

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und
Gastroenterologie, Campus Virchow - Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Untersuchungen molekularer Mechanismen zur
transkriptionellen und epigenetischen Regulation des humanen
vegfr-3 - Gens am Zellmodell*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johannes Hertel

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt/Abstract	5
2. Einleitung	9
2.1 Angiogenese und Lymphangiogenese	9
2.2 Die Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) – Superfamilie	10
2.3 VEGF-Rezeptoren	13
2.3.1 VEGFR-1 und -2	13
2.3.2 VEGFR-3	16
2.3.2.1 Molekulare Struktur und Signaltransduktion des VEGFR-3	16
2.3.2.2 Die Rolle des VEGFR-3 in der Lymphangiogenese und Angiogenese	17
2.3.2.3 Bedeutung des VEGFR-3 in der Lymphangiogenese und Angiogenese von Karzinomen	19
2.3.2.4 Transkriptionelle Regulation des <i>vegfr-3</i> – Gens	23
3. Fragestellung	25
4. Material und Methoden	26
4.1 Zellkultur	26
4.1.1 Transiente Transfektionen	27
4.1.2 Transfektion mittels Kalziumphosphatpräzipitation	28
4.1.3 Transfektion mittels Effectene®	28
4.2 Molekularbiologische Methoden	29
4.2.1 Elektrophoretische Auftrennung von RNA und DNA-Fragmenten	29
4.2.2 Präparation von Total-RNA	29
4.2.3 Synthese von cDNA durch Reverse Transkription	29
4.2.4 Quantitative Real-Time RT-PCR (Taqman ®)	30
4.2.5 DNA-Konstrukte und Reporter-genplasmide	31
4.2.5.1 Klonierung von Promoterfragmenten in Reporter-genvektoren und Erstellung von Promotermutanten	31
4.2.5.2 Annealing von Oligonucleotiden	33
4.2.5.3 Phosphorylierung des Inserts	33
4.2.5.4 Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Aufreinigung des Leervektors. .	34
4.2.5.5 Ligation von Insert und Leervektor	34
4.2.5.6 Transformation von Plasmiden in <i>E.coli</i>	35
4.2.5.7 Plasmidpräparation mittels Mini-Prep©	35
4.2.5.8 Plasmidpräparation mittels Maxi-Prep©	35

4.2.6 Untersuchung von Zellen auf Mycoplasmenkontamination mittels PCR	36
4.2.7 Electro Mobility Shift Assay (EMSA)	36
4.2.7.1 Hybridisierung und radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	36
4.2.7.2 Präparation von Kernextrakten.	37
4.2.7.3 EMSA	37
4.2.8 Stimulationsexperimente mit TSA und 5-Aza dC	38
5. Ergebnisse	40
5.1 Strukturelle Charakteristika des <i>vegfr-3</i> – Promoters	40
5.1.1 Untersuchung der endogenen Expression des <i>vegfr-3</i> -Gens in endothelialen und epithelialen Zelllinien	40
5.1.2 Eingrenzung des funktionell relevanten Promoterbereichs durch Transfektionsstudien mit 5'-Deletionskonstrukten	40
5.1.3 Darstellung von Sp1 und Sp3 als bindende Transkriptionsfaktoren durch EMSA – Supershift – Studien	42
5.2 Funktionelle Analyse des proximalen <i>vegfr-3</i> – Promoters und der bindenden Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3.	42
5.2.1 Transkriptionelle Feinanalyse der funktionell relevanten Minimalsequenz durch Transfektionsstudien im heterologen Promotersystem pT81	42
5.2.2 Darstellung der funktionellen Relevanz der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 durch Transfektionsstudien in <i>D. melanogaster</i> SL-2	44
5.3 Einfluss der epigenetischen Regulationsmechanismen Methylierung und Acetylierung auf die Expression des <i>vegfr-3</i> – Gens in endo- und epithelialen Zelllinien	48
5.3.1 Untersuchung epigenetischer Regulation des <i>vegfr-3</i> -Gens durch Acetylierung	48
5.3.2 Untersuchung epigenetischer Regulation des <i>vegfr-3</i> -Gens durch Methylierung	50
5.3.3 Untersuchung des Einflusses von Acetylierung und Methylierung auf die Bindung von Sp1 und Sp3 an den <i>vegfr-3</i> - Promoter.	52
5.3.4 Untersuchung des Einflusses von Acetylierung und Methylierung auf die Transaktivierung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3	52
6. Diskussion	55
6.1 Sp-Faktoren und GC-reiche Promoterelemente	55
6.2 Vergleich der Promoterregionen der VEGF-Superfamilie	58
6.3 Sp-Faktoren in Karzinomen	60

