der durch alternatives Spleißen entstehenden, frei diffundierenden Isoformen VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub>; und 2. Expression der matrixgebundenen Spleißvarianten, VEGF<sub>188</sub> und VEGF<sub>206</sub>, aus denen nach Aktivierung der Protease die kürzere, lösliche Isoform VEGF<sub>110</sub> abgespalten wird. Die Proteolyse wird beendet, wenn PAI aktiviert wird und die Funktion von PA inhibiert (Abb. 7).

VEGF<sub>110</sub> bindet an VEGF-Rezeptoren in der Zellmembran und stimuliert die endotheliale Zellproliferation (Ferrara et al., 1997). Da die kleineren löslichen



Die Liganden für diese Rezeptoren sind lösliche Proteine und wirken meistens innerhalb des Gewebes, in dem sie synthetisiert werden. Einige andere Liganden, die membrangebunden sind, stimulieren die Rezeptoren der unmittelbar benachbarten Zellen durch Zell-Zellkontakte.



**Abb. 8 Die Rezeptoren von VEGF und VRF (modifiziert nach Ferrara et al., 1997)**

Es gibt drei verschiedene VEGF-Rezeptoren: VEGFR 1 (Flt-1, fms-like Tyrosine Kinase), VEGFR 2 (Flk-1, Foetalleber-Kinase-1/KDR), der eine Domäne mit Kinase-Aktivität enthält, und VEGFR 3 (Flt-4). Die extrazellulären Domänen von Flt-1, KDR/Flk-1 und Flt 4 haben sieben Immunglobulin-ähnliche Domänen und eine intrazelluläre Domäne (Mustonen et al., 1995), die die PTK trägt. VEGF (Neufeld et al., 1994) und PIGF (Maglione et al., 1991) haben Bindungsaffinität zu diesen Rezeptoren. VEGF bindet mit hoher Affinität an Flt-1 und KDR (Shweiki et al., 1993). An die Flk-1 Rezeptoren binden zusätzlich PDGF und PIGF (Ullrich et al., 1990; Rosnet et al., 1993).

Die Signaltransduktion von VEGF-Rezeptoren ist bis jetzt noch nicht vollständig beschrieben. Die Bindung von VEGF an seine Rezeptoren bewirkt eine

Konformationsänderung. Die aktivierten Rezeptoren übertragen ein Signal, das zur Proliferation der Blutgefäße (Angiogenese) führt (Kaipainen et al., 1993; Breier et al., 1992). Die intrazelluläre Tyrosinkinase phosphoryliert zuerst Phospholipase-C $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) und zwei aneinander gebundene Proteine. Vermutlich induziert die intrazelluläre Src-Homologie-2-(SH2)-Domäne von PLC- $\gamma$  die Phosphorylierungen von Phosphatidylinositol-3-Kinase und Ras-GTPase-aktivierten Proteinen. Schliesslich führt dieser Mechanismus zu einer Steigerung der zytosolischen Kalziumionenkonzentration (Terman et al., 1992; Guo et al., 1995).

## **2.9 Ziel der Arbeit**

Leydig-Zellen im Hoden sind auf eine ausreichende Blutversorgung zur Nährstoff- und Sauerstoffaufnahme angewiesen, um eine optimale Produktion des Steroidhormons Testosteron zu gewährleisten. Die Mikrovaskulatur im Hoden ist für die Blutversorgung verantwortlich. Daher ist anzunehmen, dass die Permeabilität der Mikrovaskulatur im Hoden eine wichtige Rolle für die Funktion der Leydig-Zellen spielt. Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass VEGF und seine Rezeptoren im menschlichen Hoden exprimiert werden (Ergün et al., 1995).

Das Ziel dieses Projektes war, die Regulation der Expression des Permeabilitätsfaktors VEGF im Hoden, insbesondere in den Leydig-Zellen, zu charakterisieren und den Einfluss der Gonadotropine und der Steroidhormone zu analysieren. Hierfür wurden mit molekularbiologischen Methoden die Regulation der VEGF-Expression auf mRNA- und auf Protein-Ebene untersucht.

Im Gegensatz zum humanen Promotor wurde der murine Promotor bislang kaum untersucht. Band Shift-Analysen und Transfektionsstudien wurden durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Gonadotropine LH und/oder hCG und Steroidhormone den Promotor des Maus-VEGF-Gens aktivieren und welche Transkriptionsfaktoren in ruhenden und stimulierten Leydig-Zellen binden können. Es sollte ferner die Lage und Funktion wichtiger regulatorischer Elemente des Maus-VEGF-Promotors untersucht werden.

Um die Regulation der VEGF-Expression zu analysieren, wurde die Tumor-Leydig-Zelllinie MA-10 als Modellsystem benutzt. Durch ihre hohe Wachstumsrate ist eine ausreichende Menge von Zellen für *in vitro* Untersuchungen leicht verfügbar. Weiterhin ist bekannt, dass VEGF als angiogenetischer Faktor beim Wachstum von Tumoren eine bedeutende Rolle spielt und daher vermutlich auch in diesen Tumorzellen in ausreichender Menge exprimiert wird.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Zellbiologische Methoden**

##### **3.1.1 Zelllinie**

Alle Zellkultur-Experimente wurden mit der aus Leydig-Zellen der Maus abgeleiteten Tumorzelllinie (MA-10-Zellen) durchgeführt. Die MA-10-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Mario Ascoli, Vanderbilt Medical School, Tennessee, USA (Ascoli et al., 1981) zur Verfügung gestellt.

##### **3.1.2 Kulturbedingungen**

###### Material:

Alle Chemikalien, deren Bezugsquelle nicht besonders aufgeführt ist, wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

- Kulturmedium: DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's Medium mit 3.7 g/l Natriumbicarbonat) wurde im Verhältnis 1:1 mit Ham's F12-Medium (1.24 mg/l Phenolrot und 1.176 g/l Natriumbicarbonat) gemischt. Dieser DMEM/HF12-Mischung wurden 7.5 % HS (Pferdeserum), 2.5 % FCS (fötales Kälberserum), 2 % Penicillin:Streptomycin (Verdünnung 1:50 bei 10.000 U/ml), 1 % Glutamin und 0.1 % BSA (Merck) zugesetzt.

Methode: Die Kultivierung der Zellen erfolgte stets bei 36°C unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (5%). Die MA-10-Zellen wurden im Kulturmedium bis zur Konfluenz angezogen. Nach der Trypsin/EDTA-Behandlung wurde die Zellzahl unter einem Mikroskop mit einer Neubauer-Zellkammer bestimmt und eine geeignete Zellzahl für die weitere Kultivierung verwendet.

##### **3.1.3 Stimulierung der Zellen**

Vor der RNA-Isolierung (Kap. 3.2.1), der Protein-Extraktion (Kap. 3.3.1) und dem ELISA (Kap. 3.3.3) sowie nach der Transfektion der Zellen (Kap. 3.2.14) wurden die kultivierten Zellen mit verschiedenen Substanzen stimuliert, um deren Auswirkungen

auf die Genexpression zu untersuchen. Die Stimulation der MA-10-Zellen erfolgte in serumfreiem Medium unter Zusatz von 1% BSA und jeweils einer der folgenden Substanzen: Humanes Choriongonadotropinhormon (hCG), 8-Br-cAMP, Progesteron (Prog), Dexamethason (Dex), Dehydroxytestosteron (DHT) und Aminoglutethimid (AGT). Als Kontrolle dienten jeweils nicht stimulierte Zellen.

Nach der Stimulation wurden die MA-10-Zellen je nach durchzuführendem Versuch unterschiedlich weiter bearbeitet. Für die ELISA-Versuche wurde der gesamte Überstand abgenommen und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Für die RNA-Isolierung und Kernprotein-Extraktion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstandes wurde das Pellet (Kap. 3.3.1) bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Tabelle II zeigt eine Zusammenstellung der für die Stimulierung verwendeten Substanzen, deren Endkonzentration im Kulturmedium (f.c.) und die Dauer der Stimulation.

Substanz (Abkürzung, Firma)	Endkonz. im Medium	Stimulationszeit (Stunden)
Humane Choriongonadotropinhormon (hCG, Roche Molecular Biochemicals)	4 ng/ml	jeweils 20 oder 6
8-Br-cAMP (Biolab)	1 mM	jeweils 20 oder 6
Progesteron (Prog, Sigma)	10 $\mu\text{g/ml}$	jeweils 20 oder 6
Dexamethason (Dex., Sigma)	$10^{-7}$ M	20
Dehydroxytestosteron (DHT, Sigma)	$10^{-7}$ M	20
Aminoglutethimid (AGT)	5 $\mu\text{g/ml}$	20

**Tabelle II: Übersicht über die Substanzen, die für die Stimulierung der Zellen verwendet wurden**

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus MA-10-Zellen

#### Material:

- „RNA-Clean“ Lösung (AGS GmbH)
- Isopropanol (Merck)
- Ethanol (Merck)
- DEPC-Wasser (Roth)

Methode: Das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorene Pellet (Kap. 3.1.3) der stimulierten oder nicht-stimulierten MA-10-Zellen wurde für die RNA-Isolierung weiterverwendet. Die Isolierung von Gesamt-RNA aus MA-10-Zellen erfolgte mit einer "RNA-Clean"-Lösung:

Etwa  $10^8$  Zellen wurden mit 2 ml "RNA-Clean"-Lösung überschichtet und homogenisiert. Zu je 2 ml Homogenat wurden 0.2 ml Chloroform hinzugefügt und die Suspension für 15 sek kräftig gemischt. Nach Inkubation für 5 min auf Eis und Zentrifugation bei  $12.000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 min wurde die obere, RNA enthaltende wässrige Phase (von der unteren organischen Phase und der Interphase) abgenommen. Die RNA wurde durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol zu der abgenommenen oberen Phase über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $12.000 \times g$  wurde die RNA mit 80 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde in  $30 \mu\text{l}$  DEPC-Wasser resuspendiert. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt. Der Reinheitsquotient  $A_{260}/A_{280}$  lag gewöhnlich zwischen 1,8 und 2,0. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der gewonnenen RNA wurden gewöhnlich zwei deutliche Banden sichtbar: eine 1,9 kb- und eine 4,7 kb-Bande, die jeweils die 18S- und 28S-Bande der ribosomalen RNA enthalten. Deren Degradationsgrad gab ebenfalls Auskunft über die Reinheit und Qualität der isolierten RNA.

### 3.2.2. Reverse Transkription (RT) der isolierten RNA

#### Material:

- cDNA-Synthese-Kit (Gibco BRL)

Methode: Die Erststrang-cDNA-Synthese oder Reverse Transkription wurde mit einem cDNA-Synthese-Kit durchgeführt. Die RNA wurde in Gegenwart von Nukleotiden und dem Oligo-dT-Primer, der an den 3'-Poly(A)<sup>+</sup>-Schwanz der mRNA bindet, durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) in die entsprechende cDNA umgeschrieben.

Für die Umwandlung der RNA in cDNA wurden 2-5 µg isolierter RNA mit 500 µg Oligo-(dT)-Primer versetzt und mit sterilem bidest H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Dann wurden die Ansätze für 10 min bei 70 °C inkubiert und sofort auf Eis gesetzt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden folgende Reagenzien dazupipettiert und gemischt: 4 µl 5 facher Erststrangpuffer, 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP (Gemisch aus dATP, dGTP, dCTP, dTTP bei neutralem pH) und 1 µl (200 U) Superscript II Reverse Transkriptase. Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 42°C inkubiert. Die enzymatische Aktivität wurde durch Erhitzen auf 70°C für 15 min gestoppt. Danach wurde der Ansatz mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt.

### 3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### Material:

- Ficoll (Merck)
- 10 x Puffer (Gencraft)
- dNTP Mix (Pharmacia)
- 5 U/µl Taq-DNA-Polymerase (Gencraft)
- 100 bp Längenstandard (Roche Molecular Biochemicals)

Die verwendeten Primer setzten sich wie folgt zusammen:

- GAPDH-Primer (Eurogentech):

Sense-Primer: 5'- GTCTTCACCACCATGGAG -3'

Antisense-Primer: 5'- GTCATGGATGACCTTGGC -3'

- VEGF-Primer (Eurogentech):

Sense-Primer: 5'- GCACCCACGACAGAAGGAGAG -3'

Antisense-Primer: 5'- TGTGACAAGCCAAGGCGGTGA -3'

VEGF-Primer sind in Exon 2 und Exon 8 des VEGF-Gens lokalisiert. Genbank U43836 und U43837 [siehe Abb. 12, Kap. 4.2]

- StAR-Primer (Eurogentech):

Sense-Primer: 5'- CAACAACCAGGAAGGCTGGAAG -3'

Antisense-Primer: 5'- GTTGCCTGCTGCCGCCGCAG -3'

Methode: Mit den synthetisierten cDNA-Proben wurden PCRs unter Verwendung der VEGF- und StAR-Primer durchgeführt. GAPDH-Primer wurden in dem Kontrollansatz benutzt, um zu überprüfen, ob überall die gleiche Menge an cDNA verwendet wurde. In den PCR-Reaktionsgefäßen wurden folgende Substanzen zusammenpipettiert:

5 µl Ficoll

5 µl 10 x Puffer

1 µl 10 mM dNTP Mix

0.5 µl 100 pmol/µl 5' VEGF- oder StAR-Primer

0.5 µl 100 pmol/µl 3' VEGF- oder StAR-Primer

0.3 µl 100 pmol/µl 5' GAPDH-Primer

0.3 µl 100 pmol/µl 3' GAPDH-Primer

0.1 µl 5 U/µl Taq-DNA-Polymerase

Gesamtes Volumen : ad 50 µl

Die Reaktion wurde in der PCR-Maschine bei folgenden Temperaturen durchgeführt:

Denaturierung:	2 min bei 95°C	} 30 Zyklen
Primer Anlagerung	75 sek bei 66°C	
Verlängerung:	45 sek bei 72°C	

Die PCR-Produkte wurden in einem 1.5 %igen Agarosegel analysiert. Als Längenstandard wurde 1 µg der 100 bp-Leiter aufgetragen.

### 3.2.4 Gelelektrophorese von DNA

#### Material:

- 50 x TAE: 242 g Tris (Roth), 57.1 ml Eisessig (Merck) und 100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 wurden mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.
- 10 x Ladepuffer: 0.4 % Bromphenolblau (Merck), 0.4 % Xylenzyanol (Sigma)
- 25 % Ficoll Typ 400 (Merck)
- Ethidiumbromid (Merck)
- Agarose (Gibco BRL)
- 100 bp Längenstandard (Gibco BRL)

#### Methode:

Die physikalische Grundlage dieser Methode ist die Wanderung von geladenen Molekülen im elektrischen Feld. Aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatgruppen wandert die DNA durch das Gel in Richtung Anode. Abhängig von der Größe der DNA wandern die Moleküle unterschiedlich schnell und werden so im Gel aufgetrennt. Diese Technik wird häufig sowohl für die Identifizierung von DNA-Fragmenten (analytisch) als auch zur Aufreinigung und Isolierung der DNA (präparativ) eingesetzt. Die Nukleinsäure wird durch den in die DNA interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Es wurden je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente 0.7-2.0 %ige Agarosegele gegossen und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1 µg/ml) versetzt. Die Proben wurden mit Ladepuffer auf ein Gel geladen und in 1 x TAE Elektrophorese-Laufpuffer für 1-2 h bei 100 V aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden die Banden im Gel unter einem UV-Leuchttisch analysiert und das Gel fotografiert. Die Ermittlung der Fragmentgröße der Proben erfolgte durch Vergleich mit dem DNA-Längenstandard.

### 3.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

#### Material:

- Reinigungs-Kit (easy pure Kit, Biozym)

Methode: Für die Isolierung der DNA aus Agarosegelen wurde der Reinigungs-Kit easy pure Kit der Firma Biozym verwendet. Der Reinigungs-Kit basiert auf einer Silicamatrix, die sowohl einzel- als auch doppelsträngige über 40 bp große DNA-Moleküle bindet. Die Aufreinigung der gewünschten DNA erfolgte in drei Schritten: das Binden an die Matrix, Waschen zur Entfernung der ungebundenen DNA und das Eluieren der gebundenen DNA.

Die DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gewogen. Es wurde das dreifache Volumen Salzlösung zugegeben. Die Agarose wurde nun bei 55 °C für 5 min geschmolzen. Für die Bindung der DNA wurden 6.5-10 µl Bindungspuffer zugegeben, intensiv gemischt und bei RT für 5 min inkubiert. Anschließend wurde kurz zentrifugiert, das Pellet in 1 ml Waschlösung resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde noch einmal kurz zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet vollständig getrocknet. Zur Elution der DNA wurde das getrocknete Pellet in 10-20 µl TE-Puffer resuspendiert und für 5 Min bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min wurde der Überstand, der die DNA enthält, abgenommen und bei 4 °C gelagert.

### 3.2.6 Klonierung

#### 3.2.6.1 Fill-in-Reaktion

#### Material:

- 2 U/µl Klenow-Enzym (Roche Molecular Biochemicals)

Methode: Die aus der mRNA gewonnene cDNA wurde wie oben beschrieben (Kap. 3.2.2) mit spezifischen VEGF-Primern amplifiziert und das DNA-Fragment aus dem Agarosegel isoliert und gereinigt (Kap. 3.2.5). Mit dem Klenow-Enzym wurden die überhängenden Enden des gereinigten PCR-Produktes (VEGF) mit Nukleotiden

komplementär aufgefüllt. Das Klenow-Enzym hat keine 5'→3'-Exonukleaseaktivität und das entstehende Produkt besitzt glatte Enden. Diese Fill-in-Reaktion war notwendig, weil der Vektor, in den das DNA-Fragment kloniert werden sollte, mit Restriktionsenzymen geschnitten wurde, die glatte Enden erzeugen. Der Reaktionsansatz bestand aus 5 µl PCR-Fragment (VEGF) und 1 µl Klenow-Enzym (2 U/µl).

### 3.2.6.2 Linearisierung des Vektors

#### Material:

- Srf I (Roche Biochemicals)

Methode: Der für die Klonierung verwendete Vektor pCR-Script™SK(+) wurde mit der Restriktionsendonuklease Srf I nach Vorschrift des Herstellers geschnitten. Srf I erkennt die Nukleotidsequenz 5'-GCCCGGGC-3' und schneidet dort DNA-Fragmente mit glatten Enden.

### 3.2.6.3 Ligation

#### Material:

- "Kloning Kit" (Stratagene)

Methode: Die Ligation wurde mit dem "PCR-Script™ SK (+) Kloning Kit" durchgeführt. Unter Ligation versteht man die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe der DNA-Moleküle.

Hierzu wurden äquimolare Mengen der zu klonierenden DNA (VEGF-Fragment) mit Vektor-DNA („PCR-Script“) zusammengebracht und durch Zugabe von T4-DNA-Ligase miteinander verknüpft. Der Kontrollansatz enthielt nur den Vektor und nicht das zu klonierende Fragment. Nach der Transformation werden hier keine oder zumindest weniger Klone als in dem eigentlichen Ansatz erwartet.

Der Ligationsansatz enthielt:

5 µl 10 ng/µl PCR-Script VeKtor  
5 µl 10 ng/µl VEGF-Fragment  
5 µl 10 x PCR-Script-Puffer  
2.5 µl 10 mM dNTP  
5 µl 5 U/µl Srf I Restriktionsenzym  
5 µl T4 DNA Ligase  
Gesamtvolumen: ad 50 µl

Der Ligationsansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden kompetente Bakterien *E. coli* DH5α mit den Ligationsansätzen transformiert.

### 3.2.7 Herstellung der kompetenten Bakterien

#### Material:

- Tfb I Lösung: 500 ml einer Lösung aus 30 mM Kalium-Acetat (Merck), 50 mM MnCl<sub>2</sub> (Merck), 100 mM KCl (Merck), 10 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck), 150 g/l Glyzerin (Sigma) herstellen, den pH-Wert auf 5.8 einstellen und die Lösung steril filtrieren.
- Tfb II Lösung: 100 ml einer Lösung aus 10 mM Na-MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 150 g/l Glyzerin herstellen, den pH-Wert auf 7.0 einstellen und die Lösung steril filtrieren.
- Bakterienstamm: *E. coli* DH5α (Life Technologies)

Methode: Je 5 ml LB-Medium wurden mit je einer Bakterienkolonie, welche von einer Agarplatte stammt, angeimpft und für 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft und diese bei 37 °C im Schüttler so lange inkubiert, bis eine optische Dichte von 0.5-0.6 bei 550 nm erreicht wurde. Danach wurde die Kultur auf Eis gekühlt und für 5 min bei 2300 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde bei 4 °C in 40 ml (per 100 ml Startkultur) Tfb-I-Lösung resuspendiert und für 15-20 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 1850 rpm wurde das Pellet in 4 ml (per 100 ml Startkultur) Tfb-II-Lösung resuspendiert. 200 µl-Aliquots dieser Suspension wurden zuerst in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bei -80 °C gelagert. Die so vorbereiteten Bakterien wurden für die Transformation verwendet.

### 3.2.8 Transformation

#### Material:

- SOC-Medium: SOB-Medium bestand aus 2.0 % Bacto-Trypton, 0.5 % Hefe-Extrakt, 0.05 % NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Dazu 20 mM Glucose mischen und steril filtrieren.
- "Kloning Kit" (Stratagene)
- Tetrazyklin/Ampicillin (Sigma)

Methode: Die bei -80°C eingefrorenen kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, leicht gemischt, und je 40 µl Bakteriensuspension wurden in 15 ml Falcontubes überführt. Die kompetenten Bakterienzellen wurden mit 0,7 µl β-Mercaptoethanol gemischt (Endkonzentration 25 mM). Die Mischung wurde für 10 min auf Eis gestellt und zwischendurch leicht gemischt. 2 µl der zu transformierenden DNA wurden zu den Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz für 45 sek bei 42 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend 2 min auf Eis gestellt. Die Transformationsansätze wurden in insgesamt 450 µl auf 42 °C vorgewärmtem SOC-Medium gegeben und ca. 1 h bei 37 °C und 225-250 rpm geschüttelt. Von dieser Mischung wurden unterschiedliche Mengen (50, 100, 150 µl usw.) auf LB-Agarschalen (inklusive 25 µg/ml Tetrazyklin oder 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen.

Um zwischen rekombinanten und nicht rekombinanten Klonen unterscheiden zu können, wurde die α-Komplementation des aminoterminalen Fragmentes des β-Galaktosidase-Gens (lacZ-Gen), welches im Vektor enthalten ist, genutzt. In das lacZ-Gen ist die Klonierungsstelle inseriert. Der carboxyterminale Anteil des Enzyms wird im Genom der Bakterien exprimiert. Bei der Transformation einer Wirtszelle mit einem komplementationsfähigen Vektor ergänzen sich in der Zelle, nach Induktion durch IPTG, beide Proteintermini zu einem aktiven Enzym, das das Substratanalogon X-Gal zu einem blauen Farbstoff hydrolysiert. Eine Insertion fremder DNA in die Klonierungsstelle des Vektors und damit in das β-Galactosidase-Gen führt zum Verlust der Komplementationsfähigkeit, erkennbar an farblosen (rekombinanten) Plaques/Kolonien. Zur Durchführung wurden dem auszuplattierenden pBluescript-Transformationsansatz 40 µl 40 mg/ml X-Gal und 40 µl 100 mM IPTG zugesetzt und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.2.9 Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien

#### Material:

- LB-Medium: 10 g LB (Sigma) ad 500 ml H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren. Für die Agar-Platten werden 7.5 g Bactoagar (Difco laboratories, USA) dazugefügt.
- TELT-Lysis-Puffer für Minis: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 62.5 mM EDTA, 0.4 % Triton X-100, 2.5 M LiCl
- Lösung E1 (Maxi, zur Resuspendierung der Zellen) [Genomed]: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, RNase A (100 µg/ml)
- Lösung E2 (Maxi, Zellyse) [Genomed]: 0.2 M NaOH, 1% SDS
- Lösung E3 pH 5.5 (Maxi, Neutralisierung) [Genomed]: 3 M Kaliumacetat
- Lösung E4 pH 5.0 (zur Säulenäquilibrierung) [Genomed]: 600 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, 0.15 % Triton X-100, Essigsäure
- Lösung E5 pH 5.0 (zum Waschen der Säule) [Genomed]: 800 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, Essigsäure
- Lösung E6 pH 8.5 (zur DANN-Elution) [Genomed]: 1.25 M NaCl, 100 mM Tris-HCl
- TE-Puffer pH 7.5: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA

Methode: Für die Animpfung des Kulturmediums wurden farblose Kolonien von der Agarplatte gepickt, da diese das rekombinante pBluescript-Plasmid enthalten. Je nach gewünschter Menge der zu präparierenden DNA wurden entweder 3,5 ml (Mini-Präparation) oder 500 ml (Maxi-Präparation) Kulturmedium mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Dem Medium wurde Ampicillin (Endkonzentration von 100 µg/ml) zugesetzt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C unter starkem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 rpm pelletiert. Das Medium wurde abgegossen und das so gewonnene Pellet bei der Mini- und Maxipräparation unterschiedlich weiterbearbeitet.

### 3.2.10 Minipräparation von Plasmid-DNA (TELT-Präps)

#### Material:

- Phenol (Merck)
- Chloroform (Merck)
- Isoamylalkohol (Merck)
- Ethanol (Merck)

Methode: Es wurde nach dem Protokoll Telt-Minipräparation (Holmes und Quigley, 1981) gearbeitet.

Das Bakterien-Pellet wurde in 250 µl TELT-Lysis-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden 250 µl (10 mg/ml) frisch angesetzte Lysozym-Lösung dazugegeben. Danach wurde der Ansatz für 1 min im Wasserbad bei 70°C erhitzt und für 5 min auf Eis gestellt. Anschliessend wurde für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zuerst zweimal mit einem Volumen Phenol/Chloroform und danach einmal mit Chloroform (Chloroform+Isoamylalkohol; 24:1) extrahiert. Nach Inkubation (15 min, RT) wurde das Pellet mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25-50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Für die Restriktionsanalyse wurden 1-2 µl der Präparation eingesetzt. Die Ausbeute der Plasmid-Präparation lag bei 7 µg DNA.

### 3.2.11 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Methode: Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit dem Maxipräp Kit (Genomed) durchgeführt. Das Pellet wurde in 10 ml Lösung E1 resuspendiert und in Nalgene-Röhrchen überführt. Um die Zellen zu lysieren, wurden 10 ml Lösung E2 zu dem Ansatz pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach der Zellyse (5 min, RT) wurden 10 ml Lösung E3 zugegeben und anschließend 10 min bei 20 °C und 17.000 rpm zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde sofort in ein 50-ml-Röhrchen überführt und auf zwei Genomed-500-Säulen, die vorher mit je 30 ml Lösung E4 äquilibriert worden waren, verteilt. Die Säulen wurden jeweils mit 60 ml Lösung E5 gewaschen und die DNA in 15 ml Lösung E6 in Nalgene-Röhrchen eluiert. Die DNA-

Lösung wurde mit 10.5 ml Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 13.000 rpm wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und mit 70 %igem Ethanol in 1.5-ml-Reagenzgefäße überführt und für 10 min bei 4 °C und 14.000 rpm erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde 5-10 min luftgetrocknet und in 100-250 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute lag bei 200 µg Plasmid-DNA.

Die so isolierte Plasmid-DNA wurde nach dem Restriktionsverdau durch eine Agarosegelelektrophorese charakterisiert. Die auf diese Weise präparierte DNA eignete sich für eine anschließende Sequenzierungsreaktion.

### **3.2.12 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA**

#### Material:

- Sac I (Roche Molecular Biochemicals)
- EcoR I (Roche Molecular Biochemicals)
- 1 x Reaktionspuffer (Roche Molecular Biochemicals)

Methode: Mit Restriktionsendonukleasen lassen sich DNA-Moleküle an spezifischen Stellen, sogenannten Erkennungssequenzen, spalten. Die meisten Restriktionsenzyme vom Typ II erkennen Tetra-, Penta- oder Hexanukleotidsequenzen, von denen die Mehrzahl Pallindrome darstellen. Die hydrolytische Spaltung der beiden DNA-Stränge erfolgt innerhalb der Erkennungssequenz, dabei können entweder glatte Enden (blunt ends) oder bei versetzter Spaltung 3'- bzw. 5'-überstehende Enden (sticky ends) entstehen. Das 3'-Ende trägt dabei immer eine Hydroxylgruppe, das 5'-Ende eine Phosphatgruppe. Die durch Restriktion entstehenden Fragmente können isoliert und für die Herstellung von DNA-Sonden oder für Ligationen eingesetzt werden.

Je nach Menge des gewünschten Fragments, das isoliert werden sollte, wurden unterschiedliche Mengen des fragmenttragenden Plasmides eingesetzt, gewöhnlich 1 bis 2 µg. Pro µg DNA wurden 2-5 U des betreffenden Restriktionsenzymes in 1 x Reaktionspuffer (Endvolumen 30 µl) angesetzt. Es wurde zuerst mit dem Restriktionsenzym Sac I für 2 h bei 37 °C und danach mit EcoR I für 2 h bei 37 °C

geschnitten. Die Auftrennung der so erhaltenen Fragmente erfolgte über TAE/Agarosegele.

### 3.2.13 DNA-Sequenzierung

#### Material:

- "ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit" (Perkin Elmer)
- T3-Primer 5' AAA TTA ACC CTC ACT AAA GGG 3'
- T7-Primer 5' AAT ACG ACT CAC TAT AGG GC 3'

Methode: Für die Sequenzierung wurde der ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit verwendet.

Das Prinzip der Sequenzierung beruht darauf, dass ein Oligonukleotid (*Primer*) bekannter Sequenz an einen definierten Abschnitt des denaturierten DNA-Moleküls hybridisiert (*annealing*). Die DNA-Polymerase verlängert das Oligonukleotid nach Zugabe freier Nukleotide komplementär zu dem Matrizenstrang (*template*).

Der Reaktionsansatz bestand aus:

8 µl Terminator-Premix (A-Dye Terminator, C-Dye Terminator, G-Dye Terminator, T-Dye Terminator, Tris-HCl pH 9.0, MgCl<sub>2</sub>, hitzeresistente Pyrophosphatase und Taq DNA Polymerase)

500 ng Template DNA

10 pmol/µl T3 und T7 Primer

Endvolumen 20 µl

Der Ansatz wurde in einer PCR-Maschine bei folgenden Temperaturen amplifiziert:

Denaturierung:	3 min bei 95 °C	} 36 Zyklen
Primer-Anlagerung:	1 min bei 65 °C	
Verlängerung:	1 min bei 72 °C	

Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz in 1.5-ml-Mikrozentrifugengefäße überführt und 2 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,6 dazugegeben. Danach

wurden 50 µl 95 %iger Ethanol zu dem Ansatz gegeben, gut gemischt und für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde bei 4 °C und 14.000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Entfernung des Ethanols wurde das Pellet getrocknet. Für die automatische Sequenzierung wurden die Proben an das Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (UKE) geliefert.

### 3.2.14 Transfektion und Luciferaseassay

#### 3.2.14.1 Transiente Transfektion von Zellen

##### Material:

Verwendete Plasmide

- pCMV-lacZ: Das Plasmid enthält die Sequenz des *E. coli lacZ*-Genes, welches konstitutiv durch einen CMV-Promotor transkribiert wird (Promega).
- Das promotorlose Luciferase-Reporterplasmid pGL2-basic (Promega)
- Die Luciferase-Reporterkonstrukte des VEGF-Promotors aus Maus bestanden aus:
  - 5'-deletiertem Fragment von 1.6 kb (-1217/Start pLuc)
  - 5'-deletiertem Fragment von -772 bis +400 (pLuc Apa/Start)
  - 5'-deletierten Fragment von -449 bis +400 (pLuc Mlu/Start)
- „LipofectAmine™ Reagent“ (GibcoBRL)

##### Methode:

Der benutzte Vektor pGL2-basic besitzt keine eukaryontischen Promotor- oder Enhancerelemente und eignet sich daher besonders gut für die Untersuchungen von putativen regulatorischen Elementen. Diese können in die MCS vor der kodierenden Sequenz für die Luciferase kloniert und ihre Aktivität mit einem kommerziell verfügbaren Luciferaseassay-Kit untersucht werden.

Es wurden die oben dargestellten 3 Luciferase-Reporterkonstrukte des VEGF-Promotors der Maus konstruiert und ihre Aktivität nach Stimulierung der Zellen mit unterschiedlichen Substanzen untersucht.

Plasmide, die für die Transfektion der Zellen mit anschließendem Reporterassay verwendet wurden (Reporterkonstrukte), enthielten demnach einen der oben beschriebenen Promotor-Abschnitte vor der für das Enzym Luciferase kodierenden Sequenz. Wird der Promotor aktiviert, startet die Transkription und Translation des Luciferasegens.

Nach Einbringen dieser Plasmide in eukaryontische Zellen (Transfektion) werden die Promotorsequenzen auf diesen Plasmiden vorübergehend (transient) ein Teil der Gesamt-DNA der Zelle. Das bedeutet, dass die Zelle durch eigene Proteine (z.B. Transkriptionsfaktoren) die Aktivität des Promotors beeinflussen kann. Sie liefert prinzipiell die Faktoren, die für eine basale Transkription des zu untersuchenden Promotors nötig sind. Durch die Zugabe bestimmter Substanzen wie z.B. Hormone kann die Expression des Gens verändert werden, dadurch lässt sich die Promotoraktivität untersuchen.

Für die Testtransfektion mittels Lipofektion wurde das kationische liposomale Transfektionsreagenz „LipofectAmine™ Reagent“ verwendet. Es wurden  $4.5 \times 10^5$  Zellen pro 6 er Well ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 8 µg Plasmid-DNA transfiziert. Die Transfektion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Zum Vergleich wurden die Zellen außer mit den entsprechenden Plasmiden zusätzlich mit jeweils 1.5 µg pCMV-lacZ pro Well kotransfiziert. In diesen Fällen wurde parallel zu dem Luciferaseassay (Kap. 3.2.14.2) ein β-Galaktosidaseassay (Kap. 3.2.14.3) durchgeführt.

### **3.2.14.2 Luciferaseassay**

#### Material:

- Lysisreagenz (Roche)
- Luciferase-Substrat-Reagenz (Roche)
- Kunststoffröhrchen (Sarstedt)
- Luminometer (LB 9501, Berthold)

Methode: Für die Durchführung des Luciferaseassays wurden die Zellen nach der Transfektion und Stimulation zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100

µl Lysisreagenz versetzt. Die Platten wurden für 15 min inkubiert und das Lysat anschliessend in Reaktionsgefässe überführt. Die Proben wurden für ca. 10 sek bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Messung auf Eis aufbewahrt.

Zur Messung der Proben wurden 50 µl Zellextrakt mit 100 µl Luciferase-Substrat-Reagenz in einem Kunststoffröhrchen durch Schwenken gemischt, anschließend wurde die Lumineszenz der Probe in einem Luminometer gemessen. Die Messzeit betrug im allgemeinen 5 sek.

### **3.2.14.3 β-Galaktosidaseassay**

#### Material:

- Galacto-Light™ & Galacto-Light Plus™ (Tropix)

Methode: Die bei der Transfektion mit dem Vektor pCMV-lacZ in den Zellen konstitutiv exprimierte β-Galaktosidase gilt sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Proben als eine gute Kontrolle zum Überprüfen der Transfektionseffizienz. Die Messung der β-Galaktosidaseaktivität war auch dann erforderlich, wenn die zu vergleichenden Proben aus Ansätzen stammten, die mit unterschiedlichen Promotorkonstrukten transfiziert wurden. So konnten mit Hilfe des β-Galaktosidaseassays die Ergebnisse des Luciferaseassays auf eine Bezugsgröße normalisiert werden.

Aus dem Zellextrakt der transfizierten Zellen konnte dann nicht nur die Luciferaseaktivität, sondern auch die β-Galaktosidaseaktivität der Proben bestimmt werden. Dazu wurde wieder ein System verwendet, das auf dem Prinzip der Chemolumineszenz-Detektion basiert. In dem Assay wurde zunächst durch die Aktivität der β-Galaktosidase das Substrat „Galacton plus“ bei neutralem pH-Wert deglykosyliert und angereichert. Durch Anhebung des pH-Wertes wurde eine Lichtreaktion induziert, die im Luminometer gemessen werden konnte. Die Stärke der Lichtreaktion (Messzeit: 5 sek) der einzelnen Proben korreliert mit dem Anteil an β-Galaktosidase in den Proben und folglich mit der Transfektionseffizienz.

### 3.2.15 Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen und Durchführung von Northern Blots

#### Material:

- 20 x MOPS-Puffer: 92.52 g MOPS (ICN), 50 ml 1 M Na-Acetat, 20 ml 0.5 M EDTA pH 7.0 wurden mit H<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt.
- 10 x RNA-Ladepuffer: 50 % Glycerin, 1 mM EDTA, 0.4 % Bromphenolblau, 0.4 % Xylencyanol
- 20 x SSC: 3.0 M NaCl (Merck), 0.3 M Na-Citrat (Merck)
- Formaldehyd (Merck)
- Formamid (Merck)
- RNA-Leiter (Gibco BRL)
- Nylonmembran (Nytran N, Schleicher & Schuell)

Methode: Die Auftrennung der RNA-Moleküle erfolgte in 1.3 %igen Agarose/Formaldehydgelen: 1.95 g Agarose wurden in 115.5 ml H<sub>2</sub>O geschmolzen, auf 70°C abgekühlt, 7.5 ml MOPS-Puffer (20 x), 27 ml 37 %iges Formaldehyd und 8 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurden zugegeben und das Gel gegossen.

Die RNA-Proben (je 20 µg) wurden mit 2 µl 20 x MOPS-Puffer, 7 µl 37%igem Formaldehyd und 20 µl deionisiertem Formamid versetzt und mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht, anschließend für 20 min bei 65 °C denaturiert, mit 4 µl 10 x Ladepuffer versetzt und auf das Gel geladen. Als Längenmarker wurden gleichbehandelte Proben eines 0.24-9.5 kb RNA-Längenstandard (je 8 µg) eingesetzt.

Die Elektrophorese erfolgte in 1 x MOPS bei 20 V über Nacht. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert, um die Position und Intensität der 18S- und 28S-rRNA-Banden und die des Längenstandards zu dokumentieren.

Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran erfolgte mittels Kapillar-Blot in 24 bis 28 h in 10 x SSC. Anschliessend wurde die Membran luftgetrocknet und die RNA durch UV-Bestrahlung (3 min auf dem Transilluminator, die RNA-Seite der UV-Quelle zugewandt) an die Membran fixiert (UV-Crosslinking).

### 3.2.16 Radioaktive Markierung spezifischer DNA Sonden: Random-Oligo(N)<sub>6</sub>-Priming (Feinberg & Vogelstein, 1983)

#### Material:

- Sonden:

VEGF-Sonde: 494 bp, zwischen bp 165 und bp 659 im VEGF-Gen lokalisiert

StAR-Sonde: 262 bp, zwischen bp 339 und bp 601 im StAR-Gen lokalisiert

3 $\beta$ -HSD-Sonde: 535 bp, zwischen bp 1 und bp 535 im 3 $\beta$ -HSD-Gen lokalisiert

GAPDH-Sonde: 198 bp, zwischen bp 341 und bp 539 im GAPDH-Gen lokalisiert

- Nap-Puffer pH 6.8: 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- Markierungspuffer: 5 M Tris-HCl, pH 6.9, 0.1 M MgSO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, 1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dTTP

- *Random primer* (Pharmacia)

- BSA (Sigma)

- 2 U/ $\mu$ l Klenow (Roche Molecular Biochemicals)

-  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham Redivue)

- Sephadex-Säule (NAP<sup>TM</sup> 5 Columns Sephadex<sup>TM</sup> G-25, Pharmacia)

- Beta-Szintillationszähler (Czerenkow-Zählung, „LS 1701“, Beckmann)

Methode: Als Sonden bezeichnet man spezifische, einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle, die eingesetzt werden, um eine bestimmte Population von DNA- oder RNA-Molekülen, die zu der eingesetzten Sonde komplementär sind, nachzuweisen. Diese Sonden werden radioaktiv oder nichtradioaktiv markiert und z.B. in Northern- und Southern-Blot-Hybridisierungen oder in *in-situ*-Hybridisierungen eingesetzt. Das heterogene Gemisch der Oligonukleotide (*random primer*) dient der DNA-Polymerase als Primer zur Initiation der komplementären Strangsynthese an doppel-/einzelsträngigen DNA- oder RNA-Matrizen. Diese Primer hybridisieren statistisch an viele Positionen der Matrize. Durch die Verwendung eines markierten dNTPs (radioaktiv oder nichtradioaktiv) können gleichmäßig markierte Sonden hergestellt werden, wobei die radioaktiv markierten Sonden eine hohe spezifische Aktivität aufweisen (Feinberg und Vogelstein 1983, 1984).

Die zu markierende aufgereinigte DNA wurde zuerst mit einem Überschuß an *random primer*-Molekülen versetzt: Für die Sondenpolymerisation wurden 50 ng doppelsträngige Matrizen-DNA und 100 ng/ $\mu$ l *random primer* zusammengemischt. Diese Mischung wurde zur Denaturierung von Template und Primern für 10 min bei 95 °C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 5  $\mu$ l Oligo-Markierungspuffer, 1  $\mu$ l BSA (10  $\mu$ g/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l Klenow (2 U/ $\mu$ l) und 6  $\mu$ l  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP wurde der Ansatz mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l gebracht. Anschließend wurde für 45 min bei 42 °C inkubiert. Der Reaktionsabbruch erfolgte durch Zugabe von 1  $\mu$ l 0.5 M EDTA.

Da das Klenowfragment der DNA-Polymerase I keine 5'→3'-Exonukleaseaktivität besitzt, wird das radioaktive Produkt exklusiv durch "*primer extension*", nicht durch "*nick translation*" gebildet und wird auch nicht wieder abgebaut.

Die Aufreinigung der markierten Sonde erfolgte über eine Sephadex-Säule. Nach der Äquilibration der Säule mit 3 x 2,5 ml 10 mM NaP-Puffer wurden die radioaktiven Proben (in 500  $\mu$ l NaP-Puffer) aufgetragen und mit 1 ml NaP-Puffer eluiert. 5  $\mu$ l des Eluats wurden im Beta-Szintillationszähler gemessen. Je nach spezifischer Aktivität wurden unterschiedliche Mengen der markierten Sonde für die Hybridisierungsreaktionen eingesetzt.

### 3.2.17 Hybridisierung von Northern Blots

#### Material:

- Waschlösungen: Waschlösung I: 500 ml Lösung aus 2 x SSC und 0.1 % SDS
- Waschlösung II: 500 ml Lösung aus 0.1 x SSC und 0.5 % SDS
- Hybridisierungslösung (Ultrahyb, Ambion)
- X-OMAT AR oder BIOMAX-MS Röntgenfilm (Kodak)

Methode: Alle hier verwendeten Sonden wurden mit der unter Kap. 3.2.16 beschriebenen Methode radioaktiv markiert. Die Blotmembran wurde in ca. 4-5 ml Hybridisierungslösung für 1-2 h bei 42 °C prähybridisiert. Nach einem zehnmütigen Denaturierungsschritt bei 95 °C wurde die radioaktiv markierte Sonde zu der Hybridisierungslösung gegeben. Es wurden 1-2 x 10<sup>6</sup> cpm/ml Lösung eingesetzt. Die

Hybridisierung erfolgte ü.N. bei 42<sup>0</sup>C. Am nächsten Tag wurde der Blot zweimal gewaschen, zuerst mit Waschlösung I bei 65 °C für 10 min und dann mit Waschlösung II bei gleicher Temperatur für 30 min. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Die Membran wurde feucht in Folie eingeschweißt und unter BIOMAX-MR Röntgenfilm und Verstärkerfolie bei -80<sup>0</sup>C für unterschiedliche Zeiten exponiert.

### **3.3 Proteinchemische Methoden**

#### **3.3.1 Kernproteinextraktion aus Zellen**

##### Material:

- Puffer A (hypotonischer Homogenisierungspuffer): 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, steril filtrieren. Kurz vor Gebrauch 1 mM DTT und 0.5 mM PMSF zusetzen.
- Puffer B (RNA Extraktionspuffer): 7 M Harnstoff, 1% SDS, 0.35 M NaCl, 20 mM EDTA, 10 mM Tris pH 7.5
- Puffer C (Nuklear Extrakt Puffer): 20 mM HEPES pH 7.9, 25 ml 100 %iges Glycerol, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, steril filtrieren. Kurz vor Gebrauch 1 mM DTT und 0.5 mM PMSF zusetzen.
- NP-40 (Sigma)

Methode: Die Kernproteine wurden aus den MA-10-Zellen isoliert und in EMSA-Versuche (siehe unten) eingesetzt, um ihre Bindung an DNA zu untersuchen. Dafür wurden 1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Danach wurde für 15 sek zentrifugiert und das Zellpellet in 300 µl Puffer A resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 20 µl 10 % NP-40 zu der Zellsuspension gegeben, kräftig gemischt und für 60 sek zentrifugiert. Der Überstand wurde für die RNA-Isolierung bei -80<sup>0</sup>C eingefroren. Das Pellet, welches die Kernproteine enthielt, wurde in 100 µl eiskaltem Puffer C resuspendiert. Die Suspension wurde bei 4<sup>0</sup>C für 20 min geschüttelt. Danach wurde bei 4<sup>0</sup>C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in kleinen Mengen aliquotiert und in Flüssigstickstoff bei -80<sup>0</sup>C eingefroren. Von dem eingefrorenen Kernextrakt wurde

eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Jeweils 8 µg Protein wurde für eine Bandshift-Reaktion im Polyacrylamidgel aufgetrennt.

### 3.3.2 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass freie DNA schneller durch ein elektrophoretisches Feld wandert als solche, an die Proteine gebunden sind. Um die Bindung von Kernproteinen an spezifischen Promotor-Elementen zu untersuchen, verwendet man radioaktiv markierte doppelsträngige Oligonukleotide, welche die zu untersuchenden Sequenzen enthalten, und inkubiert diese mit Kernprotein-Extrakten. Durch Zugabe spezifischer Antikörper oder Kompetitor-DNA (nicht radioaktiv markierte Oligonukleotide) kann die Identität des gebundenen Proteins ermittelt werden. Nach der Inkubation können die Proben in einer nicht-denaturierenden PAGE aufgetrennt und anschließend nach dem Trocknen der Gele durch Autoradiographie analysiert werden.

#### 3.3.2.1 Herstellung der doppelsträngigen Oligonukleotide

##### Material:

EMSA-Oligonukleotide (Eurogentec):

- 5'-TGGGGGTGGAGCTAGATTTCTCTTTTTCT-3' (bp -52 bis -23)
- 5'-AGACCGTCCCCGGGGCGGGTCTGGGCGGGGCTTGGG-3' (bp -84 bis -48)
- 5'-CGAAAGGCGGTGCCTGGCTCCACCAGACC-3' (bp -108 bis -80)
- 5'-ACTCCCCCCCCCGTAACCCCTCCCCACA-3' (bp -723 bis -693)
- 5'-GGATCCAGCGGGGGCGAGCGGGGGCGA-3' (Egr Konsensus-Sequenz)
- 5'-GATCGAACTGACCGCCCGCGGCCCGT-3' (AP-2 Konsensus-Sequenz)

Methode: Es wurden jeweils sense- und antisense-Oligonukleotide mit komplementären Sequenzen hergestellt. Die Anlagerung der Einzelstränge erfolgte in 50 mM NaCl. Jeweils 20 pmol sense- bzw. antisense-Oligonukleotid wurden in einem Volumen von 50 µl für 15 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert und danach bei 37 °C im Wasserbad langsam abgekühlt. Die Anlagerung der komplementären Stränge erfolgte unterhalb der spezifischen Schmelztemperatur des Doppelstranges.

### 3.3.2.2 Markierung der Sonden mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP durch T4-Polynukleotidkinase

#### Material:

- 150 mM STE-Puffer pH 8: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 7 mM NaCl
- 10 x PNK-Puffer (Biolabs)
- 20 U T4 PNK (Biolabs)
- ATP (Amersham Redivue)
- Säule (ProbeQuant<sup>TM</sup> G-50 Micro columns, Amersham Pharmacia)

Methode: Die zu verwendenden Sonden wurden am 5'-Ende durch Phosphorylierung mit T4-Polynukleotidkinase unter Verwendung von  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (3000 Ci/mmol) radioaktiv markiert. Nach der Markierung wurden die Proben gereinigt und die Radioaktivität nach Cerenkov gemessen. Die Radioaktivmarkierung der Sonde wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt:

In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden folgende Substanzen zusammenpipettiert:

- 5  $\mu\text{l}$  DNA (1 pmol/ $\mu\text{l}$ )
- 2  $\mu\text{l}$  10 x PNK Puffer
- 3  $\mu\text{l}$  [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP (3000 Ci/mmol)
- 2  $\mu\text{l}$  20 U/ $\mu\text{l}$  T4 PNK
- 8  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde bei 37 °C für 45 min inkubiert und das Enzym durch Inkubation bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Danach wurde der Ansatz in 30  $\mu\text{l}$  STE-Puffer auf die zuvor nach Herstellerangaben vorbereiteten Säulen (ProbeQuant<sup>TM</sup> G-50 Micro columns) gegeben und für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Für die Messung der Radioaktivität wurden 2  $\mu\text{l}$  des Säulen-Eluats mit 98  $\mu\text{l}$  STE-Puffer gemischt und jeweils 50  $\mu\text{l}$  Aliquots für die Messung verwendet.

### 3.3.2.3 Bindungsreaktion

#### Material:

- 3 x Bindungspuffer: 25 % Ficoll, 1 M HEPES pH 7.9, 3 M KCl, 0.5 M EDTA, 1 M DTT, 10 mg/ml BSA, auf ein Gesamtvolumen von 1.5 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen
- Poly dl-dC (Amersham Pharmacia Biotech)
- Antikörper:
  - Sp1: monoklonaler Antikörper gegen ein Epitop am C-terminus des humanen Sp1-Proteins aus der Maus (Santa Cruz). Dieser Antikörper zeigt keine Kreuzreaktion mit anderen Mitgliedern der Sp1-Familie.
  - Sp3: polyklonaler Antikörper gegen ein Epitop am C-terminus des humanen Sp3-Proteins aus dem Kaninchen oder der Ziege (Santa Cruz). Dieser Antikörper zeigt keine Kreuzreaktion mit anderen Mitgliedern der Sp3-Familie.
  - Egr-2: polyklonaler Antikörper gegen ein Epitop am C-terminus des Maus-Egr-2 aus dem Kaninchen (Santa Cruz). Dieser Antikörper zeigt keine Kreuzreaktion mit anderen Mitgliedern der Egr-Familie.
  - Ap-2: polyklonaler Antikörper gegen ein Epitop am C-terminus des humanen Ap-2 $\alpha$ -Proteins aus dem Kaninchen (Santa Cruz). Dieser Antikörper zeigt keine Kreuzreaktion mit anderen Mitgliedern der AP-2-Familie.

Methode: Die unter 3.3.1 isolierten Kernproteine wurden mit den hergestellten radioaktiven Sonden zusammengebracht, um auf diese Weise Proteine zu charakterisieren, die an der DNA binden.

Für diese Bindungsreaktion wurden 5  $\mu$ l 3 x Bindungspuffer, 0.4  $\mu$ g Poly dl-dC als unspezifischer DNA-Kompetitor und 1  $\mu$ l 0.3  $\mu$ g/ $\mu$ l Lachssperm-DNA (wurde zuvor für 5 min bei 100 °C denaturiert und danach direkt auf Eis abgekühlt) zusammenpipettiert. Es wurden unmarkierte, doppelsträngige Oligonukleotide als spezifische DNA-Kompetitoren in 250-fachem molarem Überschuß und 4-8 fmol 8000 cpm 5'-markiertes Oligonukleotid als Sonde eingesetzt. Danach wurden 8  $\mu$ g Nuklearextrakt dazupipettiert. Der Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 15  $\mu$ l aufgefüllt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde das gesamte Volumen eines Ansatzes auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt.

Für die *Supershift*-Experimente wurden 4 µl der spezifischen Antikörper eingesetzt. Zuerst wurde der Bindungsansatz mit der Sonde 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe des spezifischen Antikörpers wurde er noch einmal für 15 min bei RT inkubiert und die Proben anschließend auf Polyacrylamidgele aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

Das Gel wurde auf Whatman 3 MM-Papier fixiert und 1h getrocknet. Die Expositionszeit richtete sich nach der spezifischen Aktivität der markierten DNA. Für die Exposition wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und meistens über Nacht bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  exponiert.

#### **3.3.2.4 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)**

##### Material:

- 10 x TBE pH 8: 108 g Tris, 55 g Borat (Merck), 40 ml 0.5 M EDTA, auf 1 L mit H<sub>2</sub>O auffüllen und autoklavieren
- Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg. (Merck)
- APS (Sigma)
- TEMED (Sigma)
- Röntgenfilm (Fuji)

Methode: Zwei Glasplatten (20 x 20 cm) wurden mit 1.2-mm-Abstandshaltern zusammengeklammert. 50 ml 6 %ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg. wurden mit 1.25 ml 10 x TBE versetzt (f.c. 0.25 x TBE), 50 µl TEMED und 300 µl 10 % APS dazugemischt. Danach wurde das Gel gegossen. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von TEMED und APS gestartet. Nach der Polymerisation wurde ein Vorlauf von 2 h mit 5 µl DNA-Ladepuffer durchgeführt, um die Qualität des Gels zu überprüfen, danach wurden die vorbereiteten Proben (gesamtes Volumen 15 µl) aufgetragen und das Gel für 2-2,5 h bei 150-200 V laufen gelassen. Als Laufpuffer diente 0,25 x TBE.

### 3.3.3 ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)

Das aus den MA-10-Zellen ins Kulturmedium sezernierte Progesteron und VEGF-Protein wurden durch ELISAs quantifiziert. Sowohl für Progesteron als auch für VEGF wurden die Zellen in einer Dichte von ca  $1.5 \times 10^5$  Zellen pro Well (je 1 ml) auf einer 12-Well-Platte ausplattiert und für 24 h kultiviert. Danach wurden die Zellen in Serum-freiem Medium mit verschiedenen Substanzen für 20 h stimuliert. Nach der Stimulation wurde der Überstand abgenommen und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 3.3.3.1 Progesteron-ELISA

##### Material:

- E-NAP-Puffer pH 4.0: 0.20 M Natriumacetat, 0.90 % NaCl, 0.20 % BSA, 0.01 % Thimerosal; Lagerung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Progesteron-Antiserum: 11  $\mu\text{l}$  Progesteron-Antiserum mit 8.8 ml E-NAP-Puffer mischen. Lagerung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Progesteron- $11\alpha$ -Biotin (Tracer): 10  $\mu\text{l}$  Progesteron-Tracer mit 10.0 ml E-NAP-Puffer mischen. Lagerung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- HRP-Streptavidin-Lösung: 20  $\mu\text{l}$  167  $\mu\text{g/ml}$  Stammlösung zu 22 ml kaltem E-PBS-Puffer mischen. Lagerung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- E-PBS-Puffer: 0.10 M Natriumphosphat, 0.15 M NaCl, 0.005 M EDTA, 0.20 % BSA, 0.01% Thimerosal, pH 4.0; Lagerung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- HRP-Substratlösung: 500  $\mu\text{l}$  Substratpuffer, 500  $\mu\text{l}$  0.2%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 500  $\mu\text{l}$  0.5% TMB auf 25 ml  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen. Lagerung RT ; im Dunklen lagern.
- Substratpuffer: 4.80 M Na-Acetat, 0.24 M Citronensäure, 0.2 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Lagerung RT; im Dunklen lagern.
- Waschpuffer: 0.02 Gew.-% Tween 20 in  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 % NaCl. Lagerung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Methode: Es handelt sich um einen kompetitiven Doppelantikörper-Enzymimmunoassay mit Solid-Phase-Technik. Die immunologische Reaktion findet an den mit Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der ELISA-Microplatten statt. Der Testablauf läßt sich in drei Schritte unterteilen:

Der erste Reaktionsschritt ist die Assay-Inkubation. Bei diesem Schritt konkurrieren das Progesteron aus den Kultur-Überständen und ein Progesteron-Biotin-Derivat (Tracer) um die Bindung an den zugesetzten Kaninchen-Anti-Progesteron-Antikörper. Die entstehenden Progesteron- und Progesteron-Biotin-Antikörper-Komplexe werden gleichzeitig vom Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper an die Vertiefungen der Platten gebunden. Für die Assay-Inkubation wurden Kulturüberstände in unterschiedlichen Verdünnungen mit 50 µl Progesteron-Biotin-Derivat und 100 µl Progesteron-Antikörper direkt in die Vertiefungen der Platten pipettiert und 20 h bei 4 °C inkubiert.

Im zweiten Reaktionsschritt wird an Streptavidin gekoppelte Horseradish-Peroxidase (HRP) zugegeben, die dann selektiv nur von dem biotinhaltigen Immunkomplex (über Streptavidin) gebunden wird. Dafür wurden 0,2 ml HRP-Streptavidin pro Vertiefung zugegeben. Die Platten wurden abgedeckt und für 30 min bei 4-6 °C inkubiert.

Der dritte Reaktionsschritt ist die HRP-Substrat-Inkubation. Die über den Immunkomplex an die Platten gebundene HRP setzt das farblose Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Farbstoff um, der nach H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Zugabe eine gelbe Farbe annimmt. Die Farbentwicklung des Chromogens ist abhängig von der an die Platten gebundenen Enzymmenge und damit umgekehrt proportional zur gesuchten Progesteron-Konzentration.

Vor der Substratzugabe wurden die Platten viermal mit Puffer gewaschen und danach für 3-5 min bei RT abgedeckt. 250 µl HRP-Substratlösung wurden pro Vertiefung zupipettiert, der Ansatz für 40 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 50 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dazupipettiert und die Farbreaktion im Photometer bei 450 nm gemessen.