6.4 Epigenetische Modifikation von Sp-Faktoren	60
7. Literaturverzeichnis	65
8. Abkürzungsverzeichnis	83
9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	85
10. Anhang	86
10.1 Eidesstattliche Versicherung	86
10.2 Anteilserklärung	87
10.3 Lebenslauf	88
10.4 Publikationsliste	90
10.5 Danksagung	91

1. Abstrakt

Einleitung: Angiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen, ist eine Voraussetzung für Wachstum und Disseminierung maligner Tumoren. Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) – Superfamilie konnte hierfür eine entscheidende Rolle zugeschrieben werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Tyrosinkinaserzeptor VEGFR-3 durch Bindung von VEGF-C und VEGF-D eine wichtige Funktion bei der Regulation von Lymphangiogenese und lymphatischer Metastasierung hat. Während eine Reihe regulierender Mechanismen für die Expression der Hämangiogenese-assoziierten Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 identifiziert wurden, sind die molekularen Vorgänge zur Kontrolle der *vegfr-3* – Genexpression noch nicht vollständig verstanden. **Methodik:** In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe waren 1,9kb des 5'-flankierenden Promoterbereichs des humanen *vegfr-3* – Gens kloniert und durch 5'-Deletionsanalysen ein GC-reiches, essentielles Promoterminimalelement identifiziert worden. Es wurden zwei GC-Boxen identifiziert, welche durch Zinkfingerproteine Sp1 und Sp3 gebunden und aktiviert werden. Nach der Ermittlung dieser strukturellen Charakteristika stand eine funktionelle Analyse der Bindungssequenzen und Transkriptionsfaktoren im Focus der vorliegenden Arbeit. Durch Mutation in den für die Bindung von Sp1/Sp3 notwendigen GC-Boxen und Klonierung des Minimalelements in das heterologe Promotersystem pT81 wurde die funktionelle Relevanz der GC-reichen Elemente untersucht, zudem wurde der Einfluss von Sp1/Sp3 in Überexpressionsstudien analysiert. Im zweiten Teil erfolgte eine Untersuchung des Einflusses epigenetischer Modifikationen durch Trichostatin A (TSA) – vermittelte HDAC-Inhibition und 5-Aza Desoxycytidin (5-Aza dC) - vermittelte DNA-Demethylierung auf die *vegfr-3* - Expression sowie auf die Transaktivierung von Reportergenkonstrukten. Zusätzlich wurde der Stimulationseffekt auf die Promoterbindung von Sp1/Sp3 in EMSA-Studien sowie auf die Transaktivierung von Sp1/Sp3 in Gal4-Sp1-/Gal-4-Sp3 – Luciferase – Assays untersucht. **Ergebnisse:** Selektive Mutationen des Minimalelements zeigten, dass beide GC-Boxen funktionelle Relevanz aufweisen, jedoch die 5'-mutierte Sequenz einen signifikant geringer abgeschwächten Effekt hat als das 3'-mutierte Konstrukt. In Überexpressionsstudien konnte sowohl Sp1 als auch Sp3 eine aktivierende Funktion hinsichtlich der *vegfr-3*-Promoterregulation zugeordnet werden. TSA verursachte eine Hochregulation von *vegfr-3* – mRNA sowie gesteigerte Transaktivierung von Reportergenkonstrukten.

Analog hierzu führte 5-Aza dC in Zelllinien ohne basale *vegfr-3* - Expression zu einer Hochregulation von *vegfr-3*, in basal exprimierenden Zelllinien blieb dies ohne Effekt. In EMSA - Studien hatten beide Inhibitoren keinen Einfluss auf die Bindungskapazität von Sp1 und Sp3, dagegen steigerten sie ihre Transaktivierungskapazität in Gal4-Sp1-/Gal4-Sp3 – Luciferase – Assays. **Schlussfolgerung:** Diese Studie beschreibt grundlegende molekulare Mechanismen der transkriptionellen Regulation des *vegfr-3* – Gens und zeigt, dass Histonacetylierung und CpG – Methylierung wichtige Kontrollmechanismen der *vegfr-3* – Expression darstellen. Sie trägt so zu einem besseren Verständnis der Rolle des *vegfr-3* – Gens in der Tumorbilogie bei und könnte helfen, neue Interventionsstrategien zur Beeinflussung von tumorassoziierter Lymphangiogenese und/oder lymphatischer Metastasierung zu entwickeln.