### **3.3.3.2 VEGF-ELISA**

Dieser Versuch wurde mit dem von der Firma *R & D System* erarbeiteten Protokoll durchgeführt. Die Reagenzien stammten ebenfalls von der gleichen Firma.

#### Prinzip des Assays:

Es handelt sich um eine quantitative Sandwich-Elisa-Technik. Mikroelisa-Platten werden mit gereinigten polyklonalen Antikörpern gegen Maus-VEGF beschichtet. Dann werden die Kulturüberstände zusammen mit Standard und Kontrolle aufgetragen. Das in den Proben vorhandene VEGF bindet an den Antikörper. Nach dem Waschen wird der zweite enzymgekoppelte Antikörper zugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift wird das Substrat aufgetragen, welches von dem Enzym zu einem blauen Produkt umgesetzt wird. Die Zugabe der Stoplösung verwandelt die blaue Farbe in eine gelbe. Die Intensität der Farbreaktion wird am Photometer gemessen und ist proportional zu dem in den Proben vorhandenen VEGF. Durch Vergleich mit dem Standard kann so die Menge an VEGF in den Proben ermittelt werden. Von dem gelieferten Standard wurde eine Konzentrationsreihe von 500 pg/ml bis 7.8 pg/ml hergestellt. Pro Well wurden 50 µl Assay Diluent pipettiert, dazu jeweils 50 µl Standard, Kontrolle oder Probe gemischt. Die Platte wurde vorsichtig für 1 min geschüttelt. Danach wurde die Platte abgedeckt und für 2 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte mehrmals (mindest. 5 mal) mit Waschpuffer gewaschen. 100 µl Antikörper-Konjugat wurden pro Well zugegeben und noch einmal für 2 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde 5 mal gewaschen und anschliessend wurden 100 µl Substratlösung pro Well pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Farbreaktion mit 100 µl Stoplösung beendet. Anschliessend wurde der Ansatz im Photometer bei 450 nm gemessen. Nach dem Auftragen der Konzentrationswerte des Standards gegen dessen Meßwerte wurde eine Eichgerade erstellt. Durch Einsetzen der jeweiligen Proben-Meßwerte ließ sich die Proben-Konzentration ermitteln.

### 3.4 Hilfsprogramme

- „NIH ImageQuant“ version 1.62, Molecular Dynamics
- <http://genomic.sanger.ac.uk>

## **4. Ergebnisse**

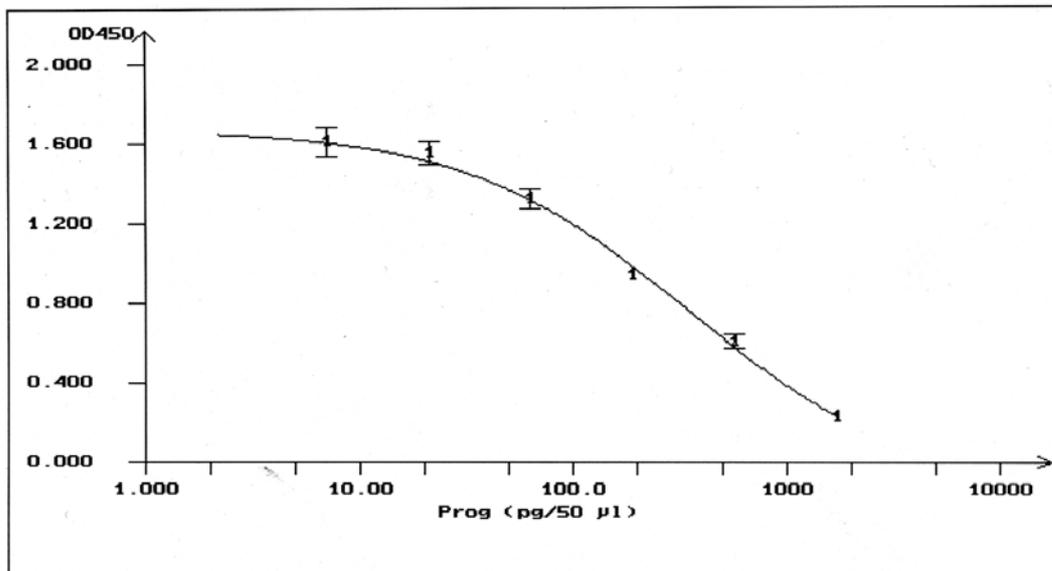
### **4.1 Biosynthese von Progesteron in MA-10-Zellen**

In Maus-Tumor-Leydig-Zellen wird nach der Bildung von Progesteron die Steroidbiosynthese von Testosteron weitgehend unterbunden, was auf einen Defekt der  $17\alpha$ -Hydroxylase in den Tumorzellen zurückzuführen ist (Lacroix et al., 1979). Daher wird als Parameter der Steroidbiosyntheseleistung Progesteron gemessen. Für die Messung wird von den kultivierten Zellen das Medium gesammelt und darin das von den Zellen sezernierte Progesteron mittels ELISA bestimmt.

#### **4.1.1 Messungen von in das Kulturmedium sezerniertem Progesteron nach der Stimulation der MA-10 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von hCG und 8-Br-cAMP**

Wie in Kap. 3.1.2 beschrieben wurde, wurden MA-10-Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt und die Zellzahl unter dem Lichtmikroskop bestimmt. In einer 12-Well-Platte wurden  $1.5 \times 10^5$  Zellen pro Well in Kulturmedium ausgesät. Nach einer 24 stündigen Kultivierung der Zellen wurde die Stimulation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von hCG und 8-Br-cAMP für 20 h durchgeführt. Die Behandlung der Zellen mit verschiedenen Hormonen wurde mit serumfreiem Kulturmedium durchgeführt.

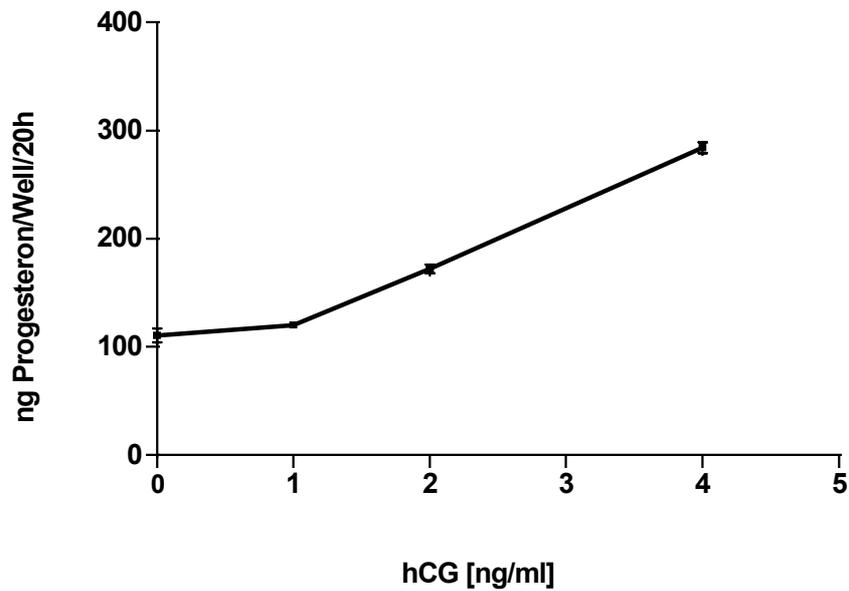
Anschließend wurde das aus den Zellen ins Kulturmedium sezernierte Progesteron quantifiziert. Eine repräsentative Standardkurve des ELISAs ist in Abb. 9 dargestellt. Die Auswertung der Quantifizierungen zeigte, dass hCG und 8-Br-cAMP die Progesteronproduktion dosisabhängig stark induzieren (Abb. 10).



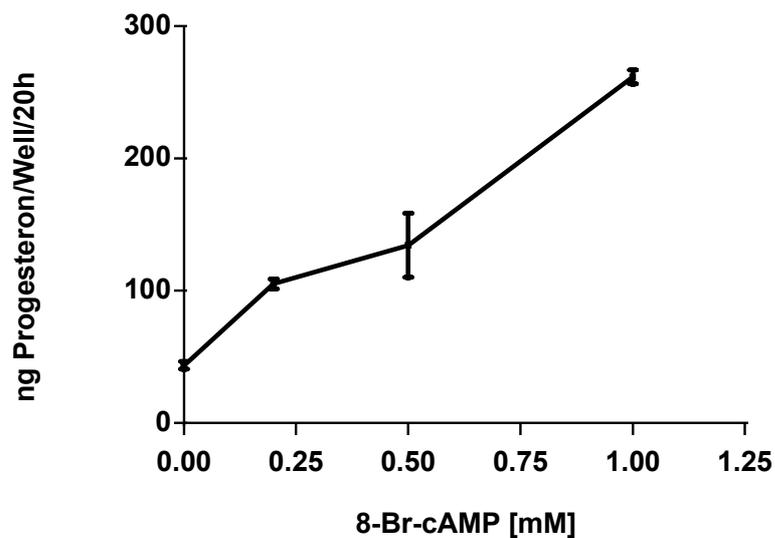
**Abb. 9** Graphische Darstellung einer repräsentativen Progesteron-Standardkurve für den Progesteron-ELISA .

Auf der obigen Standardkurve ist die optische Dichte für jeden Standard auf der Y-Achse gegen die Konzentration von Progesteron auf der X-Achse geplottet. Es wurde in einem ELISA-Reader (SLT) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Der Verlauf der Kurve reflektiert die gemessene Farbentwicklung der Enzymreaktion, die umgekehrt proportional zur Menge des Progesterons ist. Die Werte der Proben können dann mit Hilfe der Standardkurve abgelesen werden.

A



B

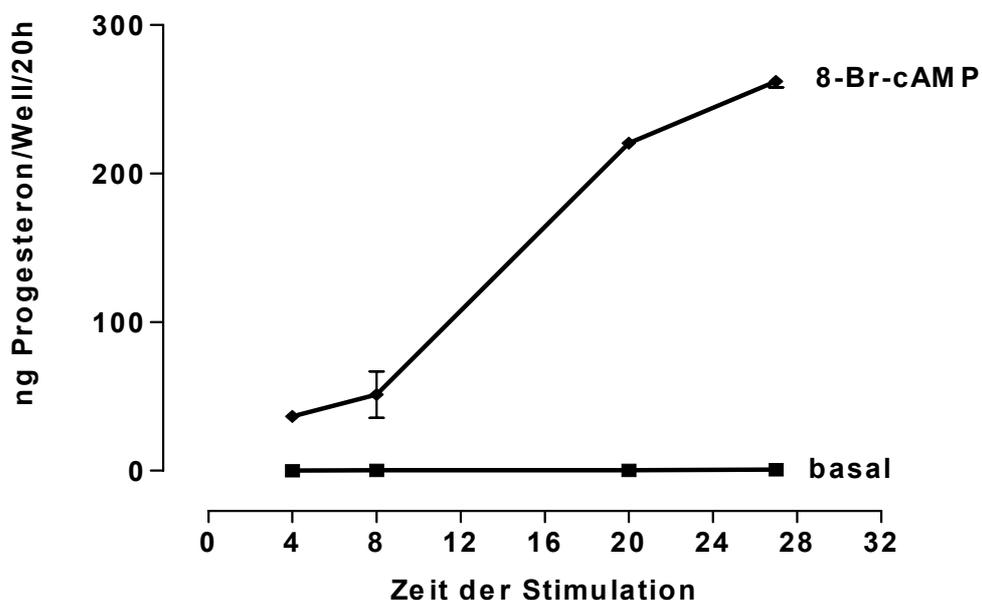


**Abb. 10 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von hCG (A) bzw. cAMP (B) auf die Produktion des Progesterons in MA-10-Zellen**

Die quantitative Bestimmung des aus MA-10-Zellen ins Kulturmedium sezernierten Progesterons wurde nach Stimulation der Zellen mit hCG (ng/ml) und 8-Br-cAMP (mM) in den oben angegebenen Konzentrationen durchgeführt. Die Zellen wurden 20 h im serumfreien Kulturmedium bei 36 °C inkubiert.

#### 4.1.2 Zeitkinetik der Freisetzung von Progesteron in das Kulturmedium nach Stimulation mit 8-Br-cAMP

Um den zeitlichen Verlauf der Sekretion von Progesteron zu analysieren, wurden MA-10-Zellen mit 1 mM 8-Br-cAMP stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde das Kulturmedium gesammelt und für ELISA-Messungen eingesetzt. Für die Quantifizierungen der sezernierten Produkte wurde das Kulturmedium von MA-10-Zellen, die mit 8-Br-cAMP stimuliert wurden, mit dem Kulturmedium unstimulierter MA-10-Zellen verglichen. Die Progesteronproduktion ins Kulturmedium konnte nach 4- stündiger Behandlung der MA-10-Zellen mit 8-Br-cAMP detektiert werden. Von diesem Zeitpunkt an stieg die Menge sezernierten Progesterons kontinuierlich an, bis zum Behandlungszeitpunkt von ca. 28h bzw. 20h ein Sättigungsbereich erreicht wurde (Abb. 11).

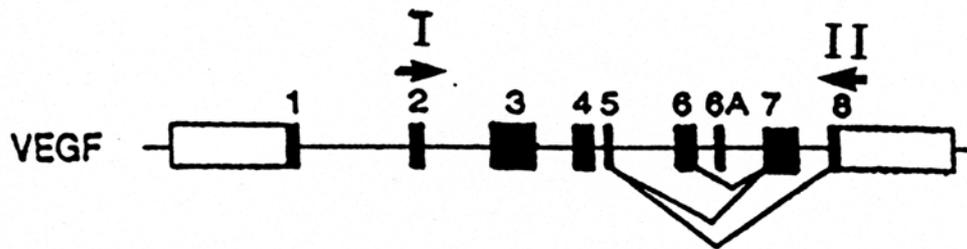


**Abb. 11 Zeitkinetik von cAMP-induzierter Progesteron-Biosynthese in MA-10-Zellen**

Die in das Kulturmedium sezernierten Produkte wurden nach der Stimulation der Zellen, in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 1 mM 8-Br-cAMP quantifiziert. Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium bei 36 °C inkubiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen. \*\*\*P<0.001, im Vergleich zum Basalwert.

## 4.2 Regulation der VEGF- und StAR-Expression durch hCG/cAMP in MA-10-Zellen

Ziel dieses Arbeitsabschnittes war, Hinweise auf eine Transkription des VEGF-Gens und somit auf eine potentielle Expression der Proteine in Leydig-Zellen zu finden.



**Abb. 12 Struktur der vier Isoformen des humanen VEGF-Gens**

Die Pfeile zeigen die Lokalisierung der VEGF-Primer (I, sense Primer und II, antisense Primer) in Exons 2 und 8 an (nach Keith et al., 1991). Zur humanen Sequenz zeigen die Sequenzen der von mir verwendeten 5'- bzw. 3'-Primer der Ratte eine 83.3 %ige bzw. 95.5 %ige Homologie (Keith et al., 1991; Redmer et al., 1996).

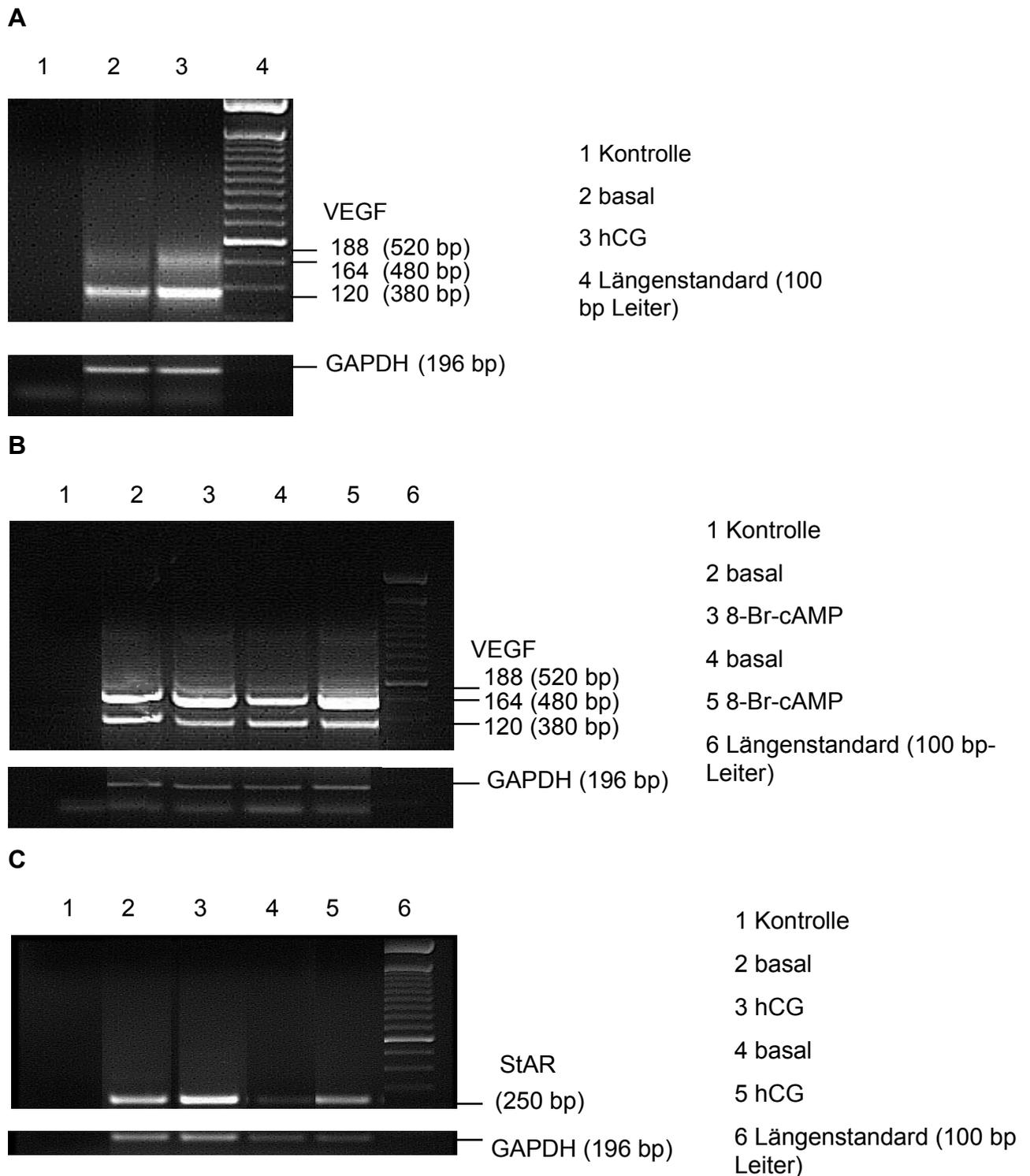
#### 4.2.1 Nachweis der VEGF- und StAR-mRNA durch RT-PCR

MA-10-Zellen wurden wie in Kap. 3.1.2 beschrieben kultiviert. Die Inkubationen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von hCG oder 8-Br-cAMP durchgeführt. Danach wurde RNA aus den Zellen isoliert und die Gesamt-RNA extrahiert (Kap. 3.2.1) und in einer reversen Transkription wurden 2.5 µg jeder RNA-Probe in cDNA umgeschrieben (s. Kap. 3.2.2).

PCR-Analysen wurden mit spezifischen Primern für VEGF und StAR sowie zur Kontrolle mit GAPDH-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Die cDNA für das konstitutiv exprimierte Gen GAPDH konnte in allen Ansätzen in ähnlicher Menge amplifiziert werden, was für eine gute und vergleichbare Integrität der cDNAs sprach.

Amplifizierungen mit VEGF-spezifischen Primern (Lokalisation siehe Abb.12) ergaben drei Fragmente mit einer Größe von 380, 480 und 520 bp (Abb. 13 A, B). Diese Fragmente entsprechen den VEGF-Spleiß-Varianten VEGF<sub>120</sub>, VEGF<sub>164</sub> und VEGF<sub>180</sub>. Alle drei Fragmente waren bereits in unstimulierten Zellen (basal) nachweisbar. Die Inkubation der Zellen mit hCG (Abb. 13 A) oder 8-Br-cAMP (Abb. 13 B) führte jedoch zu einer signifikanten Zunahme der PCR-Fragmente, was auf eine verstärkte Expression des VEGF-Gens in Anwesenheit beider Faktoren hindeutet.

Die Amplifizierungen mit StAR-spezifischen Primern zeigten ebenfalls die Anwesenheit von Transkripten im unstimulierten Zustand und eine Zunahme nach Inkubation mit hCG (Abb. 13 C) und 8-Br-cAMP (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 13: Nachweis von VEGF (A, B) und StAR (C) mRNA in MA-10 Zellen durch RT-PCR**

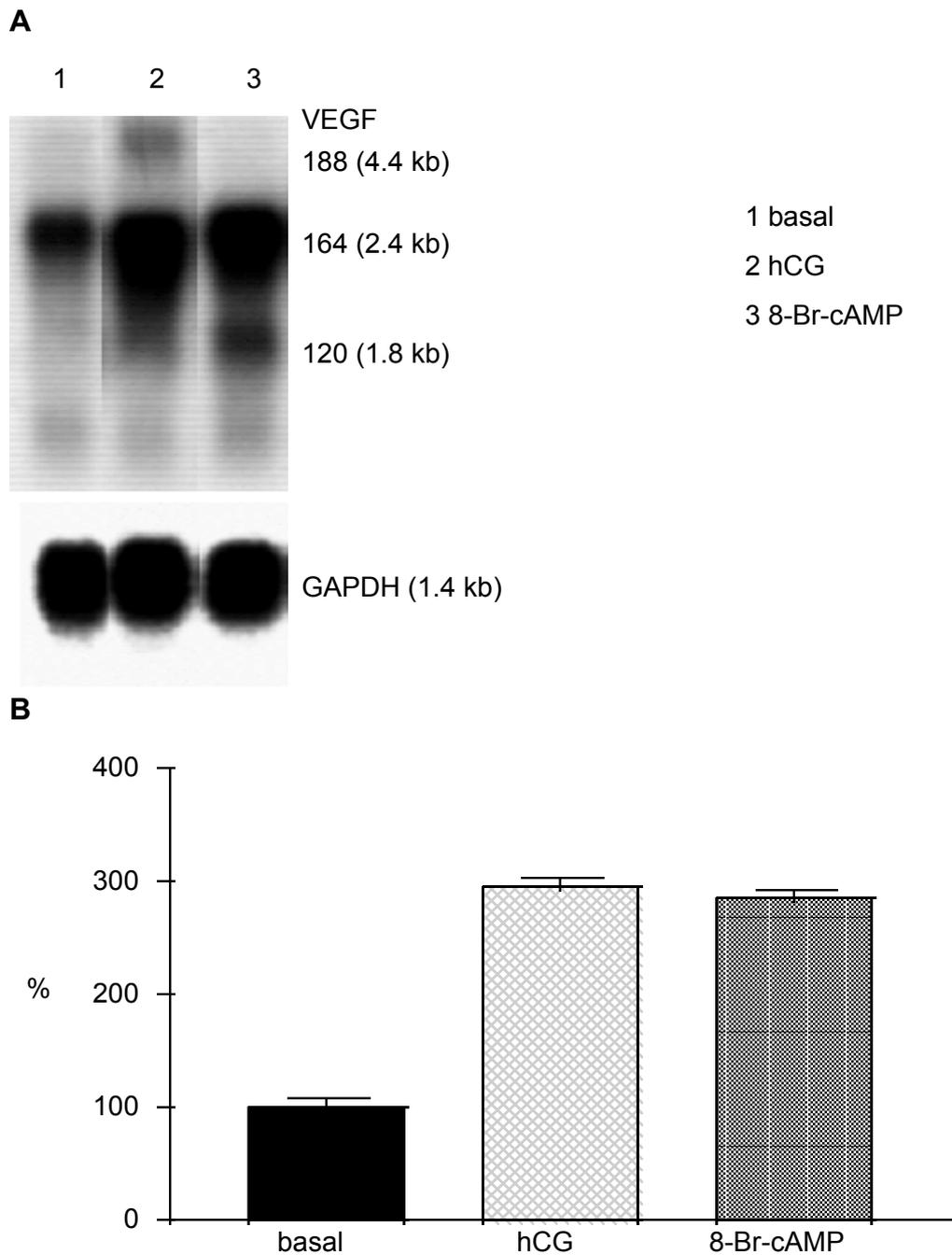
RNA wurde aus zwei unterschiedlichen Passagen von MA-10-Zellen isoliert, die in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von hCG (4 ng/ml) bzw. 8-Br-cAMP (1 mM) inkubiert worden waren. Nach reverser Transkription zu cDNA wurden 30 Zyklen der PCR-Amplifikation mit spezifischen Primern durchgeführt. Referenzreaktionen mit GAPDH-spezifischen Primern und Kontrollreaktionen in Abwesenheit von cDNA sind gezeigt.

#### 4.2.2 Nachweis von VEGF- und StAR-Transkripten durch Northern Blot-Analysen

MA-10-Zellen wurden wie in Kap. 3.1.3 beschrieben in Abwesenheit oder Anwesenheit von hCG und 8-Br-cAMP inkubiert. Nach RNA-Extraktion wurden die RNA-Moleküle in einem 1.3 %igen Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylon-Membran transferiert. Hierfür wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die membrangebundene RNA wurde mit einer radioaktiv ( $^{32}\text{P}$ ) markierten VEGF-Sonde (494 bp lang) hybridisiert (siehe auch Kap. 3.2.16). Nach Waschen unter stringenten Bedingungen (Kap. 3.2.17) wurden die Hybridisierungssignale 1-2 Tage auf einem Biomax-MR Film mit Intensivierungs-Screen exponiert.

Die Hybridisierungssignale entsprachen den erwarteten VEGF-Transkripten: 1.8 kb (VEGF<sub>120</sub>), 2.4 kb (VEGF<sub>164</sub>) und 4.4 kb (VEGF<sub>188</sub>) (Abb.14 A). Hierbei zeigte sich, dass das VEGF<sub>164</sub>-Protein die am häufigsten vorkommende Isoform in den MA-10-Zellen ist. Die Inkubation der Zellen mit hCG führte zu einer dramatischen Zunahme des 2.4 kb langen VEGF-Transkriptes. Auch 8-Br-cAMP bewirkte eine Zunahme von VEGF-mRNA. Interessanterweise war in diesem Fall die Zunahme auf zwei Transkripte (VEGF<sub>120</sub> und VEGF<sub>164</sub>) beschränkt, während das 4.4 kb große VEGF<sub>188</sub>-Transkript durch 8-Br-cAMP nicht hochreguliert wurde.

GAPDH, ein konstitutiv exprimiertes Gen, das in jedem Gewebe gleich exprimiert wird, wurde als Kontrolle verwendet, um die Menge der geladenen RNA zu vergleichen. Die densitometrische Auswertung der Signale (Abb. 14 B) zeigte, dass hCG und 8-Br-cAMP die Menge der VEGF<sub>164</sub>-Transkripte jeweils etwa dreifach erhöhte. Zur Quantifizierung wurde das VEGF<sub>164</sub>-Transkript ausgewählt, da Messungen auf Proteinebene (s. Kap. 4.2.3) ebenfalls mit dieser Spleiß-Variante durchgeführt wurden.

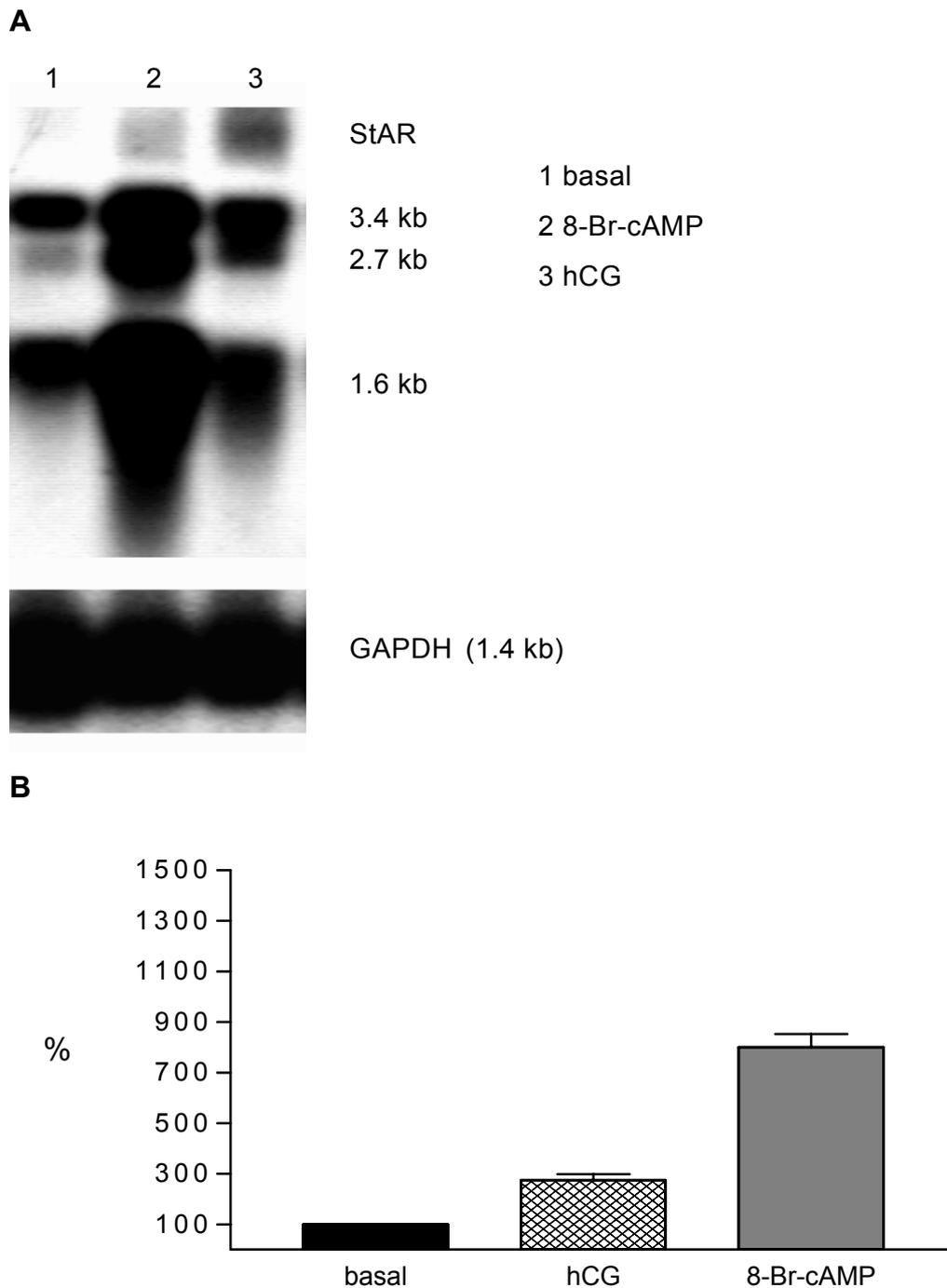


**Abb. 14 Einfluss von hCG und 8-Br-cAMP auf die VEGF-Genexpression in MA-10-Zellen**

A: Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 4 ng/ml hCG beziehungsweise 1 mM 8-Br-cAMP für 20 h bei 36 °C inkubiert. RNA wurde isoliert und jeweils 20 µg Gesamt-RNA pro Spur für Northern Blot-Analysen mit einer VEGF-Sonde verwendet. Dieselbe Membran wurde auch mit einer GAPDH-Sonde als Kontrolle hybridisiert. B: Quantifizierung der Signale von VEGF<sub>164</sub> durch densitometrische Auswertung, wobei der basale Wert willkürlich auf 100% gesetzt wurde. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen. \*\*\*P<0.001, im Vergleich zum Basalwert.

Entsprechende Untersuchungen wurden zum direkten Nachweis von StAR-Transkripten durchgeführt. Auch hierfür wurde eine radioaktiv ( $^{32}\text{P}$ ) markierte StAR – spezifische Sonde verwendet (s. Kap. 3.2.16).

Auch in diesem Fall konnten drei Hybridisierungssignale mit kalkulierten mRNA-Längen von 1.6, 2.7 und 3.4 kb detektiert werden. Im Vergleich zu dem stimulatorischen Effekt durch 8-Br-cAMP konnte hCG die StAR-Genexpression nicht so dramatisch stimulieren (Abb. 15 A). Die densitometrische Auswertung der Experimente zeigte, dass hCG die Expression der StAR-Transkripte um den Faktor 3 und 8-Br-cAMP um den Faktor 8 erhöhte (Abb. 15 B).



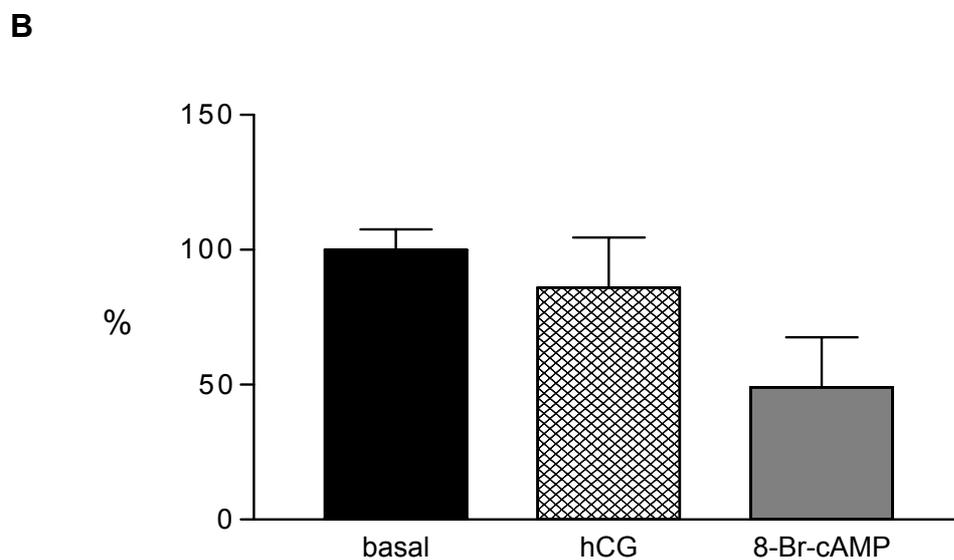
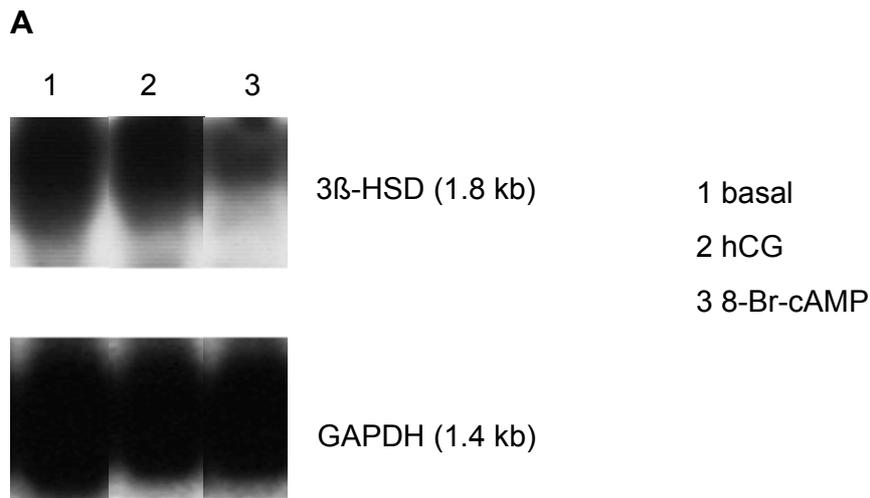
**Abb. 15 Einfluss von hCG und 8-Br-cAMP auf die StAR-Genexpression in MA-10-Zellen**

A: Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 4 ng/ml hCG beziehungsweise 1 mM 8-Br-cAMP für 20 h bei 36 °C inkubiert. RNA wurde isoliert und jeweils 20 µg Gesamt-RNA pro Spur für Northern Blot-Analysen mit einer StAR-Sonde verwendet. Dieselbe Membran wurde auch mit einer GAPDH-Sonde als Kontrolle hybridisiert. B: Quantifizierung der Signale (3.4 kb, 2.7 kb und 1.6 kb) durch densitometrische Auswertung, wobei der basale Wert willkürlich auf 100% gesetzt wurde. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen. \*\*\*P<0.001, im Vergleich zum Basalwert.

Weitere Studien dienten dem Zweck, die Anwesenheit des Enzyms 3-Beta-Hydroxydehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) zu belegen sowie eine mögliche Beeinflussung durch hCG/cAMP zu untersuchen. Dieses Enzym ist an der Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron an der inneren Mitochondrienmembran beteiligt.

Zum direkten Nachweis der 3 $\beta$ -HSD-Transkripte wurde eine radioaktiv ( $^{32}\text{P}$ ) markierte 3 $\beta$ -HSD-spezifische Sonde (1.8 kb lang) verwendet (s. Kap. 3.2.16), mit der ein Transkript von 1.8 kb detektiert werden konnte (Abb. 16 A).

Im Gegensatz zu den beobachteten positiven Effekten durch hCG und 8-Br-cAMP auf die VEGF- und StAR-Genexpression bewirkte die Inkubation der Zellen mit cAMP eine Reduktion der 3 $\beta$ -HSD-Genexpression, während kein Effekt von hCG auf das 1.8 Kb große 3 $\beta$ -HSD-Transkript (Abb. 16 A) ersichtlich ist. GAPDH wurde auch hier als Kontrolle benutzt. Die densitometrische Auswertung der Signale zeigte, dass cAMP-Anwesenheit zu einer etwa zweifachen Reduktion der 3 $\beta$ -HSD-Genexpression führt (Abb. 16 B).

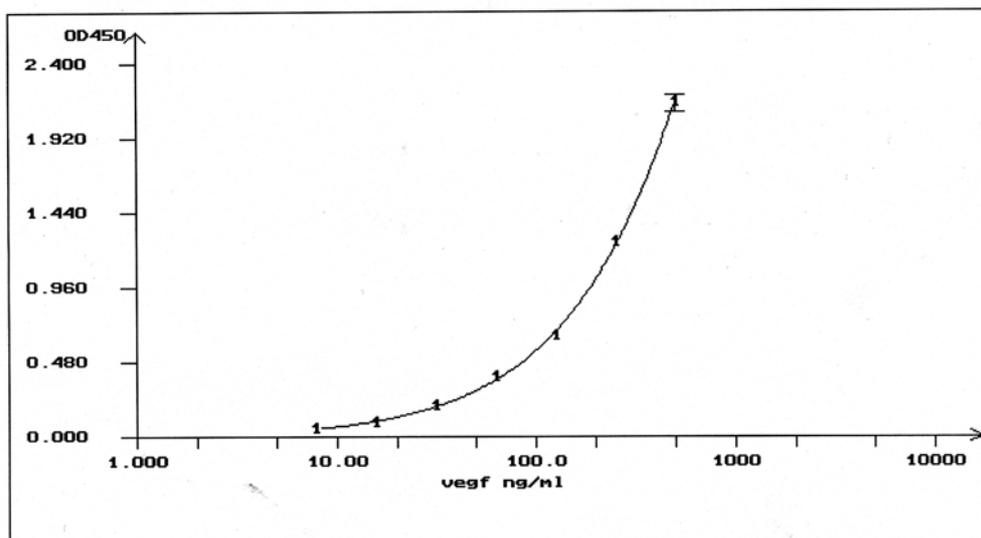


**Abb. 16 Einfluss von hCG und 8-Br-cAMP auf die 3β-HSD-Genexpression in MA-10-Zellen**

A: Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 4 ng/ml hCG beziehungsweise 1 mM 8-Br-cAMP für 20 h bei 36 °C inkubiert. RNA wurde isoliert und jeweils 20 µg Gesamt-RNA pro Spur für Northern Blot-Analysen mit einer 3β-HSD-Sonde verwendet. Dieselbe Membran wurde auch mit einer GAPDH-Sonde als Kontrolle hybridisiert. B: Quantifizierung der Signale von jeweils 3 Versuchen durch densitometrische Auswertung, wobei der basale Wert willkürlich auf 100% gesetzt wurde. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen.

### 4.2.3 Expression von VEGF-Protein in MA-10-Zellen

Parallel zu quantitativen Bestimmungen der Progesteron-Synthese wurden auch Quantifizierungen zur Sekretion des VEGF-Proteins durchgeführt. Für diese Bestimmung wurde ebenfalls das gesammelte Kulturmedium verwendet und VEGF mittels ELISA nachgewiesen. Mit dieser Methode wird die Isoform VEGF<sub>164</sub> detektiert, die hauptsächlich sezerniert wird. Abbildung 17 zeigt eine repräsentative VEGF-Standardkurve.



**Abb. 17** Graphische Darstellung einer repräsentativen VEGF-Standardkurve für den VEGF-ELISA

Auf der obigen Standardkurve ist die optische Dichte für jeden Standard auf der Y-Achse gegen die Konzentration von VEGF auf der X-Achse geplottet. Es wurde in einem ELISA-Reader (SLT) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Der Verlauf der Kurve reflektiert die gemessene Farbentwicklung der Enzymreaktion, die proportional zur Menge des VEGF-Proteins ist. Die Werte der Proben können dann mit Hilfe der Standardkurve abgelesen werden.

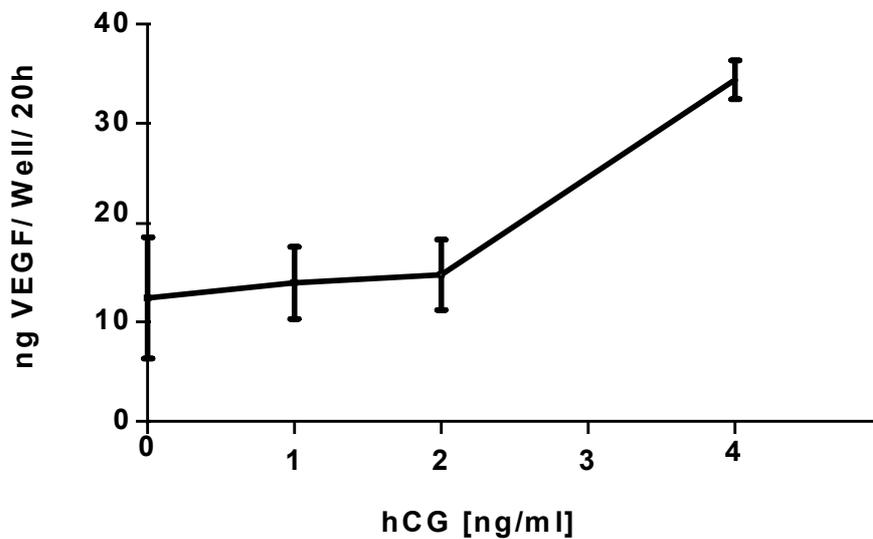
---

#### **4.2.3.1 Messungen von in das Kulturmedium sezerniertem VEGF-Protein nach Stimulation der MA-10-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von hCG und 8-Br-cAMP**

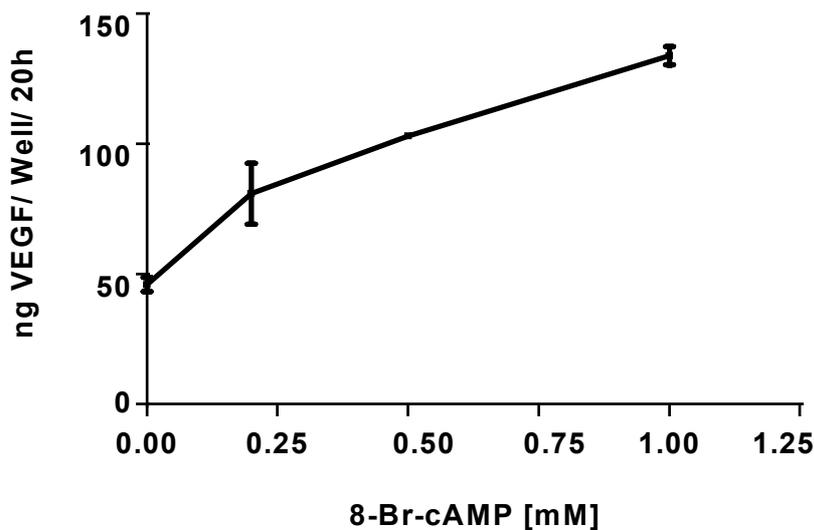
Wie in Kap. 3.1.2 beschrieben, wurden MA-10-Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt und die Zellzahl unter dem Lichtmikroskop bestimmt. In einer 12-Well-Platte wurden  $1.5 \times 10^5$  Zellen pro Well mit Kulturmedium ausgesät. Nach einer 24-stündigen Kultivierung wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von hCG und 8-Br-cAMP für 20 h stimuliert. Die Behandlung der Zellen mit verschiedenen Hormonen wurde in serumfreiem Kulturmedium durchgeführt.

Anschließend wurde das aus den Zellen ins Kulturmedium sezernierte VEGF-Protein quantifiziert. Die Auswertung der Quantifizierungen zeigte, dass hCG und 8-Br-cAMP in der Lage sind, die VEGF-Proteinsynthese dosisabhängig zu stimulieren (Abb.18). Die Daten dieser Quantifizierung für die Sekretion von VEGF<sub>164</sub>-Protein stehen im Einklang mit dem Ergebnis der Detektion von VEGF<sub>164</sub> kodierenden Transkripten.

A



B



**Abb. 18 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von hCG (A) bzw. cAMP (B) auf die Expression des VEGF-Proteins in MA-10-Zellen**

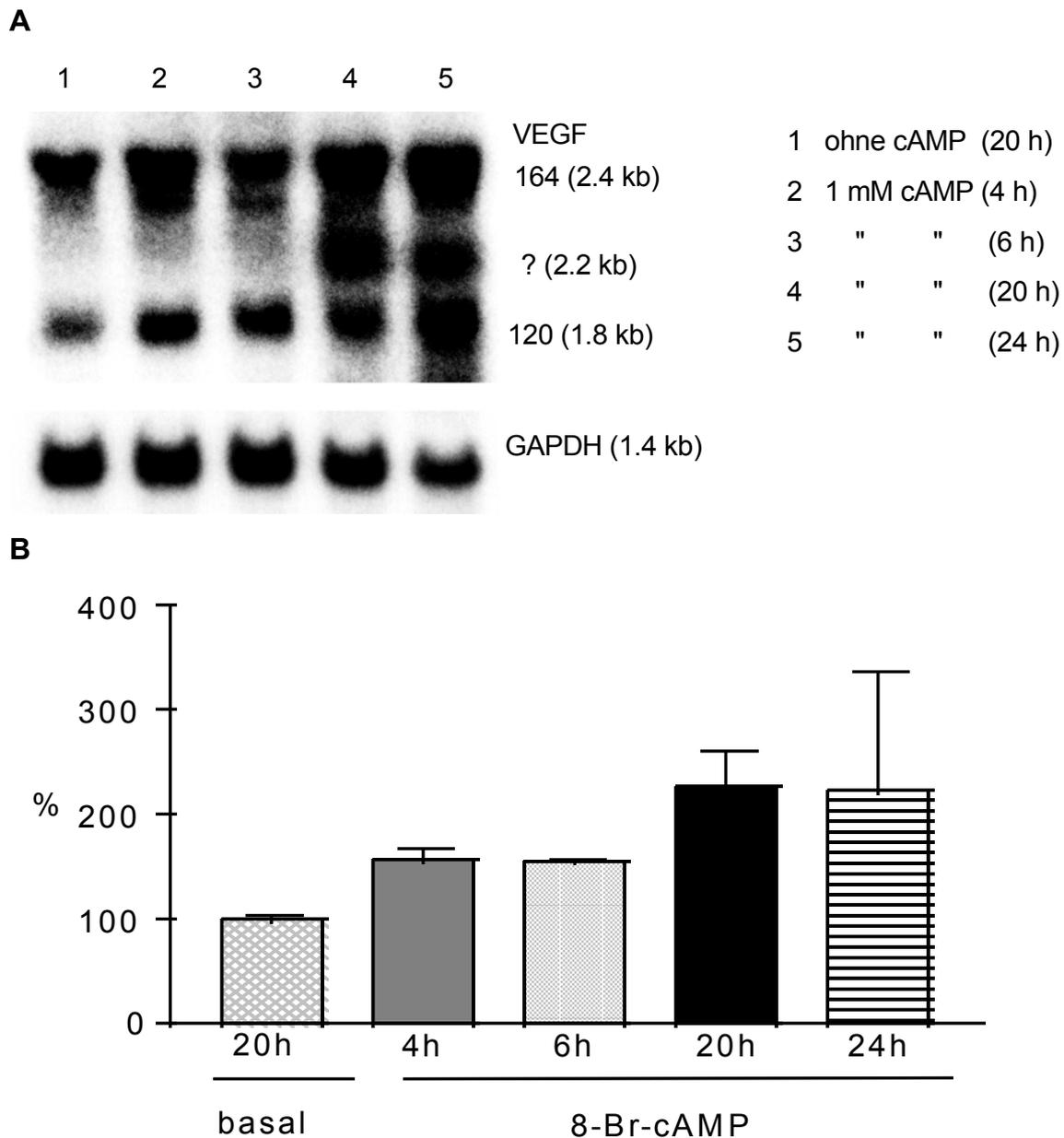
Die Messung für die quantitative Bestimmung des aus MA-10-Zellen ins Kulturmedium sezernierten VEGF-Proteins wurde nach der Stimulation mit den oben angezeigten Konzentrationen von hCG (ng/ml) und 8-Br-cAMP (mM) durchgeführt. Die Zellen wurden 20 h in serumfreiem Kulturmedium bei 36 °C inkubiert.

#### 4.2.4 Zeitkinetik der Stimulation der VEGF-Genexpression durch cAMP

Für diese Untersuchungen wurden MA-10-Zellen unterschiedlich lange mit 8-Br-cAMP inkubiert. Danach wurde aus den Zellen Gesamt-RNA isoliert und die RNA-Moleküle in einem 1.3 %igen Agarose-Formaldehydgel aufgetrennt. Zur Detektion von VEGF-Transkripten wurde als Sonde eine 494 bp lange VEGF-cDNA-Sequenz verwendet (s. Kap. 3.2.16). Die Expositionszeit betrug 2 Tage mit einem hochempfindlichen Film bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (Biomax MR).

Die Resultate dieser Untersuchungen zeigten, dass 8-Br-cAMP die VEGF-Expression schon nach 4 h auf transkriptioneller Ebene induziert. Nach 20 h wurde ein Sättigungsbereich erreicht. Dies betrifft die Hybridisierungssignale bei 1.8 kb (VEGF<sub>120</sub>) und 2.4 kb (VEGF<sub>164</sub>). Interessanterweise war noch ein zusätzliches ca. 2.2 kb langes Transkript erkennbar, das während der Inkubation mit 8-Br-cAMP hochreguliert wurde (Abb. 19 A).

GAPDH, ein konstitutiv exprimiertes Gen, das in jedem Gewebe gleich exprimiert wird, wurde als Kontrolle benutzt, um die Menge der aufgetragenen RNA zu vergleichen. Die densitometrische Auswertung der Signale zeigte, dass 8-Br-cAMP die VEGF-Genexpression nach 20 h etwa 2-2.5 fach erhöhte (Abb. 19 B).

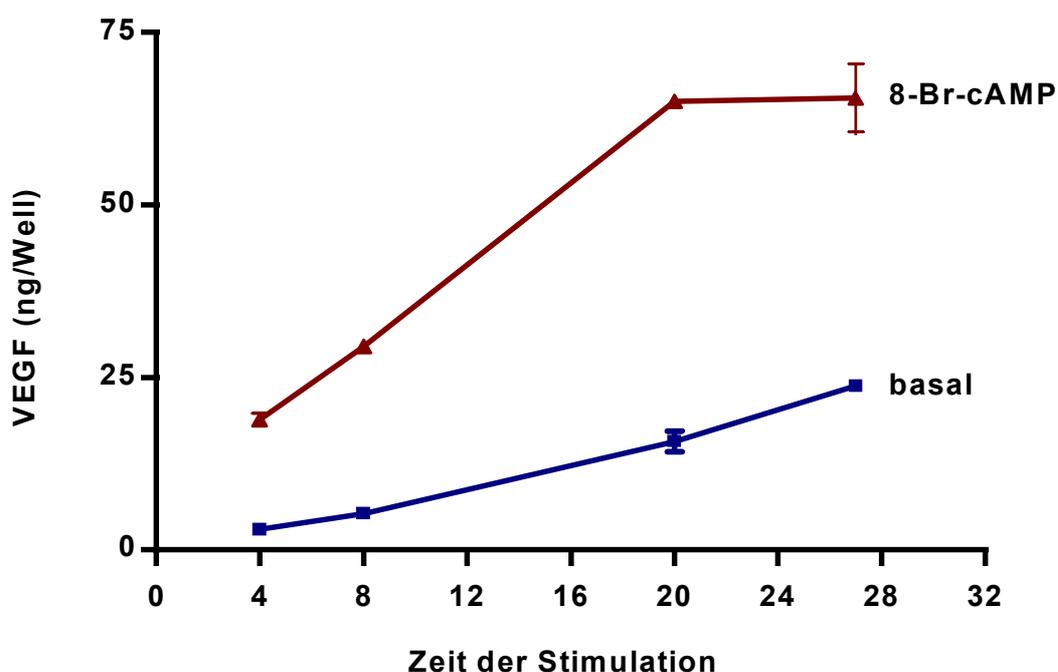


**Abb. 19 Zeitkinetik der cAMP-induzierten VEGF-Genexpression in MA-10-Zellen**

A: Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 1 mM 8-Br-cAMP für unterschiedliche Zeit bei 36 °C inkubiert. RNA wurde isoliert und jeweils 20 µg Gesamt-RNA pro Spur für Northern Blot-Analysen mit einer VEGF-Sonde verwendet. Dieselbe Membran wurde auch mit einer GAPDH-Sonde als Kontrolle hybridisiert. B: Quantifizierung der Signale von VEGF<sub>164</sub> durch densitometrische Auswertung, wobei der basale Wert willkürlich auf 100% gesetzt wurde. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen. \*\*\*P<0.001, im Vergleich zum Basalwert.

#### 4.2.5 Zeitkinetik der VEGF-Proteinfreisetzung in das Kulturmedium nach Stimulation mit 8-Br-cAMP

Um den zeitlichen Verlauf der Sekretion von VEGF-Protein zu analysieren, wurden MA-10-Zellen mit 1 mM 8-Br-cAMP stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde das Kulturmedium gesammelt und für ELISA-Messungen eingesetzt. Für die Quantifizierungen der sezernierten Produkte wurden Proben von stimulierten mit unstimulierten Zellen verglichen. VEGF<sub>164</sub> konnte nach 4-stündiger Behandlung mit 8-Br-cAMP detektiert werden. Von diesem Zeitpunkt an stieg die Menge des sezernierten VEGF<sub>164</sub> kontinuierlich an, bis zum Behandlungszeitpunkt von ca. 28h bzw. 20h ein Sättigungsbereich erreicht wurde (Abb. 20).



**Abb. 20** Zeitkinetik der cAMP-induzierten Expression des VEGF-Proteins in MA-10-Zellen

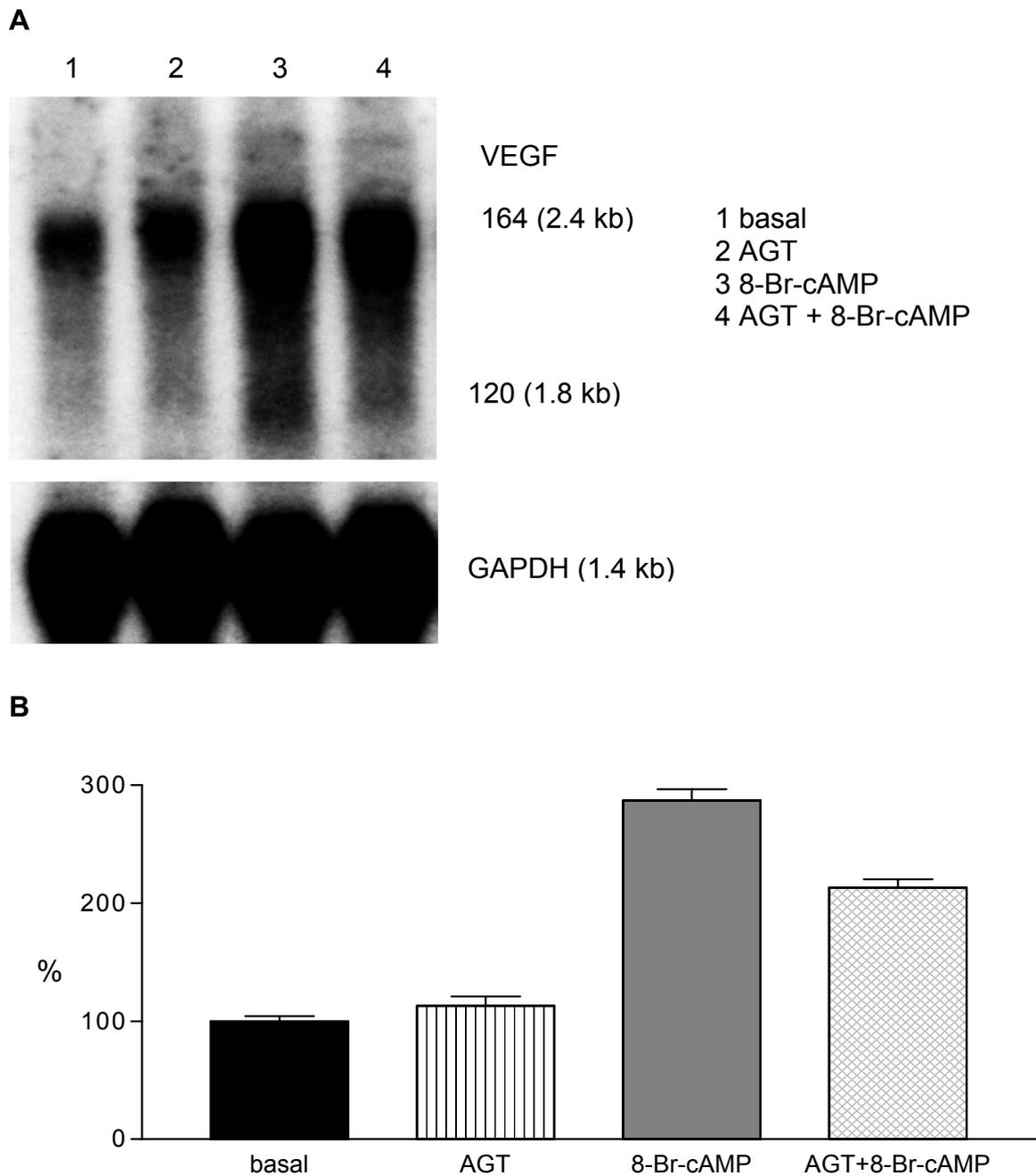
Die ins Kulturmedium sezernierten Produkte wurden nach der Stimulation der Zellen in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 1 mM 8-Br-cAMP quantifiziert. Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium bei 36 °C inkubiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen. \*\*\*P<0.001, im Vergleich zum Basalwert.

### **4.3 Regulation der VEGF-Expression durch das Steroidhormon Progesteron**

#### **4.3.1 Aminoglutethimid, ein Inhibitor der Steroidhormon-Biosynthese, inhibiert die VEGF-mRNA-Expression**

Um zu untersuchen, ob cAMP direkt oder indirekt über die Steroidhormone auf die VEGF-Expression einwirken kann, wurden MA-10-Zellen mit 1 mM 8-Br-cAMP in Abwesenheit (basal) oder in Anwesenheit von 5 µg/ml Aminoglutethimid (AGT) inkubiert. Die Produktion der Steroidhormone wird durch Zugabe von Substanzen wie AGT unterbunden. AGT inhibiert die Aktivierung des *P450 side chain cleavage* (P450 SCC)-Enzyms, das an der inneren Mitochondrienmembran die Umwandlung des Cholesterins zu Steroidhormonen ermöglicht. Die Steroidhormon-Biosynthese wird durch cAMP stimuliert. Nach der Isolierung der RNA wurden die RNA-Moleküle in einem 1.3 %igen Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylon-Membran transferiert. Hierfür wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA pro Spur eingesetzt. Die membrangebundene RNA wurde mit einer radioaktiv markierten VEGF-Sonde hybridisiert (Kap. 3.2.16).

AGT inhibierte die 8-Br-cAMP-stimulierte VEGF-Expression beider Transkripte von 1.8 kb (VEGF<sub>120</sub>) und 2.4 kb (VEGF<sub>164</sub>) (Abb. 21 A). GAPDH wurde auch hier als Kontrolle verwendet, um die mRNA-Expression zu vergleichen. Die densitometrische Auswertung der VEGF-Transkripte zeigte, dass AGT auf die basale VEGF-Expression keinen Effekt hat, aber die 8-Br-cAMP-stimulierte VEGF-Expression um etwa 20% reduzierte (Abb. 21 B).



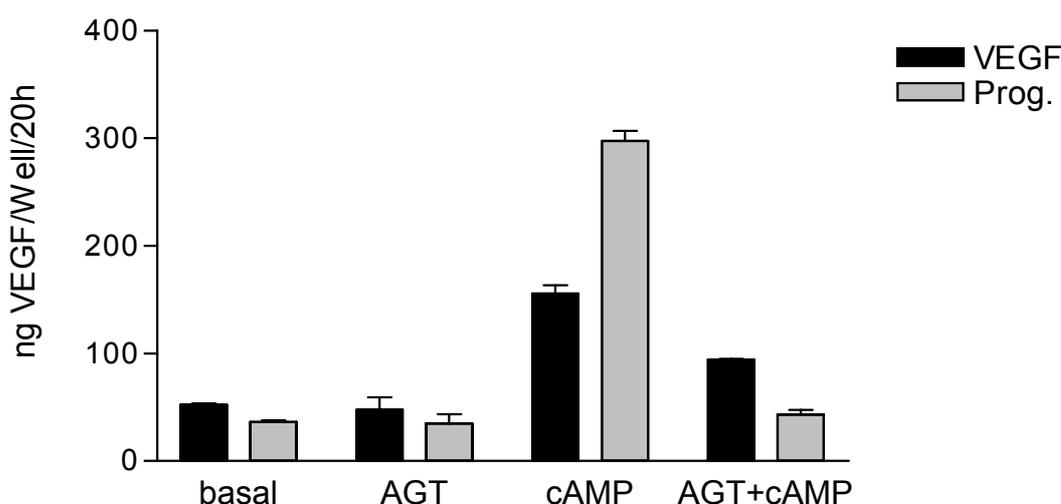
**Abb. 21 Einfluss von AGT und 8-Br-cAMP auf die VEGF-Genexpression in MA-10-Zellen**

A: Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 5  $\mu\text{g/ml}$  AGT und/oder 1 mM 8-Br-cAMP für 20 h bei 36  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. RNA wurde isoliert und jeweils 20  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA pro Spur für Northern Blot-Analysen mit einer VEGF-Sonde verwendet. Dieselbe Membran wurde auch mit einer GAPDH-Sonde als Kontrolle hybridisiert. B: Quantifizierung der Signale von VEGF<sub>164</sub> durch densitometrische Auswertung, wobei der basale Wert willkürlich auf 100% gesetzt wurde. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen.

#### 4.3.2 Aminoglutethimid, ein Inhibitor der Steroidbiosynthese, inhibiert die VEGF-Proteinproduktion in MA-10-Zellen

Entsprechende Untersuchungen wurden zur Quantifizierung des sezernierten VEGF-Proteins wie auch des sezernierten Progesterons durchgeführt. Aufgrund der teilweisen Inhibition der VEGF-Transkription durch AGT wurde untersucht, ob AGT auch die 8-Br-cAMP-stimulierte VEGF-Proteinproduktion hemmen kann. Dafür wurden MA-10-Zellen mit 8-Br-cAMP in Abwesenheit oder Anwesenheit von 5 µg/ml AGT für 20 h inkubiert. Anschließend wurden das von den MA-10-Zellen in das Kulturmedium sezernierte Progesteron und VEGF-Protein gemessen.

Das Ergebnis zeigte, dass AGT nicht nur die 8-Br-cAMP-stimulierte Progesteronproduktion, sondern auch die VEGF<sub>164</sub>-Proteinproduktion inhibierte.



**Abb. 22 Einfluss von AGT und 8-Br-cAMP auf die Progesteronproduktion und die Expression des VEGF-Proteins in MA-10-Zellen**

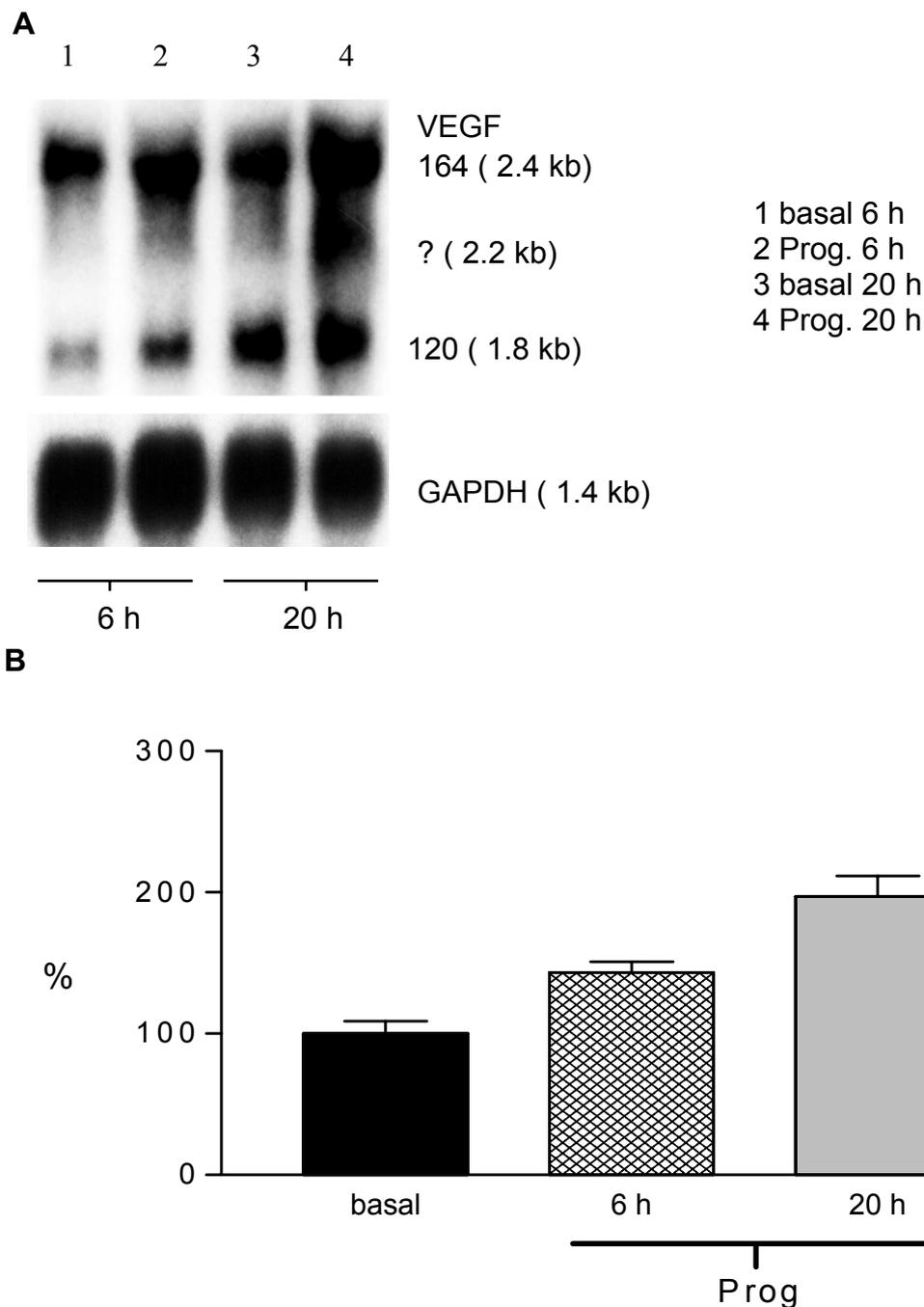
Messungen zur Bestimmung des aus MA-10-Zellen sezernierten Progesterons und VEGF-Proteins ins Kulturmedium. Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium bei 36 °C in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 5 µg/ml AGT und/oder 1 mM 8-Br-cAMP für 20 h inkubiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen.

### 4.3.3 Effekt der Steroidhormone auf die VEGF-Genexpression

Die Inhibition der 8-Br-cAMP-stimulierten VEGF-Genexpression durch AGT weist darauf hin, dass 8-Br-cAMP entweder direkt oder indirekt über Steroidhormone die VEGF-Expression reguliert. Aus diesem Grund wurden MA-10-Zellen in Abwesenheit (basal) und in Anwesenheit von verschiedenen Steroiden (Progesteron, Dexamethason und Dihydroxytestosteron) inkubiert. Dafür wurden MA-10-Zellen mit  $10^{-7}$  M Dihydroxytestosteron (DHT),  $10^{-7}$  M Dexamethason (Dex) oder 10 µg/ml Progesteron inkubiert. Unterschiedliche Konzentrationen der Steroide wurden eingesetzt, weil MA-10-Zellen einen nukleären Androgen- und Glucocorticoidrezeptor besitzen, jedoch keinen nukleären Progesteronrezeptor. Progesteron bindet möglicherweise mit schwacher Bindungsaffinität an den Glucocorticoid- und Androgenrezeptor. Daher wurde eine erhöhte Konzentration von Progesteron verwendet.

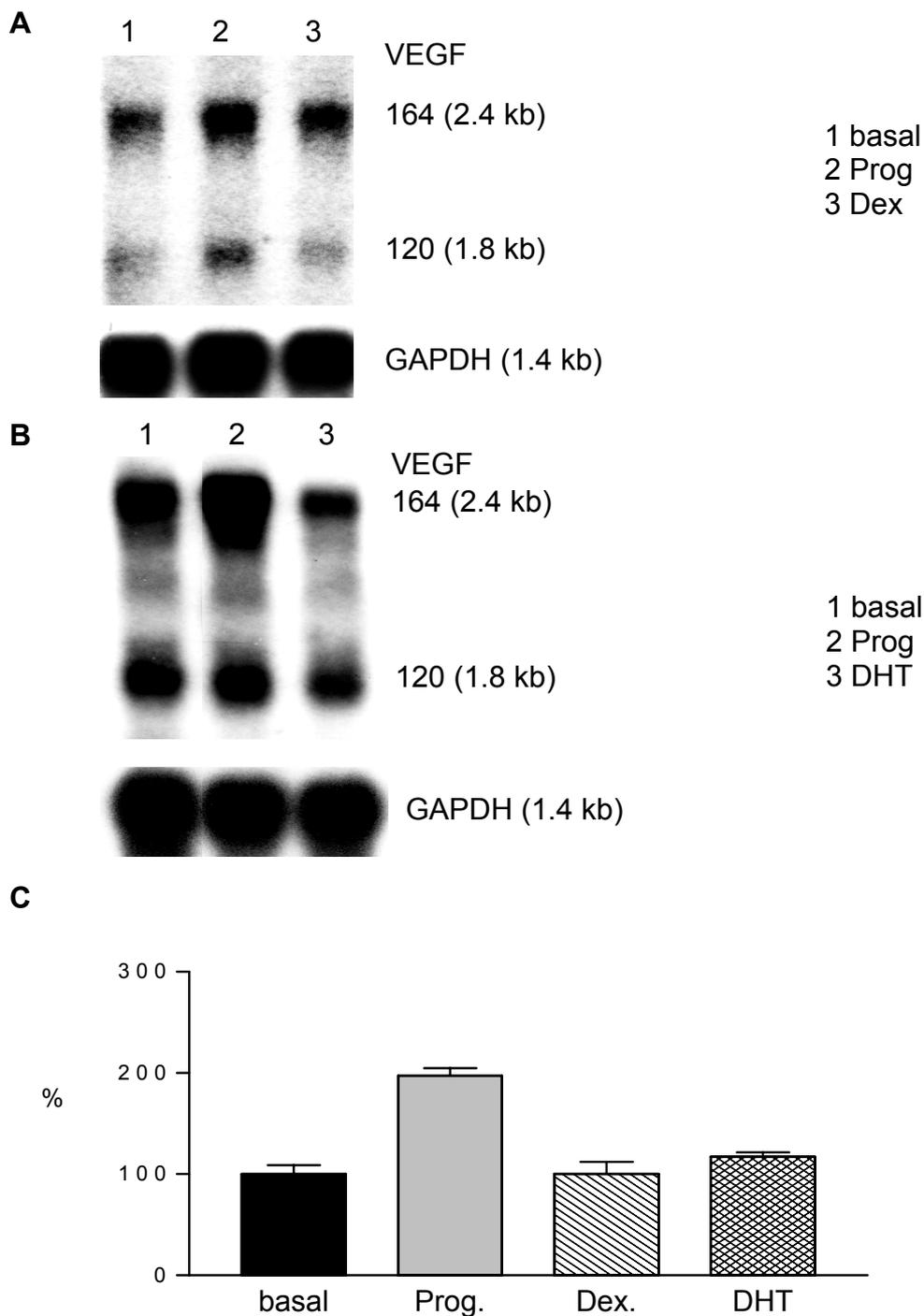
Nach Isolation der Gesamt-RNA und Auftrennung der mRNA-Moleküle in einem Gel wurden die RNA-Moleküle auf eine Nylon-Membran transferiert. Hierfür wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA pro Spur eingesetzt. Die membrangebundene RNA wurde mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten VEGF-Sonde (494 bp lang) hybridisiert. Nach zwei Tagen Exposition konnten Hybridisierungssignale auf den Autoradiogrammen detektiert werden.

Die Untersuchung zeigte, dass Progesteron die VEGF-Expression schon nach 6 h auf transkriptioneller Ebene induziert und nach 20 h eine maximale Zunahme erreicht wird (Abb. 23 A). Es wurden die Hybridisierungssignale 1.8 kb (VEGF<sub>120</sub>) und 2.4 kb (VEGF<sub>164</sub>) detektiert. Wie schon vorher beobachtet (Abb. 19 A, B Kap. 4.2.4), war interessanterweise auch in diesem Fall in ca. 2.2 kb langes zusätzliches Transkript erkennbar, das nach Inkubation mit Progesteron hochreguliert wurde. Die densitometrische Auswertung der VEGF-Transkripte zeigte, dass eine zweifache Zunahme der VEGF mRNA-Expression durch Progesteron (Abb. 23 B) erfolgte. Jedoch zeigten DHT und Dex keinen Effekt auf die VEGF-Expression (Abb. 24 A, B und C).



**Abb. 23 Einfluss von Progesteron in Abhängigkeit von der Zeit auf die VEGF-Genexpression in MA-10-Zellen**

A: Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 10  $\mu\text{g/ml}$  Progesteron für unterschiedliche Zeit bei 36  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. RNA wurde isoliert und jeweils 20  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA pro Spur für Northern Blot-Analysen mit einer VEGF-Sonde verwendet. Dieselbe Membran wurde auch mit einer GAPDH-Sonde als Kontrolle hybridisiert. B: Quantifizierung der Signale von VEGF<sub>164</sub> durch densitometrische Auswertung, wobei der basale Wert willkürlich auf 100% gesetzt wurde. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen. \*\*\* $P < 0.001$ , im Vergleich zum Basalwert.

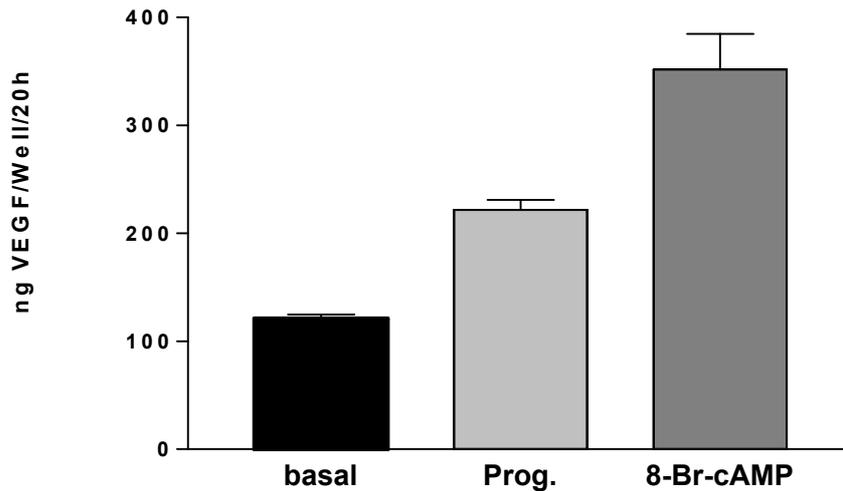


**Abb. 24 Einfluss von Progesteron, Dex und DHT auf die VEGF-Genexpression in MA-10-Zellen**

A, B: Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 10 µg/ml Prog., 10<sup>-7</sup> M Dex. beziehungsweise 10<sup>-7</sup> M DHT für 20 h bei 36 °C inkubiert. RNA wurde isoliert und jeweils 20 µg Gesamt-RNA pro Spur für Northern Blot-Analysen mit einer VEGF-Sonde verwendet. Dieselbe Membran wurde auch mit einer GAPDH-Sonde als Kontrolle hybridisiert. C: Quantifizierung der Signale von VEGF<sub>164</sub> durch densitometrische Auswertung, wobei der basale Wert willkürlich auf 100% gesetzt wurde. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen.

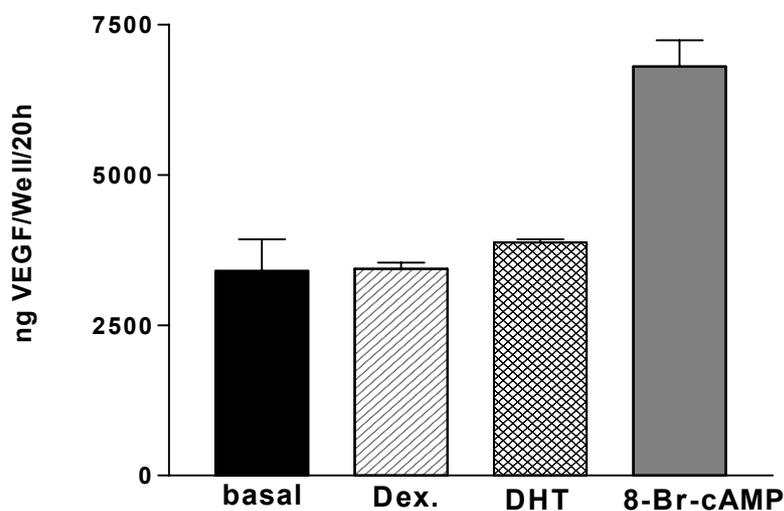
#### 4.3.4 Progesteron induziert die VEGF-Proteinproduktion

Die inhibierende Wirkung von AGT, sowohl auf die Biosynthese des Progesterons als auch auf die Sekretion des VEGF-Proteins, steht im Einklang mit den Ergebnissen auf transkriptioneller Ebene. Um entsprechend den Einfluss der Steroidhormone auf die VEGF-Proteinproduktion zu untersuchen, wurden MA-10-Zellen mit  $10^{-7}$  M Dihydroxytestosteron (DHT),  $10^{-7}$  M Dexamethason (Dex) oder 10 µg/ml Progesteron (Prog) inkubiert. Anschließend wurde das ins Kulturmedium sezernierte VEGF-Protein quantifiziert. Das Ergebnis der Quantifizierungen zeigte, dass Progesteron auch die Sekretion des VEGF<sub>164</sub>-Proteins stimuliert (Abb. 25). Hingegen hatten die anderen Steroidhormone (DHT oder Dex) keine Effekte auf die Regulation der VEGF-Proteinexpression in MA-10-Zellen (Abb.26).



**Abb. 25 Einfluss von Progesteron auf die Expression des VEGF-Proteins in MA-10-Zellen**

Quantitative Bestimmung des aus MA-10 Zellen ins Kulturmedium sezernierten VEGF<sub>164</sub>-Proteins. Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium bei 36 °C in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 10 µg/ml Progesteron beziehungsweise 1 mM 8-Br-cAMP für 20 h behandelt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen. \*\*\*P<0.001, im Vergleich zum Basalwert.



**Abb. 26 Einfluss von Dex und DHT auf die Expression des VEGF-Proteins in MA-10-Zellen**

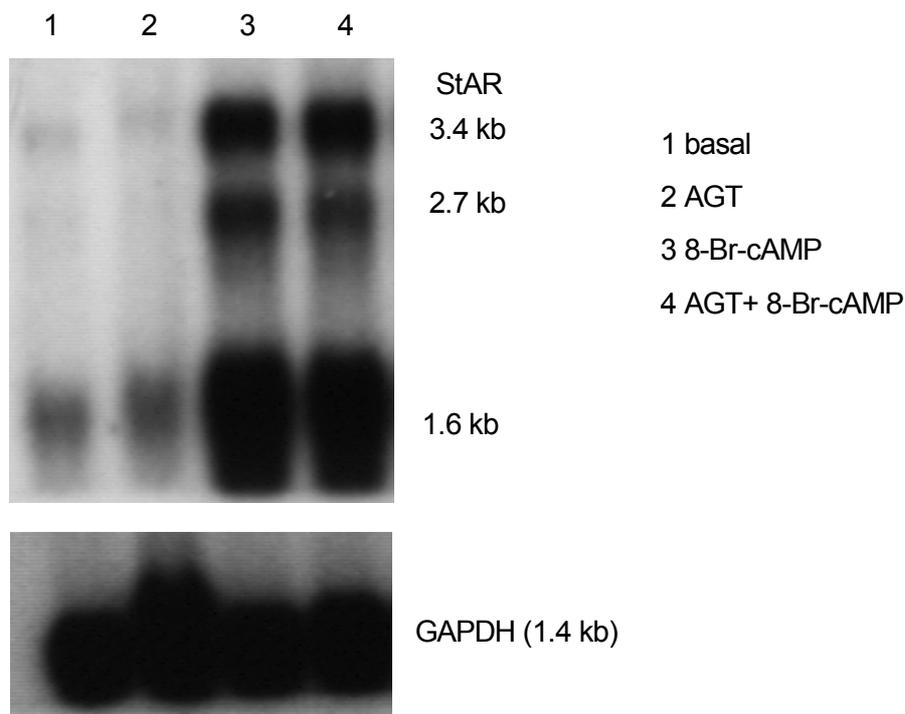
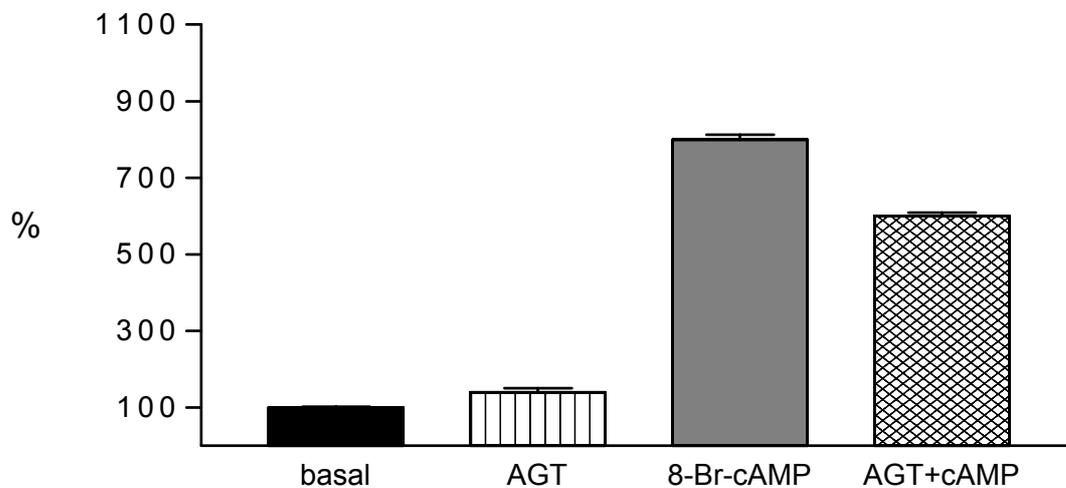
Quantitative Bestimmung des aus MA-10 Zellen ins Kulturmedium sezernierten VEGF<sub>164</sub>-Proteins. Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium bei 36 °C in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 10<sup>-7</sup> M Dex., 10<sup>-7</sup> M DHT beziehungsweise 1 mM 8-Br-cAMP für 20 h inkubiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen.

#### **4.4 Regulation der StAR-Genexpression durch das Steroidhormon Progesteron**

##### **4.4.1 Aminoglutethimid, ein Inhibitor der Steroidhormon-Biosynthese, inhibiert die StAR-mRNA-Expression**

Das StAR-Gen wird direkt durch cAMP induziert. Zur Untersuchung, ob AGT eine Wirkung auf die cAMP stimulierte StAR-Expression ausüben kann, wurde die entsprechende Untersuchung wie bei VEGF durch Northernblot-Analyse mit einer StAR-spezifischen Sonde durchgeführt.

Das Ergebnis zeigt ebenfalls die Anwesenheit von Transkripten im unstimulierten Zustand und eine 20 %ige Inhibition der durch 8-Br-cAMP stimulierten StAR-Genexpression in Anwesenheit von AGT (Abb. 27 A und 27 B). Es wurden wie erwartet drei starke Hybridisierungssignale von 1.6, 2.7 und 3.4 kb (Abb. 27 A) detektiert.

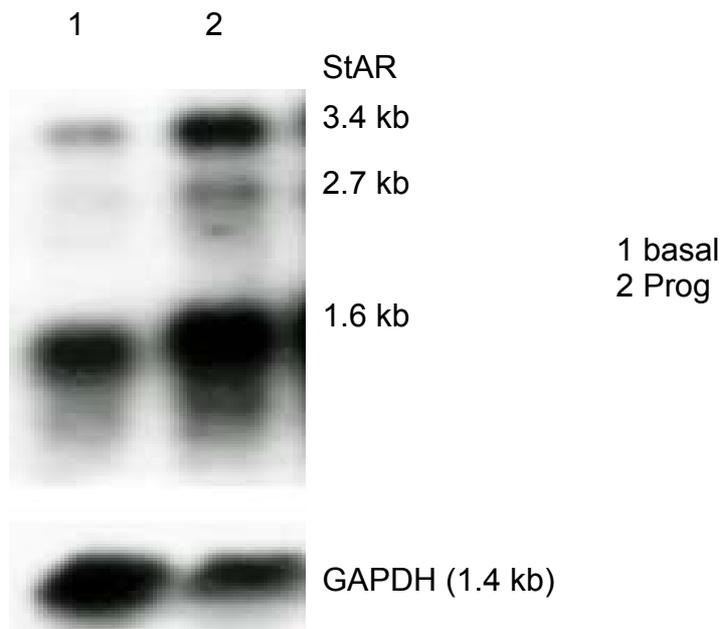
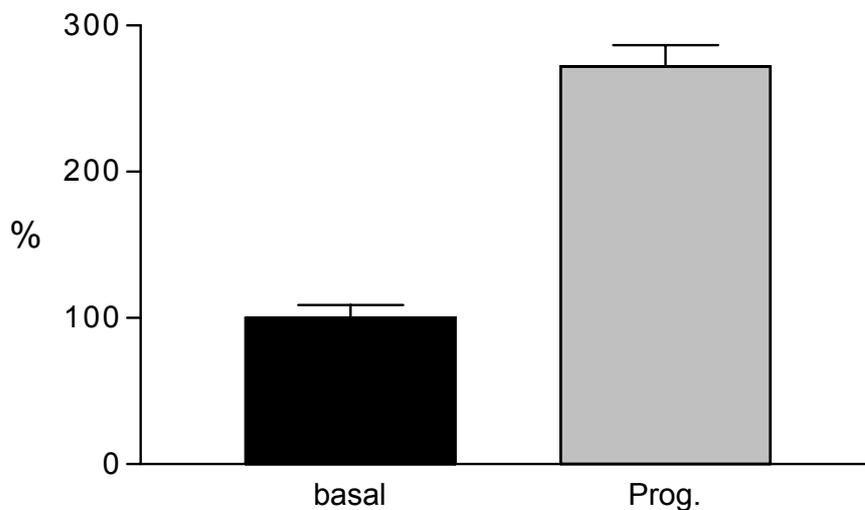
**A****B**

**Abb. 27 Einfluss von AGT und 8-Br-cAMP auf die StAR-Genexpression in MA-10-Zellen**

A: Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 5  $\mu\text{g/ml}$  AGT und/oder 1 mM 8-Br-cAMP für 20 h bei 36  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. RNA wurde isoliert und jeweils 20  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA pro Spur für Northern Blot-Analysen mit einer StAR-Sonde verwendet. Dieselbe Membran wurde auch mit einer GAPDH-Sonde als Kontrolle hybridisiert. B: Quantifizierung der Signale (3.4 kb, 2.7 kb und 1.6 kb) durch densitometrische Auswertung, wobei der basale Wert willkürlich auf 100% gesetzt wurde. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen.

#### **4.4.2 Effekt der Steroidhormone auf die StAR-Genexpression**

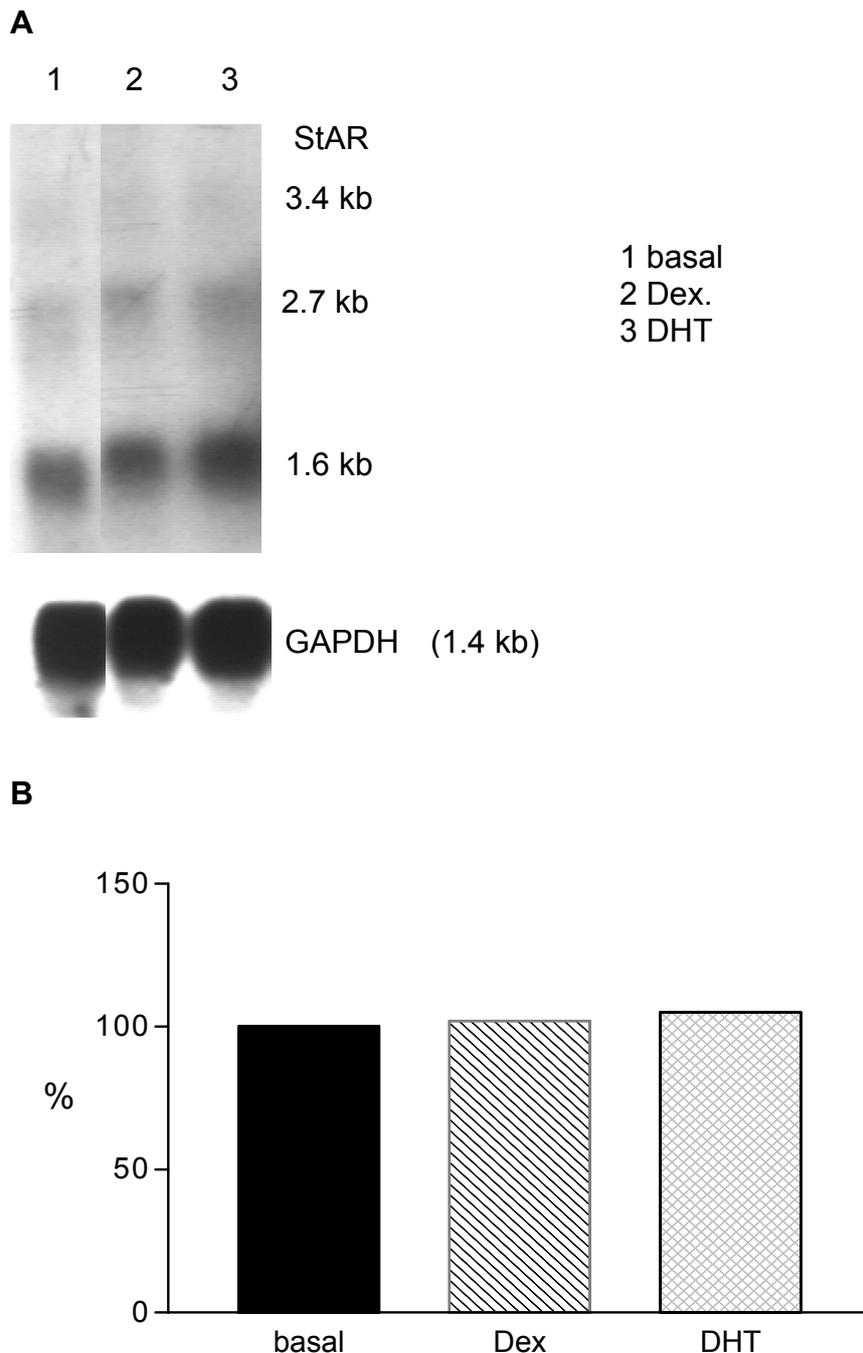
Wie schon zuvor die Regulation der VEGF-Expression durch verschiedene Steroidhormone wurde auch die StAR-Expression durch ein Steroidhormon (10 µg/ml Progesteron) induziert. Es wurden drei starke Hybridisierungssignale von 1.6, 2.7 und 3.4 kb der StAR-Transkripte detektiert (Abb. 28 A). Die densitometrische Auswertung der Transkripte zeigte, dass eine etwa dreifache Erhöhung der StAR-mRNA-Expression durch Progesteron (Abb. 28 B) vorlag.

**A****B****Abb. 28 Einfluss von Progesteron auf die StAR-Genexpression in MA-10-Zellen**

A: Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von 10  $\mu\text{g/ml}$  Prog. für 20 h bei 36  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. RNA wurde isoliert und jeweils 20  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA pro Spur für Northern Blot-Analysen mit einer StAR-Sonde verwendet. Dieselbe Membran wurde auch mit einer GAPDH-Sonde als Kontrolle hybridisiert. B: Quantifizierung der Signale (3.4 kb, 2.7 kb und 1.6 kb) durch densitometrische Auswertung, wobei der basale Wert willkürlich auf 100% gesetzt wurde. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen. \*\*\* $P < 0.001$ , im Vergleich zum Basalwert.

Wie zuvor bei VEGF wurde auch bei StAR der Einfluss verschiedener Steroidhormone auf die Expression mit Hilfe von Northern Blots und einer StAR-spezifischen Sonde untersucht.

Die Untersuchung zeigte, dass die Steroidhormone DHT und Dex im Konzentrationen von  $10^{-7}$  M im Gegensatz zu Progesteron keinen Einfluss auf die StAR-Genexpression hatten. Zur Kontrolle wurde die Transkriptmenge in unstimulierten Zellen mit der in den hormonbehandelten verglichen (Abb. 29 A und B).



**Abb. 29 Einfluss von Dex und DHT auf die StAR-Genexpression in MA-10-Zellen**

A: Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium in Abwesenheit (basal) oder Anwesenheit von  $10^{-7}$  M Dex. beziehungsweise  $10^{-7}$  M DHT für 20 h bei  $36^{\circ}\text{C}$  inkubiert. RNA wurde isoliert und jeweils 20  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA pro Spur für Northern Blot-Analysen mit einer StAR-Sonde verwendet. Dieselbe Membran wurde auch mit einer GAPDH-Sonde als Kontrolle hybridisiert. B: Quantifizierung der Signale (3.4 kb, 2.7 kb und 1.6 kb) durch densitometrische Auswertung, wobei der basale Wert willkürlich auf 100% gesetzt wurde. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von jeweils 3 Versuchen.

#### 4.5 Analyse des VEGF-Promotors der Maus

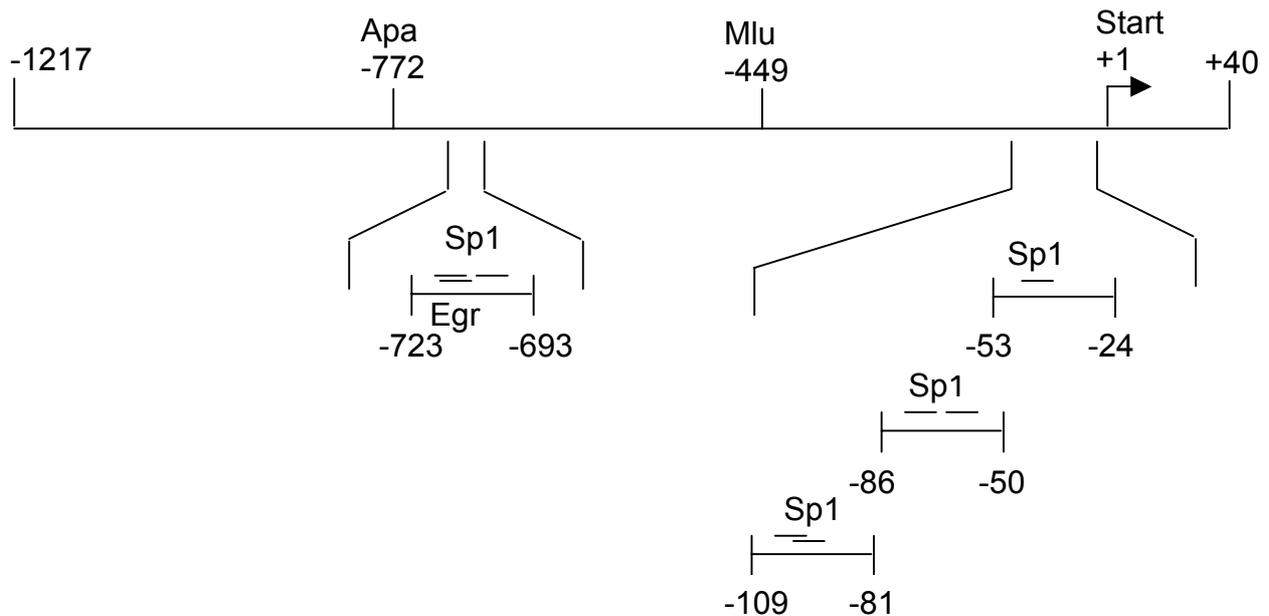
Bis jetzt konnte die hormonelle Regulation der VEGF-Expression in MA-10 Leydig-Zellen auf mRNA- und Protein-Ebene mit Hilfe von Northern-Hybridisierung und ELISA-Analysen nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, welche Regionen im Promotor zur Aktivierung der VEGF-Expression führen und welche Transkriptionsfaktoren an der Stimulation beteiligt sind, werden in diesen Abschnitt funktionelle Assays (Transfektionen) und Bindungsanalysen (Gelshifts/EMSAs) beschrieben.

Promotoranalysen zeigen, dass der murine VEGF-Promotor potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, AP-2, AP-1, HIF-1, NF- $\kappa$ B, GCN-4, RAP-1, Egr und Gata-1 enthält. Eine 1.2-kb lange 5'-flankierende Region des murinen VEGF-Gens besitzt Promotoraktivität (Shima et al., 1996). Weitere Analysen über die Regulation des VEGF-Promotors der Maus wurden bis jetzt jedoch nicht durchgeführt.

Abb. 29 zeigt die Homologie zwischen den Sequenzen -294/+12 des humanen und -250/+12 des murinen Promotorbereichs. Die Region -40/-135 des humanen Promotors spielt in der basalen wie auch in der aktivierten Expression, die durch die Transkriptionsfaktoren Sp1, Sp3 und Ap2 vermittelt wird, eine wichtige Rolle.



**Abb. 29** Vergleich der Sequenzen der 5'-flankierenden Region des humanen (h) und murinen (m) VEGF-Gens, basierend auf dem Programm Wilbur-Lipman DNA Alignment. Identische Basen sind zwischen den beiden Sequenzen dargestellt. Potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, Egr-1, AP-2, NF-κB und Oct-1 sind schattiert und wurden durch das Programm AliBaba (Universität Magdeburg) ermittelt. Der Pfeil kennzeichnet die Startstelle. Die Sequenzen -109/-81, -86/-50 und -53/-24, die für die Gelshift-Analysen verwendet wurden, sind fett gedruckt.



**Abb. 30 Schematische Darstellung des murinen VEGF Promotors**

Die Restriktionsstellen für die Enzyme Apa und Mlu und die potentiellen Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Egr sind eingezeichnet.

#### 4.5.1 Funktionelle Analyse des VEGF-Promotors

Gemäss den Ergebnissen auf transkriptioneller Ebene (Northern Blot-Analysen) und auf Proteinebene (ELISA) können cAMP und Progesteron die VEGF-Expression stimulieren. Deshalb war es interessant zu untersuchen, wo (welche Bereiche) und wie (über welche Transkriptionsfaktoren) 8-Br-cAMP und Progesteron den Promotor aktivieren können.

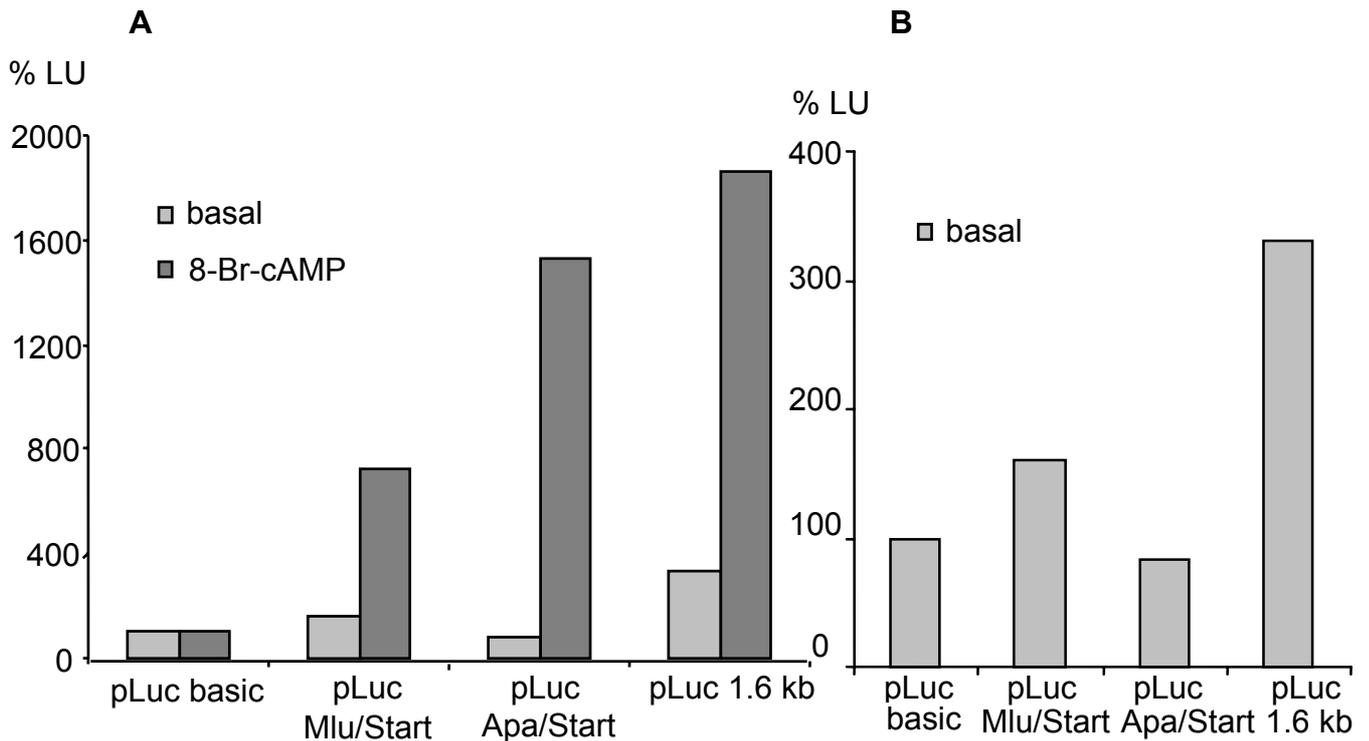
In den Transfektionsversuchen wurden die folgenden Reporterplasmide (Abb. 30) verwendet, die freundlicherweise von Prof. P.A. D'Amore (1996) zur Verfügung gestellt wurden:

- pLuc-basic, das promotorlose Luciferase-Reporterplasmid pGL2,
- pLuc 1.6 kb, das Luciferase-Reporterplasmid mit dem klonierten 1.6 kb langen Fragment des VEGF 5'-Gens (-1217 bis +400), das die 1.2 kb lange 5'-flankierende Sequenz, die Transkriptionsstartstelle und 0.4 kb der 5'-untranslatierten Region enthält (Shima et al. 1996) (Abb. 30),
- pLuc Apa/Start, das Luciferase-Reporterplasmid mit dem klonierten 5'-deletierten Fragment von -772 bis +400 (Shima et al. 1996) (Abb.30),

- und pLuc Mlu/Start, das Luciferase-Reporterplasmid mit dem klonierten 5'-deletierten Fragment von -449 bis +400 (Shima et al. 1996) (Abb. 30).

Für den Transkriptionsassay wurden  $4.5 \times 10^5$  MA-10-Zellen mit den verschiedenen oben genannten Reporterkonstrukten und dem Kontrollplasmid, das das Gen für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase enthält, mit Hilfe von Lipofektamin für 6 h transfiziert (s. Kap. 3.2.14.1). Danach wurden die transfizierten Zellen in serumfreiem Medium für 6 h mit 1 mM 8-Br-cAMP stimuliert. Schließlich wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Luciferaseaktivität in einem Luminometer gemessen (Kap. 3.2.14.2). Um Schwankungen in der Transfektionseffizienz in den einzelnen Ansätzen auszugleichen, wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Proben gemessen. Die Luciferase-Messergebnisse wurden mit Hilfe der  $\beta$ -Galaktosidase-Resultate für jeden einzelnen Ansatz normalisiert (Kap. 3.2.14.3).

Der in Abb. 31 A dargestellte transiente Transfektionsversuch zeigt die durch 8-Br-cAMP induzierten Promotoraktivitäten aller drei Reporterplasmide pLuc Mlu/Start (-449/+400), pLuc Apa/Start (-772/+400) und pLuc 1.6 kb (-1217/+400) im Vergleich zur basalen Induktion der Plasmide in MA-10-Zellen. Daneben zeigt Abb. 31 B einen vergrößerten Auszug der basalen Aktivitäten aus Abb. 31 A, wobei pLuc Mlu/Start gegenüber dem promotorlosen Luciferase-Konstrukt pLuc basic zu einer 1.5-fach und pLuc 1.6 kb zu einer 3.5-fach erhöhten basalen Luciferase-Aktivität führte, während pLuc Apa/Start gegenüber pLuc basic eine um 15 % und gegenüber pLuc Mlu/Start eine um 50 % erniedrigte basale Aktivität hervorrief (Abb. 31 B). Diese Daten zeigen, dass die Mlu/Start- und 1.6 kb/Apa-Regionen für die basale Aktivierung und die Apa/Mlu Region für die basale Repression der Transkription verantwortlich sind. Wie aus Abb. 31 A ersichtlich, nahm die Stärke der Stimulation durch 8-Br-cAMP kontinuierlich mit der Länge der Promotorfragmente zu. 8-Br-cAMP konnte somit auch die basale Repression der Region Apa/Mlu wieder aufheben. Transfektionsstudien mit den gleichen Reporterplasmiden und 50 ng/ml hCG als Stimulus zeigten ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 31 Funktionelle Analysen des murinen VEGF-Promotors:** Auswertung eines Transfektionsversuchs mit den Reporterplasmiden pLuc basic, pLuc Mlu/Start, pLuc Apa/Start und pLuc 1.6 kb und der anschließenden Stimulation der MA-10-Zellen mit 1 mM 8-Br-cAMP für 6 h (A). Vergrößerter Auszug der basalen Werte aus Diagramm A (B). Die Signale des Referenzplasmids pCMV LacZ, das das  $\beta$ -Galaktosidaseenzym kodiert, wurden für die Normalisierung der Variabilität in der Transfektionseffizienz benutzt. Die Aktivitäten sind relativ zu jener des pLuc basic Reporterplasmids, das willkürlich auf 100 % gesetzt wurde. Dieser Versuch wurde dreimal wiederholt.

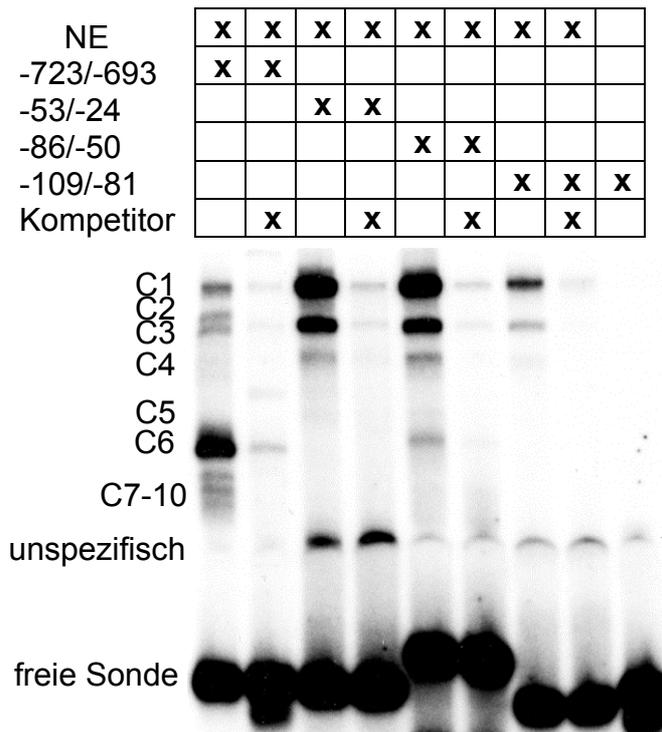
## 4.5.2 Bindungsanalysen am murinen VEGF-Promotor

### 4.5.2.1 Untersuchung der Bindungsaktivität des VEGF-Promotors

Um die Bindungsaffinität der verschiedenen Promotorregionen, die potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Egr enthalten, zu analysieren, wurden EMSAs (Electrophoretic Mobility Shift Assay) mit vier verschiedenen Sequenzen, -53/-24, -86/-50, -109/-81 und -723/-693 (Abb. 30), des Maus-VEGF-Promotors durchgeführt.

Für die Gelshiftassays wurden die radioaktiv markierten Sonden mit Kernprotein von MA-10-Zellen inkubiert, bevor die DNA/Protein-Komplexe auf einem 6 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden. Zur Kompetition wurde ein Überschuss der jeweiligen nicht markierten Sequenz hinzugefügt (Kap. 3.3.2). Mit jeder Promotorregion konnte eine spezifische konstitutive Bindung des Kernextrakts detektiert werden.

Abb. 32 zeigt zwei prominente DNA/Protein-Komplexe, C1 und C3, die mit den Sequenzen -53/-24 und -86/-50 gebildet wurden. Im Vergleich zu diesen beiden Regionen zeigt die Region -109/-81 nur schwache Bindungsaktivität, was mit der überlappenden Sp1-Bindungsstelle erklärt werden könnte (siehe auch Abb. 30). Hingegen zeigt die Bindungsreaktion mit der promotorfernen Sequenz -723/-693 zusätzlich einen prominenten C6 Komplex und vier kleinere und schneller wandernde Komplexe C7-10.



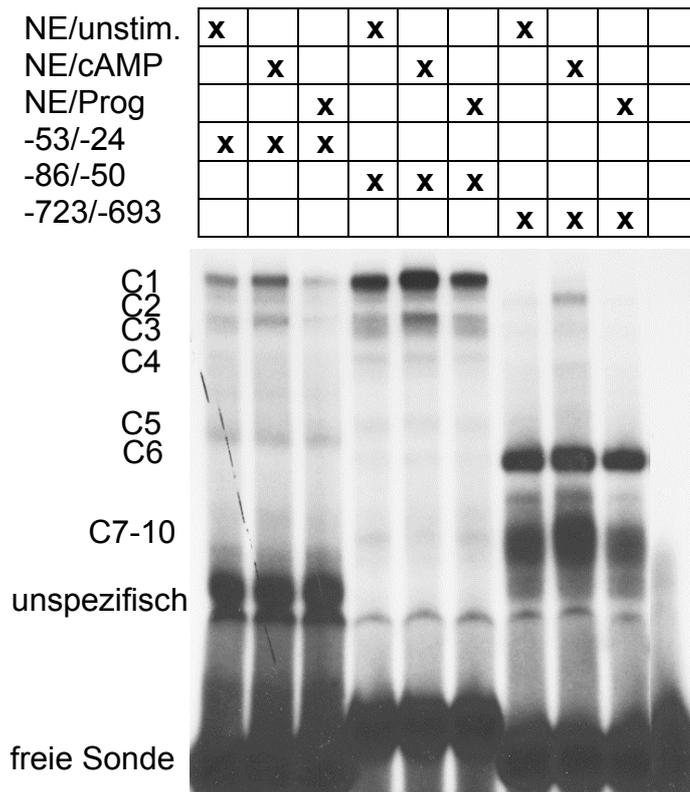
**Abb. 32 Bindung zwischen Kernprotein und verschiedenen Regionen des VEGF Promotors**

Für Gelshiftstudien wurden verschiedene Promotorregionen (-723/-693, -53/-24, -86/-50 und -109/-81) mit 8  $\mu$ g Kernprotein von MA-10-Zellen (NE) inkubiert. Kompetitionen wurden jeweils mit 2500 fmol der gleichen Sequenz, jedoch nicht markiert, durchgeführt. C1, C2, C3, C4, C5, C6 und C7-10 kennzeichnen die spezifischen DNA/Protein-Komplexe. Die unspezifischen Banden konnten durch die Zugabe der jeweiligen Kompetitoren nicht verdrängt werden.

#### 4.5.2.2 Stimulation des VEGF-Promotors mit 8-Br-cAMP

Der Maus-VEGF-Promotor enthält weder ein cAMP-Response-Element noch eine Bindungsstelle für den Progesteronrezeptor. Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Promotorregionen mit 8-Br-cAMP oder Progesteron stimulierbar sind, wurden Kernextrakte von unbehandelten, mit 8-Br-cAMP oder Progesteron behandelten MA-10-Zellen mit den verschiedenen Promotorsequenzen inkubiert.

Die Auftrennung der DNA/Protein-Komplexe in einem Polyacrylamidgel (Abb. 33) zeigte, dass nach Stimulation mit 8-Br-cAMP die DNA/Protein-Komplexe C1 und C3 stärker auftraten als im unstimulierten Basalzustand. 8-Br-cAMP regulierte auch die an der Sequenz -723/-693 gebundenen C6- und C7-10-Komplexe auf. Hingegen war Progesteron nicht fähig, die Bindungsaktivität dieser Promotor-Fragmente zu stimulieren. Der jeweilige Kernextrakt stammte von MA-10-Zellen, die für 6 Stunden mit 8-Br-cAMP oder Progesteron stimuliert wurden. Wurde Kernextrakt von MA-10-Zellen, die für 20 Stunden mit diesen Substanzen stimuliert worden waren, für Gelshift-Experimente verwendet, konnte keine Stimulation der Faktoren C1, C3, C6 und C7-10 durch 8-Br-cAMP beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Stimulation durch 8-Br-cAMP auf mRNA- und Protein-Ebene, denn nach 20 Stunden erreichte die mit 8-Br-cAMP stimulierte VEGF-Expression ein Plateau.



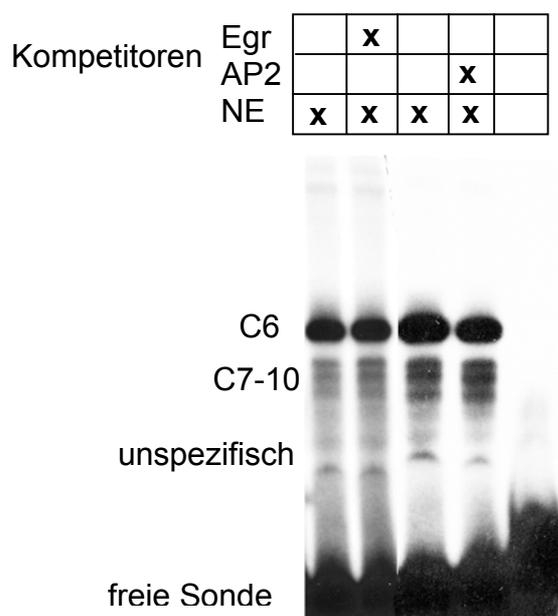
**Abb. 33 Einfluss von 8-Br-cAMP und Progesteron auf die Bindung des Kernproteins an die verschiedenen Promotorregionen**

Für Gelshiftstudien wurden verschiedene Promotorregionen (-723/-693, -53/-24 und -86/-50) mit 8 µg Kernprotein von unstimulierten und von 6 h mit 1 mM 8-Br-cAMP oder 10 µg/ml Progesteron stimulierten MA-10-Zellen (NE) inkubiert. C1, C2, C3, C4, C5, C6 und C7-10 kennzeichnen die spezifischen DNA/Protein-Komplexe.

#### 4.5.2.3 Untersuchung der Bindungsaktivität in der distalen Promotorregion (-793/-693)

Um zu untersuchen, welche Transkriptionsfaktoren an die distale Sequenz binden, wurde zur Bindungsreaktion zwischen der radioaktiven Sonde -723/-693 und dem Nuklearextrakt aus unstimulierten MA-10-Zellen ein Überschuss an Kompetitoren, die die Konsensussequenz für die Transkriptionsfaktoren Egr oder AP-2 enthalten, hinzugefügt. Diese Konsensussequenzen wurden deshalb als Kompetitoren eingesetzt, da die distale Region Sequenzen enthält, die den Bindungsstellen für die Faktoren Egr und AP-2 ähnlich sind.

Diese Untersuchungen zeigten, dass beide Konsensusmotive für Egr und AP-2 nicht mit den gebildeten Komplexen C6 bzw. C7-10 kompetitieren konnten. Diese Komplexe enthalten daher wahrscheinlich weder Egr noch AP-2 (Abb. 34).



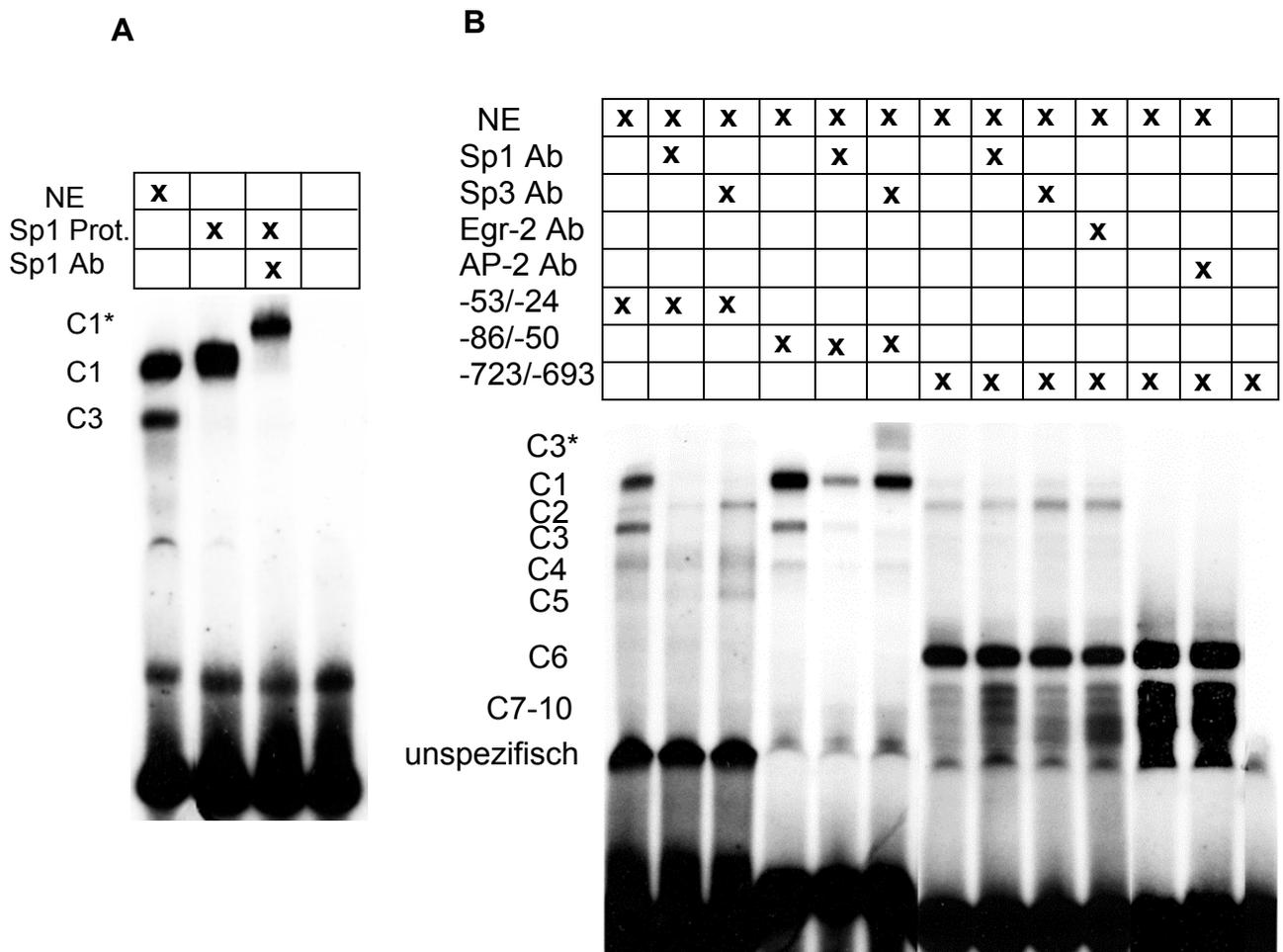
**Abb. 34** Wettbewerbsstudien mit den Konsensus-Sequenzen für die Faktoren Egr und AP-2

Für Gelshiftstudien wurde die distale Promotorregion (-723/-693) mit 8  $\mu$ g Kernprotein von MA-10-Zellen (NE) inkubiert. Kompetitionen wurden jeweils mit 2500 fmol der Konsensus-Sequenz für Egr-2 oder AP-2 durchgeführt. C6 und C7-10 kennzeichnen die spezifischen DNA/Protein-Komplexe.

---

#### **4.5.2.4 Analyse der Transkriptionsfaktoren, die an die proximale und die distale Promotorregion binden**

Um zu untersuchen, ob die Komplexe C1 und C3, die an Sequenzen mit potentiellen Bindungsstellen für die Proteine Sp1 und Sp3 binden, tatsächlich diese Proteine enthalten, wurden vergleichende Gelshift-Studien mit rekombinantem Sp1 und Supershift-Studien mit Antikörper gegen Sp1 und Sp3 durchgeführt. Abb. 35 A zeigt, dass die Bindungsreaktion zwischen rekombinantem Sp1-Protein und der Sequenz -86/-50 einen verzögerten Komplex bildet, der mit dem C1-Komplex exakt in gleicher Höhe wandert. Supershift-Studien mit spezifischen Antikörpern gegen Sp1 und Sp3 (Abb. 35 B) zeigen, dass der C1-Komplex Sp1 und der C3-Komplex Sp3 enthält. Die Komplexe C6 und C7-10, die keine Konkurrenz mit den Konsensussequenzen für die Faktoren Egr und AP-2 zeigten, reagierten auch nicht mit einem spezifischen Antikörper gegen Egr-2 beziehungsweise AP-2.



**Abb. 35 Supershift-Experimente mit Antikörpern gegen Sp1, Sp3, Egr-2 und AP-2**

A: Für die Gelshiftstudie wurde die radioaktiv markierte Promotorregion -53/-24 mit 8 µg Kernprotein von MA-10-Zellen (NE) oder mit rekombinantem Sp1-Protein inkubiert. Der Supershift wurde mit einem spezifischen Antikörper (Ab) gegen das rekombinante Protein Sp1 erzielt.

B: Die Gelshiftstudien wurden mit verschiedenen Promotorregionen (-723/-693, -53/-24 und -86/-50) und Kernextrakt aus unstimulierten MA-10-Zellen durchgeführt. Dass die Supershifts mit den spezifischen Antikörpern gegen Sp1 und Sp3 gebildet wurden, ist an den schwächeren Komplexen ersichtlich. Die Supershifts selbst sind teilweise nicht sichtbar, da sie wegen ihrer Größe in den Geltaschen hängen geblieben sind. C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7-10, C1\* (Supershift von Sp1) und C3\* (Supershift von Sp3) kennzeichnen die spezifischen DNA/Protein-Komplexe.

## 5. Diskussion

### 5.1 Regulation der VEGF-mRNA-Expression und -Proteinsynthese durch cAMP und Progesteron

In vorhergehenden Studien wurde durch unsere Arbeitsgruppe das Expressionsmuster von VEGF und seiner Rezeptoren im humanen Hoden analysiert. Ergün et al. (1995) zeigten, dass VEGF und seine Rezeptoren in Leydig- und Sertoli-Zellen exprimiert werden. Wir erweiterten diese Analysen für Maus und Ratte, die ein ähnliches Expressionsmuster zeigen. Shweiki et al. (1993) konnten die VEGF-Expression in Maus-Leydig-Zellen durch *in situ*-Hybridisierung nachweisen. Weiterhin konnte in Granulosazellen aus Rinderovarien demonstriert werden, dass durch die Stimulation der Adenylatzyklase die Expression von VEGF auf transkriptioneller Ebene erhöht wird (Garrido et al., 1993). Christenson et al. (1997) beschrieben, dass LH/hCG bei Primaten *in vivo* direkt die VEGF-Expression sowohl in nicht luteinisierten als auch in luteinisierten Granulosazellen regulieren. Chasalow et al. (1979) beschrieben, dass hCG sowohl die Produktion des Testosterons als auch die Konzentration des cAMPs im Hoden induziert, und demonstrierten eine Erhöhung der cAMP- und Testosteron-Konzentration durch hCG in Leydig-Zellen nach zwei Stunden.

Die Steroidbiosynthese wird in Leydig-Zellen durch LH stimuliert, dabei bindet LH an seine G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die Wechselwirkung zwischen LH und dem LH-Rezeptor führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase in der Zelle. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP. Der intrazelluläre „second messenger“ cAMP leitet dann das Signal in der Zelle weiter, indem er an die Proteinkinase A (PKA) bindet und die PKA dadurch aktiviert. Die PKA phosphoryliert dann einige zelluläre Proteine, z. B. verschiedene Transkriptionsfaktoren. Dies führt zur Promotoraktivierung und Genexpression und schließlich zur Aufregulierung der Steroidbiosynthese in Leydig-Zellen (Dufau, 1984).

Um zu überprüfen, ob in Leydig-Zellen hCG neben der Stimulation der Steroidbiosynthese auch eine Wirkung auf VEGF hat, wurden MA-10-Zellen mit hCG und cAMP stimuliert. Zeitkinetik-Experimente zeigten einen deutlichen Anstieg

sowohl der VEGF-Transkripte als auch des aus den Zellen sezernierten VEGF-Proteins bereits nach 4 Stunden. Dies bedeutet, dass hCG die Expression von VEGF über die cAMP/PKA-abhängige Signalkaskade stimulieren kann.

Da hCG/LH und cAMP die Hauptregulatoren der Steroidbiosynthese in Leydig-Zellen sind, war es interessant zu untersuchen, ob cAMP die VEGF-Genexpression direkt oder indirekt über die Stimulation von Steroidhormon induziert. AGT, ein Steroidbiosynthesehemmer, welcher das P450<sub>scc</sub>-Enzym inhibiert und die Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon blockiert, inhibiert damit die Progesteron-Produktion in MA-10-Zellen. Meine vorliegende Untersuchung der Genexpression zeigt, dass AGT nicht nur die Progesteron-Produktion inhibieren konnte, sondern auch im kleineren Ausmaß die cAMP-stimulierte VEGF-Produktion auf transkriptioneller und Proteinebene hemmt. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass die Steroidbiosynthese auch einen Einfluss auf die Synthese von VEGF hat. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Regulation der VEGF-Expression auch von der Steroidhormonbildung in Leydig-Zellen abhängig sein könnte.

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass VEGF auch durch Steroidhormone reguliert werden kann. So zeigten Levine et al. (1998), dass Androgene einen direkten Einfluss auf die Induktion der VEGF-Produktion in Prostatazellen haben. Sone et al. (1996) demonstrierten, dass Progesteron auch in kultivierten retinalepithelialen Zellen die VEGF-Expression induziert. Klekamp et al. (1997) beschrieben, dass Dexamethason in den glatten Muskelzellen der Lunge die durch Hypoxie induzierte VEGF-Expression auf transkriptioneller Ebene hemmt. Meine Beobachtungen zeigten, dass nur Progesteron, jedoch nicht andere Steroide wie Testosteron oder Dexamethason, die VEGF-Expression stimulieren konnten. Da Leydig-Zellen keinen konventionellen Nukleärrezeptor für Progesteron besitzen, muss der Wirkungsmechanismus, über den Progesteron das VEGF-Gen aktiviert, näher analysiert werden. Möglicherweise übt Progesteron seine Wirkung über einen neuen membrangebundenen Rezeptor aus (El-Hefnawy et al., 2000).

Durch Northern Blot-Analyse konnte ich drei VEGF-Transkripte, die der zu erwartenden Größe der VEGF-Splicevarianten (VEGF<sub>188</sub>, VEGF<sub>164</sub> und VEGF<sub>120</sub>)

entsprachen, detektieren. Die Hauptisoform davon ist VEGF<sub>164</sub>. Zusätzlich konnte ich noch ein weiteres VEGF-mRNA-Transkript beobachten, das möglicherweise die VEGF-Isoform VEGF<sub>145</sub> sein könnte, die Poltorak et al. (1997) als eine neue VEGF-Isoform charakterisierten. Diese VEGF<sub>145</sub>-Isoform kommt ebenso selten vor wie VEGF<sub>206</sub>. VEGF<sub>145</sub> wird sowohl in weiblichen als auch in männlichen Reproduktionsorganen (Burchardt et al. 1999) exprimiert. Es hat die gleiche Affinität zu Heparin wie das humane VEGF<sub>165</sub>. VEGF<sub>145</sub> induziert die endotheliale Zellproliferation und Angiogenese *in vivo*, ferner die Permeabilität der Blutgefäße. Somit hat VEGF<sub>145</sub> einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub> (Poltorak et al. 1997). Vermutlich ist VEGF<sub>145</sub> weniger aktiv als VEGF<sub>165</sub>, da diese Isoform anstelle des Exons 7 das Exon 6 enthält (Kondo et al. 1995). Diese Variabilität der Exons 6 und 7 zwischen VEGF<sub>145</sub> und VEGF<sub>165</sub> führt zu einer Konformationsänderung des VEGF-Protein/Rezeptorkomplexes und zur Änderung in der Aktivität von VEGF (Keyt et al. 1996). Durch meine Resultate konnte ich zeigen, dass VEGF<sub>145</sub> durch cAMP und Progesteron stimuliert wird und diese Isoform auch in Leydig-Zellen eine Rolle spielen könnte.

## 5.2 Regulation des VEGF-Promotors

Durch Northern Blot-Analyse und ELISA konnte ich auf transkriptioneller sowie Proteinebene zeigen, dass in die Regulation der VEGF-Expression der „second messenger“ cAMP und das Steroidhormon Progesteron involviert sind. Im zweiten Teil meiner Untersuchung erfolgt eine Studie über den VEGF-Promotor der Maus, um die Rolle von cAMP und Progesteron in der Genexpression näher zu analysieren. Da bisher keine Studien über die Regulation des Maus-VEGF-Promotors durchgeführt wurden, beschreiben meine Daten zum ersten Mal die Regulation des Maus-Promotors und ergänzen diejenigen des humanen VEGF-Promotors.

Durch Promotor-Sequenzanalysen, Kompetitionen und Supershift-Experimente mit spezifischen Antikörpern konnten die Transkriptionsfaktoren, die an den Promotor binden, näher charakterisiert werden. Durch Transfektionassays konnte bestimmt werden, welche Promotorregion in der Regulation des VEGF-Gens eine Rolle spielt.

### 5.2.1 Zusammenfassung der Literatur über die Expression des humanen VEGF-Promotors

Der humane VEGF-Promotor enthält Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-2, Sp1 und Sp3 (Tischer et al., 1991) und zusätzlich Bindungsstellen für AP-1 und HIF-1 (Levy et al. 1995, Forsythe et al. 1996). Verschiedene Substanzen und Zustände stimulieren die Expression von VEGF, so z.B. cAMP, Steroidhormone, Glucose, Hypoxie, Kobaltionen, Stickstoffoxid (NO), Wachstumsfaktoren und Zytokine. Analysen des humanen VEGF-Promotors identifizierten eine GC-reiche Region zwischen Position 85 und 50 stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle mit drei potentiellen Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, die mit zwei Egr-1/AP-2 Stellen überlappen. Gel-Shift und Antikörper-Supershift-Experimente zeigten, dass sowohl Sp1 als auch Sp3 konstitutiv an diese Region binden. Zudem konnte in PDGF-induzierten NIH3T3-Zellen eine erhöhte VEGF-Genexpression festgestellt werden. Die Bindung von Sp1 und Sp3 erfolgte an dieser Sequenz (Finkenzeller et al. 1997). Gille et al. (1997) konnten beschreiben, dass der Transkriptionsfaktor AP-2 der Hauptfaktor in der Stimulation des humanen Promotors durch TGF- $\beta$  in A431-Zellen ist. Sie zeigten auch, dass Sp1 am Promotor konstitutiv bindet. Yoshida et al. (1997) demonstrierten, dass Sp1 für die Stimulation der VEGF-Transkription durch TNF- $\alpha$  erforderlich ist. Milanini et al. (1998) berichteten, dass die Region zwischen -88 und -66 konstitutiv die Transkriptionsfaktoren Sp1 und AP-2 bindet und dass die Aktivierung der p42/p44-MAP-Kinase die Bindung dieser Faktoren erhöht. Die Wechselwirkung zwischen dem ligandaktivierten Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) und dem Transkriptionsfaktor Sp3 als trimeres Protein mit der Region -66/-47 führte zur geringeren VEGF-Transaktivierung (Stoner et al. 2000). Zhang et al. (2000) definierten eine Region zwischen -135 und -48 im VEGF-Promotor, die für die Inhibition der VEGF-Promotoraktivität durch das Wild-Typ-Protein p53 in Sarcomazellen notwendig war. Der Transkriptionsfaktor Sp1 ist an dieser Repression des Promotors beteiligt. Eine HIF-1 Bindungsstelle zwischen -985 und -939 induzierte die VEGF-Expression nach der Stimulation durch Hypoxie (Forsythe et al. 1996). Der humane VEGF-Promotor enthält vier Motive für den AP-1-Faktor an den Positionen -621, -1521, -2265 und -2930. In Keratinocyten ist nur die Position -621 funktionell und verantwortlich für die durch TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) vermittelte VEGF-Expression (Diaz et al. 2000).

Zusammenfassend zeigen die obigen Befunde, dass die proximale Promotorregion (-90/-50) für die basale und induzierte Transkription des humanen VEGF-Gens verantwortlich ist. Diese GC-reiche Region wird konstitutiv durch die Proteine Sp1, Sp3 und AP2 gebunden. Die Stimulation dieser Sequenz mit Zytokinen, Steroiden und MAP-Kinase führt zu einer weiteren Aktivierung der Genexpression, die durch entsprechende Transkriptionsfaktoren vermittelt wird (Tabelle III).

Promotorregion	Faktoren	Regulation durch	Ref.
-85/-50	Sp1, Sp3	PDGF	Finkenzeller et al. (1997)
-88/-65	AP-2	TGF- $\beta$	Gille et al. (1997)
	Sp1	TNF- $\alpha$	Yoshida et al. (1997)
-88/-66	Sp1, AP-2	p42/p44 MAP Kinase	Milanini et al. (1998)
-66/-47	ER $\alpha$ , Sp3	Östrogen	Stoner et al. (2000)
-135/-48	Sp1	P 53 (wt)	Zhang et al. (2000)
-635/-614	HIF	Hypoxie	Forsythe et al. (1996)
-985/-939	AP-1	TPA	Diaz et al. (2000)

**Tabelle III** Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse in der Literatur über die Regulation des humanen VEGF Promotors.

### 5.2.2 Regulation des murinen VEGF-Promotors

Durch meine Bindungsstudien mit den Sequenzen -53/-24 und -86/-50 konnte ich zeigen, dass beide Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 konstitutiv an die proximale VEGF-Promotorregion in MA-10-Zellen binden. Zudem wurde ein Sequenz- und Transkriptionsfaktoren-Vergleich mit dem humanen Promotor erstellt, welcher eine basale Regulation in dieser Region zeigte. Zusätzlich konnte ich nachweisen, dass 8-Br-cAMP die VEGF-Transkription stimulieren konnte, die durch die größere

Bindungsaktivität von Sp1 und Sp3 an diese Promotorregion zwischen -109 und -24 vermittelt wurde. Die durch cAMP stimulierte Bindungsaktivität von Sp1 und Sp3 konnte nur für 6 Stunden beobachtet werden, was in guter Übereinstimmung mit der Stimulation durch 8-Br-cAMP auf mRNA- und Protein-Ebene ist, da nach 20 Stunden die mit 8-Br-cAMP stimulierte VEGF-Expression ein Plateau erreicht.

Der Transkriptionsfaktor AP-2 spielt in der Regulation des proximalen Promotors des humanen VEGF-Gens eine bedeutende Rolle. AP-2 hat ein Molekulargewicht von 50 kDa (s. Kap. 2.7.3 Tabelle I) und könnte im DNA/Protein-Komplex C5 enthalten sein. Der DNA/Protein-Komplex C5 entstand mit der Sequenz -86/-50. Eine Aufregulierung dieses Komplexes durch 8-Br-cAMP und Progesteron konnte jedoch nicht beobachtet werden, und es scheint, dass dieser Faktor in der Regulation des murinen VEGF-Promotors nicht eine solche bedeutende Rolle wie in der Expression des humanen VEGF-Gens spielt.

Die distale Promotorregion -723/-693 besteht zu 75 % aus Cytosin und enthält zwei putative *cis*-aktive Elemente für den Transkriptionsfaktor Sp1, wobei das 5'-Element mit der Bindungsstelle für den Faktor Egr überlappt. Diese Region ist ebenfalls in die zelluläre cAMP-Antwort involviert. Kompetitionen mit einem Konsensusmotiv für die Egr-Protein-Familie und für das AP-2 Protein und Supershift-Analysen mit einem spezifischen Antikörpern gegen Egr-2 und AP-2 zeigten, dass in den Komplexen C6 und C7-10 weder Egr noch AP-2 enthalten ist. Weitere Untersuchungen müssen durchgeführt werden, um die Faktoren, die an diese Region binden, näher zu charakterisieren.

Meine Transfektionsstudien bestätigten die Resultate der Promotorstudien, die zeigten, dass 8-Br-cAMP diese proximale Region stimuliert. Zusätzlich ergaben die funktionellen Analysen eine schwächere basale Aktivierung des Reporterplasmids Luc-Apa/Start im Vergleich zum Luc-Mlu/Start-Vektor in MA-10-Zellen. Von diesen Daten kann abgeleitet werden, dass die Apa/Mlu-Region für die basale Repression verantwortlich ist. In diesem Promotorbereich liegt die cytosinreiche Sequenz -723/-693 mit dem *cis*-aktiven Element für Sp1 und dem mit Sp1 überlappenden Egr-Element. Attraktive Kandidaten für die Repression wären die Egr-Proteine. Huang et al. (1997) berichteten, dass die Funktion von Egr-1 in der Herunterregulierung

bestimmter Promotoren durch die Konkurrenz mit Sp1 für die Bindung an eine Sequenz, die ein mit dem Sp1-Motiv überlappendes Egr-1-Motiv hat, erklärt werden kann. Dies könnte auch hier der Fall sein, da der Komplex C6 die Bindung von Sp1 und Sp3 an die cytosinreiche Region verdrängt und deshalb eine Herunterregulierung dieses Promotorbereichs bewirkt. Die Mitglieder der Egr-Familie scheiden aber wahrscheinlich aus, teilweise durch ihr Molekulargewicht (s. Kap. 2.7.3 Tabelle I) und durch die fehlende Konkurrenz des Egr-Konsensusmotivs mit dem DNA/Protein-Komplex und dem fehlenden Supershift mit einem spezifischen Antikörper gegen Egr. Weitere Analysen sind notwendig, um die Faktoren, die für die basale Repression verantwortlich sind, zu bestimmen und zu klären, ob die Repression überhaupt durch diese Region erfolgt. Die mit Progesteron durchgeführten Promotoranalysen ergaben, dass dieses Steroid die Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1, Sp3 und der Faktoren C6 und C7-10 an ihre Sequenz nicht verstärken konnte. Welche Promotorregion und welche Faktoren Progesteron stimuliert, bedarf einer weiteren Untersuchung.

### **5.3 Regulation der StAR- und 3 $\beta$ -HSD-mRNA-Expression in MA-10-Zellen**

Northern Blot- und PCR-Studien in MA-10-Zellen zeigten, dass hCG und cAMP nicht nur die VEGF-Expression, sondern auch die StAR-Expression stimulieren.

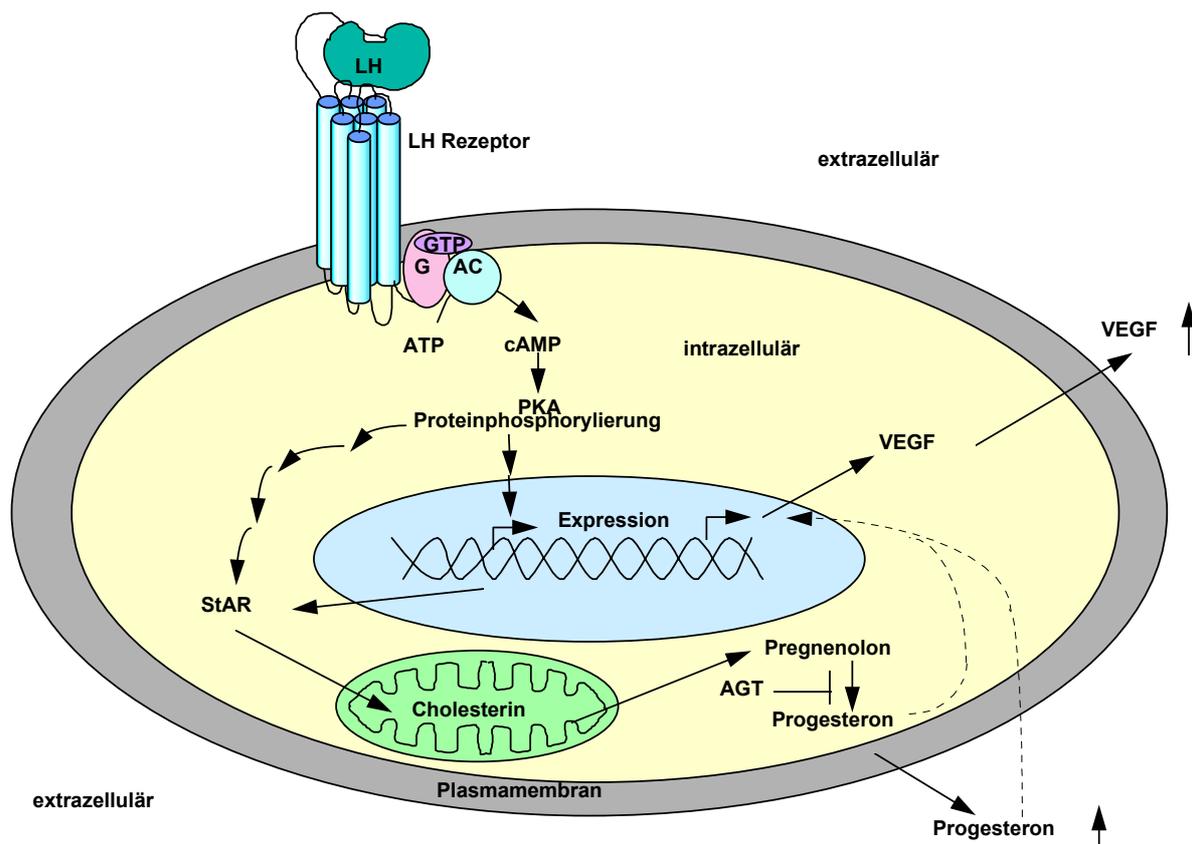
Eine Aufregulierung aller drei StAR-mRNA Transkripte von 3.4, 2.7, und 1.6 kb (Clark et al., 1994) konnte in MA-10-Zellen beobachtet werden. Clark et al. (1997) berichteten, dass die Expression des StAR-Proteins innerhalb von 30 min mit hCG bzw. cAMP stimuliert und eine maximale Sättigung innerhalb von 4 Stunden erreicht wird. Meine Ergebnisse bestätigten diese Beobachtungen und zeigten zusätzlich eine weitere Zunahme der StAR-Expression nach 20 Stunden. Progesteron induziert wie bei VEGF auch die StAR-mRNA-Expression, dagegen haben andere Steroidhormone wie Dexamethason oder Dihydroxytestosteron keine Einwirkung auf die Regulation der StAR-Genexpression in MA-10-Zellen. Da cAMP zusätzlich die StAR-Expression aufreguliert und dies folglich die Progesteronproduktion in MA-10-Zellen erklärt, hat dieses auch eine positive Rückkopplung auf die VEGF-Expression.

Während das Gonadotropinhormon einen stimulatorischen Effekt auf die Expression von VEGF und StAR hatte, wurde die Expression von 3 $\beta$ -HSD, die für die Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron verantwortlich ist, durch hCG bzw. cAMP gehemmt. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchung einer anderen Arbeitsgruppe. Tang et al. (1998) beschrieben, dass die 3 $\beta$ -HSD-mRNA-Expression durch hCG inhibiert wird. Zwei Isoformen von 3 $\beta$ -HSD werden in Leydig-Zellen exprimiert, wobei die Isoform I durch das Gonadotropinhormon reguliert wird, während dieses Hormon keinen Einfluss auf die Isoform II hat. Die Beobachtungen in meiner Studie bestätigten, dass die Expression der 1.8 kb langen Isoform I durch hCG bzw. cAMP gehemmt wird. Tang et al. (1998) erklärten diesen inhibitorischen Effekt von hCG auf die 3 $\beta$ -HSD-Transkription durch einen negativen Rückkoppelungsmechanismus, wahrscheinlich um ein Überschießen der Steroidproduktion zu verhindern. Wie bereits oben erwähnt, stimuliert cAMP die StAR-Proteinsynthese. Dies führt zu einem verstärkten Transport von Cholesterin an die innere Mitochondrienmembran. Nach der Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon wird Pregnenolon durch die 3 $\beta$ -HSD in Progesteron umgewandelt. Jedoch reduziert cAMP die Transkription von 3 $\beta$ -HSD. Während cAMP eine positive Rückkoppelung auf die StAR-Expression hat, hat es eine negative Rückkoppelung auf die 3 $\beta$ -HSD, die einen Schritt später an der Steroidbiosynthese beteiligt ist, wahrscheinlich um eine ausbalancierte Feinregulation der Progesteronsynthese zu erreichen.

Ich führte keine vergleichende Untersuchung über den StAR-Promotor durch, da ausführliche Analysen bereits durch mehrere Arbeitsgruppen gemacht wurden. Für die basale Aktivierung des VEGF-Promotors scheint Sp1 ein wichtiger Regulator zu sein. SF-1 ist ein wichtiger basaler Regulator der StAR-Expression (Jhang et al., 1996; Carlone et al., 1997) und im Gegensatz zu Sp1 wird SF-1 nicht durch cAMP reguliert (Caron et al. 1997). Eine AP-1 ähnliche Bindungsstelle zeigt auch die basale transkriptionelle Aktivität (Reinhart et al. 1999; Silvermann et al. 1999). Beide Promotoren, sowohl der des VEGF- als auch der des StAR-Gens, werden durch cAMP reguliert. Im Vergleich zum VEGF-Promotor, der keine cAMP-Response-Elemente aufweist, besitzt der StAR-Promotor eine proximale cAMP-regulierte Region, die durch C/EBP $\beta$ , GATA 4 und noch nicht identifizierte Transkriptionsfaktoren reguliert wird (Christenson et al. 1999; Clavia et al. 2000).

#### 5.4 Regulation von VEGF durch die von der Proteinkinase A abhängigen Signal-Kaskade

Wie in Abb. 36 dargestellt, stimuliert LH/hCG die Steroidbiosynthese durch die von der cAMP- abhängigen Proteinkinase A (PKA) vermittelten Signalkaskade in Leydig-Zellen. Die Bindung von hCG an einen G-Protein-gekoppelten LH-Rezeptor aktiviert die Adenylatzyklase und führt zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Der „second messenger“ cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene die StAR-Expression reguliert. Das neusynthetisierte StAR-Protein transportiert Cholesterin von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran. Dort wird Cholesterin durch das Enzym P450 scc in Pregnenolon umgewandelt. AGT, ein Steroidbiosyntheseinhibitor, kann diesen Schritt der Umwandlung und damit die Progesteronproduktion hemmen. Pregnenolon wird weiter in Progesteron wie auch in Testosteron und Glucocorticoid umgewandelt. Wie cAMP-stimuliertes Progesteron die VEGF-Expression aktiviert, ist unbekannt und muss weiter untersucht werden (Abb 36). Zusätzlich hat cAMP direkt einen Einfluss auf die VEGF-Genexpression. Da sich jedoch kein cAMP-Response-Element im VEGF-Promotor befindet, reguliert cAMP wahrscheinlich die *de novo*-Synthese eines Transkriptionsfaktors, der dann an den VEGF-Promotor bindet.



**Abb 36 Die Signalkaskade in MA-10-Zellen**

Die nähere Beschreibung der schematischen Darstellung siehe obigen Text

## 5.5 Physiologische Bedeutung von VEGF im Hoden

VEGF diffundiert aus der Zelle und unterstützt die Permeabilität der Blutgefäße und sorgt dadurch möglicherweise für eine Erhöhung der Temperatur im Hoden. Diese Hypothese wird durch Befunde aus Untersuchungen an Mäusen unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von VEGF im Hoden zur Infertilität führt (Korpelainen et al., 1998). Vermutlich verursacht eine Zunahme der Dichte an Kapillaren eine komplette Arretierung der Spermatogenese. Diese Daten zeigen, dass VEGF bei der Spermatogenese eine wichtige Rolle spielen könnte und möglicherweise auch für die Aufrechterhaltung anderer testikulärer Funktionen zuständig ist.

Um die Wirkung von VEGF zu verstehen, ist es notwendig, die Regulation der VEGF-Expression im Hoden detailliert zu charakterisieren. Aus den vorliegenden

Untersuchungen wurden grundlegende Informationen gewonnen, die die Basis für eine wirtschaftliche Nutzung von VEGF oder eines synthetischen Agonisten bzw. Antagonisten bei der Kontrolle der männlichen Fertilität bzw. Sterilität liefern.

Weiterhin ist bei pathologischen Veränderungen, wie zum Beispiel bei Hodentumoren, ein Therapieansatz denkbar, bei dem die Wirkung von VEGF blockiert wird, das heißt, der Tumor soll keine ausreichende Blutversorgung erhalten, damit sein Wachstum inhibiert wird. Hierfür könnten Antagonisten von VEGF eingesetzt werden, die dafür sorgen, dass VEGF an den Zielzellen nicht wirken kann.

---

## 6. LITERATUR

Ascoli M. (1981) Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: Gonadotropin receptors and steroidogenic responses. *Endocrinology*. 108, 88-95

Austin CR, Short RV. (1979) *Mechanisms of Hormone Action*. Vol. 7, 65-79

Bacic M, Edwards NA, Merrill MJ. (1995) Differential Expression of VEGF/VPF Forms in Rat tissues. *Growth Factors*. 12, 11-15

Bergh A, Damber JE. (1992) Immunohistochemical demonstration of androgen receptors on testicular blood vessels. *Int J Androl*. 15, 425-434

Breier G, Albrecht U, Risau W. (1992) Expression of VEGF during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*. 114, 521-532

Breucker H. (1982) Seasonal Spermatogenesis in the Mute swan (*Cygnus olor*). *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*. Springer Verlag, Vol. 72

Burchardt T, Burchardt M, Chen MW, Buttyan R, de la Taille A, Shabsigh A, Shabsigh R. (1999) Expression of VEGF splice variants 144/145 and 205/206 in adult male tissues. *IUBMB Life*. 48, 405-408

Carlone DL, Richards JS (1997) Evidence that functional interactions of CREB and SF-1 mediate hormone regulated expression of the aromatase gene in granulosa cells and constitutive expression in R2C cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 61, 223-231

Caron KM, Ikeda Y, Soo SC, Stocco DM, Parker KL, Clark BJ. (1997) Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the StAR protein. *Mol Endocrinol*. 11, 138-147

Chapman JC, Waterhouse TB, Michael SD. (1992) Changes in mitochondrial and microsomal 3 $\beta$ -hSD activity in mouse ovary over the course of the estrous cycle. *Biol Reprod.* 47, 992-997

Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, Boocock CA, Smith SK. (1993) Identification and localization of alternately spliced mRNAs for VEGF in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod.* 48,1120-1128

Chasalow F, Marr H, Haour F, Saez JM, (1979) Testicular steroidogenesis after human chorionic gonadotropin desensitization in Rats. *J Biol Chem.* 254, 5613-5617

Cherradi N, Defaye G, Chambaz EM. (1994) Characterization of the 3 $\beta$ -hSD activity associated with bovine adrenocortical mitochondria. *Endocrinology (Baltimore).* 134, 1358-1364

Christenson LK, Johnson PF, McAllister JM, Strauss III JF (1999) CCAAT/enhancer – binding proteins regulate expression of the human STAR gene. *J Biol Chem.* 274, 26591-26598

Christenson LK, Stouffer RL (1997) FSH and LH/hCG stimulation of VEGF production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J Clin Endocrinology Metab.* 82, 2135-2142

Churchill PF, Kimura T. (1979) Topological studies of cytochromes P450<sub>ssc</sub> and P450<sub>11 $\beta$</sub>  in bovine adrenocortical inner mitochondrial membranes. *J Biol Chem.* 254, 10443-10448

Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. (1994) The purification, cloning and expression of a novel LH-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells: Characterization of the StAR. *J Biol Chem.* 269, 28314-28322

Clark BJ, Combs R, Hales KH, Hales DB, Stocco DM. (1997) Inhibition of transcription affects synthesis of StAR protein and steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Endocrinology*. 138, 4893-4901

Clavia R, Wootton K, Clark BJ (2000) SF-1 influences protein deoxyribonucleic acid interactions within the cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-responsive regions of the murine STAR protein gene. *Endocrinology*. 141, 1345-1355

Connoly D T, Heuvelman D M, Nelson R, Olander J V, Eppley B L, Delfino J J, Siegel N R, Leimgruber R M, Feder J. (1989) Tumor VPF stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*. 84, 1470-1478

Dixon RAF, Kobilka BK, Strader DJ et al. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian  $\beta$ -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*. 321, 75-79

Dvorak HF, Senger DR. (1991) Distribution of VPF (VEGF) in tumors: Concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med*. 174, 1275-1278

Dufau ML. (1988) Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. *Annu Rev Physiol*. 50, 483-508

El-Hefnawy T, Manna PR, Luconi M, Baldi E, Slotte JP, Huhtaniemi M. (2000) Progesterone action in a murine Leydig tumor cell line (mLTC-1), possibly through a nonclassical receptor type. *Endocrinology*. 141, 247-254

Ergün S, Stingl J und Holstein A. F. (1994) Microvasculature of the human testis in correlation to Leydig cells and seminiferous tubules. *Andrologia* 26, 255-262

Ergün S, Davidoff M, Holstein A. (1996) Capillaries of the lamina propria of human seminiferous tubule are partly fenestrated. *Cell Tissue Res*. 286, 93-102

Ergün S, Kilic N, Fiedler W, Mukhopadhyay AK. (1995) VEGF and its receptors in the human testicular tissue. Miniposter, 9th Eur. Workshop on Molecular and cellular

---

Endocrinology of the Testis, Gelio, Norway, c17

Ergün S. (1994) Immunhistochemischer Nachweis des Androgen- und Östrogen-Rezeptors an den Blutgefäßen des menschlichen Hodens. *Verh Anat Ges.* 176, 290

Ergün S. (1994) Funktionelle Bedeutung der Mikrovaskulatur des menschlichen Hodens. *Verh Anat Ges.* 176, 13

Ergün S, Kilic N, Fiedler W, Mukhopadhyay AK. (1995) VEGF and its receptors in the human testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 131, 9-20

Feinberg AP, Vogelstein B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuklease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 137, 266-267

Ferguson JJ. (1962) Puromycin and adrenal responsiveness to adrenocorticotropic hormone. *Biochim Biophys Acta.* 57, 616-617

Ferguson JJ. (1963) Protein synthesis and adrenocorticotropin responsiveness. *J Biol Chem.* 238, 2754-2759

Ferrara N, Davis-Smyth T. The Biology of VEGF. *Endocrine Rev.* (1997) 18, 4-25

Ferrara N, Henzel W J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 161, 851-858

Ferrara N, Houck K. (1992) Molecular and biological properties of VEGF family of Proteins. *Endocrin Rev.* 13, 18-32

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

Garren LD, Ney RL, Davis WW. (1965) Studies on the role of protein synthesis in the regulation of corticosterone production by ACTH *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 53, 1443-1450

Garren LD, Davis WW, Crocco RM. (1966) Puromycin analogs: Action of adrenocorticotrophic hormone and the role of glycogen. *Science*. 152, 1386-1388

Garrido C, Saule S, Gospodarowicz D (1993) Transcriptional Regulation of VEGF gene expression in ovarian bovine granulosa cells. *Growth Factors*. 8, 109-117

Ghinea N, Milgrom E. (1995) Transport of hormones through the vascular endothelium. *J Endocrinol*. 145, 1-9

Guo D, Jia Q, Song Hy, Donner D. (1995) VEGF promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell Proliferation. *J Biol Chem*. 270, 6729-6733

Gwynne JT, Mahaffee DD. (1989) Rat adrenal uptake and metabolism of high density lipoprotein cholesteryl ester. *J Biol Chem*. 264, 8141-8150

Hagen G, Müller S, Beato M, Suske G. (1994) Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO* 15, 3843-3851

Hartung S, Rust W, Balvers M, Ivell R. (1995) Molecular cloning and *in vivo* expression of the bovine StAR protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 215, 646-653

Haour F, Suez JM. (1977) hCG-dependent regulation of gonadotropin receptor sites: Negative control in testicular leydig cells. *Mol. Cell Endocrinol*. 7, 17-24

Heldin CH, Protein Tyrosine Kinase Receptors. *Cancer Surveys*. Cell Signaling. 27, 7-83

Holmes DS, Quigley M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*. 114,193-197

Houck KA, Leung DW, Ferrara N. (1992) Dual regulation of VEGF bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*. 267, 26031-26037

Huang RP, Fan Y, Ni Z, Mercola D, Adamson ED (1997) Reciprocal modulation between Sp1 and Egr-1. *J Cell Biochem.* 66, 489-499

Jefcoate CR, McNamara BC, Artemenko I, Yamazaki T (1992) ACTH regulation cholesterol movement in isolated adrenal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 43, 751-767

Jhang P, Mellon SH (1996) The orphan nuclear receptor SF-1 regulates the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated transcriptional activation of rat cytochrome P450c17. *Mol Endocrinol.* 10, 147-158

Joseph LJ, Le Beau MM, Jamieson GA Jr, Acharya S, Shows TB, Rowley JD, Sukhatme VP. (1988) Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 7164-7168

Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell.* 51, 1079-1090

Keith A, Houck KA, Ferrara N, Winer J. (1991) The VEGF family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 5, 1806-1814

Keyt B, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandeln R, Ferrara N. (1996) The carboxyl-terminal domain (111-165) of VEGF is critical for mitogenic Potency. *J Biol Chem.* 271, 7788-7795

Kiriakidou M, McAllister JM, Sugawara T, Strauss JF. (1996) Expression of StAR protein in the human ovary. *J Clin Endocrinology Metab.* 81, 4122-4128

Klagsbrun M, Soker S. (1993) VEGF/VPF: the angiogenesis factor found? *Current Biology* 3, 10

Klekamp JG, Jarzecka K, Hoover RL, Summar ML, Redmond N, Perrett EA. (1997) VEGF is expressed in ovine pulmonary vascular smooth muscle cells *in vitro* and regulated by hypoxia and dexamethason. *Pediatr Res.* 42, 744-749

Kondo S, Matsumoto T, Yokoyama Y, Ohmori I, Suzuki H. (1995) The shortest isoform of human VEGF/VPF 121 produced by *Saccharomyces cerevisiae* promotes both angiogenesis a permeability. *Biochim. Biophys. Acta.* 1243, 195-202

Korpelainen EI, Karkkainen MJ, Tenhunen A, Lakso M, Rauvala H, Vierula M, Parvinen M, Alitalo K. (1998). Overexpression of VEGF in Testis and Epididymis causes infertility in transgenic mouse evidence for nonendothelial targets for VEGF. *J Cell Biol.* 143, 1705-1712

Lacroix A, Ascoli M, Puett D, Mckenna TS. (1979) Steroidogenesis in hCG-responsive leydig cell tumor varients. *J Steroid Biochem.* 10, 669-675

Levine AC, Liu XH, Greenberg PD, Eliashvilli M, Schiff JD, Aaronson SA, Holland JF, Kirchenbaum A (1998) Androgens induce the expression of VEGF in human fetal prostatic fibroblasts. *Endocrinology.* 139, 4672-4678

Liscum L, Dahl NK. (1992) Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res.* 33, 1239-1254

Maglione D. et al. (1991) Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci. USA* 88, 9267-9271

Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P & Persico MG (1991) Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci. USA* 88, 9267-9271

Matsumoto A, Ishii S (1992) Atlas of endocrine organs. Springer-Verlag

Mayerhofer A, Bartke A. (1990) Developing Testicular Microvasculature in the Golden Hamster, *Mesocricetus auratus*: A Model for Angiogenesis under physiological Conditions. *Acta Anat* 139, 78-85

Milligan M J, Wakelam O, Kay J. (1989) *Biochemistry society symposium No. 56*, 81-84

Mukhopadhyay A K, Cobilanschi J, Schulze W, Brunswig-Spickenheier B, Leidenberger F A. (1995) Relevance of the tissue prorenin -renin-angiotensin system to male reproductive physiology. *Adv Exp Med Biol* 377, 269-277

Mustonen T, Alitalo K. (1995) Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol.* 129, 895-898

Neufeld G, Tessler S, Gitay-Goren H, Cohen T & Levi BZ (1994) VEGF & its receptors. *Progress in Growth Factor Res.* 5, 89-97

Park J E, Keller H E, Ferrara N. (1993) The VEGF Isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of ECM bound VEGF. *Mol Biol Cell.* 4, 1317-1326

Patwardhan S, Gashler A, Siegel MG, Chang L C, Joseph L J, Shows T B, Le Beau M M, Sukhatme V P. (1991) EGR3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene.* 6, 917-28

Payne A H, Hardy M P, Russell L D (1996) *The Leydig cell.* 1st Edition. Cache River Press

Peters K G. (1993) Vascular endothelial growth factor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci. USA* 90, 8915-8919

Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodaysky I, Keshet E, Neufeld G. (1997) VEGF<sub>145</sub>, a secreted VEGF isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem.* 272, 7151-7158

Purvis K, Torjesen P A, Haug E, Hanson V. (1977) hCG suppression of LH-receptors and responsiveness of testicular tissue to hCG. *Mol Cell Endocrinol.* 8, 73-80

Redmer D A, Dai Y, Li J, Charnock-Jones D S, Smith S K, Reynolds L P, Moor R M. (1996) Characterization and expression of VEGF in the ovine corpus luteum. *J Reprod Fertility.* 108, 157-165

Reinhart A J, Williams S C, Clark B J, Stocco D M (1999) SF-1 and C/EBP $\beta$  cooperate to regulate the murine StAR promoter. *Mol Endocrinol.* 13, 729-741

Rosnet O, Stephenson D, Mattei M G, Marchetto S, Shibuya M, Chapman V M, Birnbaum D. (1993) Close physical-linkage of the Flt1 and Flt3 genes on chromosome 13 in man and chromosome 5 in mouse. *Oncogene.* 8, 173-179

Saez J M. (1994) Leydig cells endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocrine Rev.* 15, 574-626

Sauer L A, Chapman J C, Dauchy R T (1994) Topology 3 $\beta$ -hSD / $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerase in adrenal cortex mitochondria and microsomes. *Endocrinology (Baltimore)* 134, 751-759

Schroeder F, Jefferson J R, Kier A B, Knittel J, Scallen T J, Wood W G, Hapala I. (1991) Membrane cholesterol dynamics: Cholesterol domains and kinetic pools. *Proc Soc Exp Biol Med.* 196, 235-252

Senger D R, Galli S J, Dvorak A M, Perruzzi C A, Harvey V S, Dvorak H F. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 219, 983-985

Sharpe R M. (1976) hCG-induced decrease in availability of rat testis receptors. *Nature*. 264, 644-646

Shifren J L, Doldi N, Ferrara N, Mesiano S and Jaffe R B. (1994) In the human fetus, VEGF is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: Implications for mode of action. *J Endocrinol Metabol*. 79, 316-322

Shima D T, Kuroki M, Deutsch U, Ng Y S, Adamis A P, D' Amore P A. (1996) The mouse gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271, 3877-3883

Shweiki D, Keshet E. (1992) VEGF induced by hypoxia may mediate hypoxia - initiated angiogenesis. *Nature*. 359, 843-845

Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Goren H, Keshet E. (1993) Patterns of expression of VEGF and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *The American Society for Clin Invest*. 91, 2235-2243

Silverman E, Eimerl S, Orly J (1999) C/EBP $\beta$  and GATA-4 binding regions within the promoter of the StAR gene are required for transcription in rat ovarian cells. *J Biol Chem*. 274, 17987-17996

Simpson E R, Boyd G S. (1966) The cholesterol side-chain cleavage system of the adrenal cortex: A mixed function oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 24, 10-17

Simpson E R, Boyd G S. (1967) The cholesterol side-chain cleavage system of the adrenal cortex. *Eur J Biochem*. 2, 275-285

Sone H, Okuda Y, Kawakami Y, Kondo S, Hanatani M, Matsuo K, Suzuki H, Yamashita K. (1996) Progesterone induces VEGF on retinal pigment epithelial cells in culture. *Life Sci*. 59, 21-25

Stocco D M, Clark B J. (1996) Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev*. 17, 221-224

Stone D, Hechter O. (1954) Studies on ACTH action in perfused bovine adrenals: Site of action of ACTH in corticosteroidogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 51, 457-469

Strosberg A D. (1996) G Protein coupled R7G receptors. *Cancer Surv Rev.* 27, 65-83

Sugawara T, Holt J A, Driscoll D, Strauss J F III, Lin D, Miller W L, Patterson D, Clancy K P, Hart I M, Clark B J, Stocco D M. (1995a) Human StAR protein: Functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 92, 4778-4782

Sugawara T, Lin D, Holt J D, Martin K O, Javitt N B, Miller WL, Strauss J F III (1995b) Structure of the human StAR protein gene: StAR stimulates mitochondrial cholesterol 27-hydroxylase activity. *Biochemistry.* 34, 12506-12512

Sulimovici S, Bartoov B, Lunenfeld B. (1973) Localization of 3 $\beta$ -hSD in the inner membrane subfraction of rat testis mitochondria. *Biochem Biophys Acta* 321, 27-40

Swillens S, Mercan D. (1990) Computer simulation of a cytosolic calcium oscillator. *Biochem J.* 271, 835-838

Tang P Z, Tsai-Morris C H, Dufau M L. (1998) Regulation of 3 $\beta$ -hSD in gonadotropin-induced steroidogenic desensitization of leydig cells. *Endocrinology.* 139, 4496-4505

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Bohlen P. (1992) Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for VEGF. *Biochem Biophys Res Commun.* 114, 521-532

Tisher E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes J, Abraham J. (1991) The human gene for VEGF. *J Biol Chem.* 266, 11947-11954

Tourtellotte WG, Nagarajan R, Bartke A, Milbrandt J. (2000) Functional compensation by Egr4 in Egr1-dependent luteinizing hormone regulation and Leydig cell steroidogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5261-5268

Townson S, Lagercrantz J, Grimmond S, Silins G, Nordenskjöld M, Weber G, Hayward N. (1996) Characterization of the murine VEGF-Related factor gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 220, 922-928

Ullrich A, Schlessinger J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell Rev.* 61, 203-212

Van Meer G. (1989) Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol.* 5, 247-275

Watermann M R. (1995) A Rising StAR: an essential Role in Cholesterol Transport. *Science* 267, 1780-1781

Wei M H, Popescu N C, Lerman M I, Merrill M J, Zimonjic D B. (1996) Localization of the human VEGF, at chromosome 6p12. *Hum Genet.* 97, 794-797

Whittle C, Gillespie K, Harrison R, Mathieson P W, Harper S J. (1999) Heterogeneous VEGF isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant. *Clin Sci.* 97, 303-312

Yago N, Ichii S. (1969) Submitochondrial distribution of components of the steroid 11- $\beta$ -hydroxylase and cholesterol side chain-cleavage enzyme systems in hog adrenal cortex. *J. Biochem. (Tokyo)* 65, 215-224

## 7. Abkürzungen und Glossar

### 7.1 Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CaCl	Kalziumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
cpm	Zählereignisse pro Minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
ds	doppelsträngig
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
f.c.	final concentration (Endkonzentration)
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
h	hour (Stunde)
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfat
IPTG	Isopropylthio-D-galaktosid

---

Kac	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LiCl	Lithiumchlorid
MCS	multiple Klonierungsstelle
MgCl	Magnesiumchlorid
MnCl	Manganchlorid
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NaOH	Natriumhydroxid
NaCl	Natriumchlorid
NAP-Puffer	Natriumphosphat-Puffer
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RLE	relative Lichteinheiten
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SH2	src homology region 2
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat-Puffer
STE	Natrium/Tris/EDTA-Puffer
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	Einheiten (Units)
UKE	Universitätskrankenhaus Eppendorf

ün	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galaktosid

## 7.2 Glossar

Antisense-Strang	zur mRNA komplementärer DNA-Strang
Antisense-Primer	der Sequenz des antisense-Stranges entsprechender Primer
Assay	Test/Untersuchung
Blotten	Übertragen von DNA/RNA auf Membranen
Blunt ends	nicht überhängende Enden eines doppelsträngigen DNA-Fragmentes nach Restriktionsverdau oder PCR mit entsprechenden Enzymen (glatte Enden)
Primer	Oligonukleotid, welches als Startermolekül für DNA-Polymerasen dient (Bsp.: PCR, reverse Transkription von RNA)
Sense-Strang	der mRNA entsprechende DNA-Strang
Sense-Primer	der Sequenz des sense-Stranges entsprechender Primer
Supershift	Retardierung eines Protein-DNA-Komplexes im Gel durch Zugabe von spezifischen Antikörpern. Dieser weist eine langsamere Laufgeschwindigkeit auf als der Protein-DNA-Komplex ohne Antikörper
Template	Matrizen-DNA
Tracer	Markiertes Zielprotein
Well	Vertiefung in einer Zellkulturplatte, auf welche in 6/12/24 Wells unterschiedliche Zellen getrennt von einander zur Transfektion bzw. ELISA ausgesät werden können

## **8. Danksagung**

Diese Arbeit wurde im Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg unter Anleitung von Dr. rer. nat. A. K. Mukhopadhyay angefertigt. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas, für die kritische Betreuung, Unterstützung und die Möglichkeit, die Ergebnisse zu präsentieren.

Mein Dank gilt ferner der Institutsleitung, Herrn Prof. Dr. med. F. Leidenberger, für die Ermöglichung und finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. J. Olcese und Herrn Prof. Dr. H. Bretting gebührt mein Dank für die freundliche Kooperation bzw. Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Bei Frau Dr. H. Schwarzenbach möchte ich mich für die anregenden Diskussionen und die experimentelle und fachliche Unterstützung bedanken.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Frau Birthe Willipinski-Stapelfeld, Frau Claudia Vollmers, Frau Gabriela Guidone, Frau Monika Kistler, Frau Dr. R. J. K. Anand, Herrn Björn Ehlers, Herrn Jörn Lübberstedt und Herrn Clemens Hayessen, bedanke ich mich ganz besonders für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. H. J. Paust, Herrn Dr. D. Müller, Frau Dr. B. Brunswig-Spickenheier, Frau Dr. L. Budnik, Frau Dr. J. Wessels, die mich bei meiner Arbeit durch Anregungen und experimentelle Anleitung sowie persönliche Gespräche unterstützt haben.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IHFs für die freundliche und kooperative Arbeitsatmosphäre bedanken.

**9. LEBENSLAUF**

Name	Gopa Chakrabarti
Privatanschrift	Pfenningsbusch 10 22081 Hamburg
Geburtsdatum	02.12.1967
Geburtsort	Kalkutta, Indien
Staatsangehörigkeit	Indisch
Familienstand	ledig
Schulbildung	1973-1983 Secondary Exam. 1983-1985 Higher Secondary Exam. (vergleichbar mit dem Abitur)
akademischen Ausbildung	1985-1987 B.Sc. (Bachelor of Science) Universität Kalkutta
Beschäftigung nach der Akademische Ausbildung	1988-1990 Tätigkeit als Lehrling bei der Firma Wipro India Limited, Indien
Studium	seit WS 1991 an der Universität Hamburg Studium der Biologie, Hauptfach: Genetik; Nebenfächer: Mikrobiologie, Humanbiologie
Diplomarbeit	02.01.1997-30.09.1997 Thema: VEGF-Expression im männlichen Fortpflanzungsgewebe
Promotion	ab 01.10.1997 in der Arbeitsgruppe von Dr. A. Mukhopadhyay am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg. Thema: Molekulare Charakterisierung der hormonellen Regulation von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) in der Maus Tumor-Leydig-Zelllinie MA-10