Abstract

Introduction: Angiogenesis, the formation of new blood vessels from endothelial precursors, is a prerequisite for growth and dissemination of solid malignancies. Multiple studies found a decisive role for the vascular endothelial growth factor (VEGF) superfamily. Previous works revealed that tyrosine kinase vegf receptor – 3 (VEGFR-3) regulates lymphangiogenesis and lymphatic metastasis through binding of VEGF-C and VEGF-D. While a variety of molecular mechanisms regulating the expression of the hemangiogenesis linked receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 have been identified, the molecular components by which *vegfr-3* gene expression is controlled are not fully understood. **Methods:** In previous works of our group 1.9kb of 5'-flanking DNA of the human *vegfr-3* gene were cloned and a GC-rich promoter element was identified being essential for *vegfr-3* transcription. Two GC-boxes were found which are bound and activated by zinc finger proteins Sp1 and Sp3. Following these structural findings the present work focused on a functional analysis of the binding sequences and transcription factors. By selective mutation of the Sp1/Sp3 binding GC-boxes and cloning of the minimal element into heterologous promoter system pT81 the functional relevance of the GC-rich elements and Sp1/Sp3 were analysed. Moreover the influence of Sp1/Sp3 was analysed in overexpression studies in drosophila SL-2 cells. Secondly, an investigation of the influence of epigenetic modifications on *vegfr-3* expression was executed. Effects of Trichostatin A (TSA) – mediated HDAC – inhibition and 5-Aza desoxycytidine (5-Aza dC) - mediated promoter demethylation on *vegfr-3* – mRNA expression and transactivation of *vegfr-3* reporter gene constructs were analysed. Moreover their influence was analysed on promoter binding of Sp1/Sp3 in EMSA studies and transactivation of Sp1/Sp3 in Gal4-Sp1-/Gal4-Sp3 – luciferase – assays. **Results:** Selective sequence mutation of the minimal promoter element revealed that both GC-boxes have functional relevance, showing a significantly weaker attenuation of transcriptional activity for the 5'-mutated than for the 3'-mutated construct. Overexpression studies showed activating functions of both Sp1 and Sp3 at the *vegfr-3* promoter. TSA led to an up-regulation of mRNA levels and transactivation of reporter gene constructs. Similarly, 5-Aza dC reactivated *vegfr-3* expression in basally non-expressing cell lines whereas stimulation remained effectless in cell lines basally expressing *vegfr-3*. Both inhibitors had no effect on promoter binding capacities of Sp1 and Sp3 in EMSA studies but increased their transactivating capacity in Gal4-Sp1-/Gal4-Sp3-luciferase assays. **Conclusion:** This study describes profound molecular

mechanisms regulating *vegfr-3* transcription and demonstrates that histone acetylation and CpG methylation are important control determinants of *vegfr-3* expression. It contributes to a better understanding of the role of *vegfr-3* within tumor biology and may help to develop new intervention strategies influencing tumor associated lymphangiogenesis and/or lymphatic metastasis.

2. Einleitung

2.1 Angiogenese und Lymphangiogenese

Angiogenese und Lymphangiogenese, die Bildung von neuen Blut- und Lymphgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen, beschreiben physiologische Prozesse, die jedoch auch Voraussetzung für Wachstum und Metastasierung maligner Erkrankungen sind (1, 2). Hierbei wird der vascular endothelial growth factor (VEGF) – Superfamilie endothelialer Wachstumsfaktoren ein entscheidender Einfluss auf die tumorbezogene Angiogenese und Lymphangiogenese zugeschrieben (1, 2).

Die Untersuchung der Lymphangiogenese wurde lange Zeit durch das Fehlen spezifischer Marker zur Unterscheidung zwischen Lymph- und Blutendothelien erschwert. Obwohl bereits Hippocrates von „weißem Blut“ sprach, identifizierte Gasparo Aselli im Jahr 1627 Lymphgefäße zuerst als „milchige Venen“. 1902 postulierte Florence Sabin, dass initiale Lymphsäcke durch Ausknospung von embryonischen Venen entstünden, welche später sich im Körper zum Lymphgefäßsystem ausbreiteten. Dagegen gab es andere Vermutungen von Huntington und McClure, nach denen erste Lymphgefäße unabhängig in den Organen bildeten und im Verlauf Anschluss an das venöse System erhielten (Übersicht: (3)). Erst in der näheren Vergangenheit wurde durch die Entdeckung spezifischer Marker die eindeutige Identifizierung von Lymphendothelien ermöglicht. Hierunter fallen unter anderem der Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 (VEGFR-3) (4) sowie seine Liganden VEGF-C (5, 6) und VEGF-D (7, 8), auf die im Verlauf dieser Arbeit näher eingegangen werden soll. Darüber hinaus bestehen in LYVE-1, einem Homolog des CD44-Glykoproteins, welches als lymphspezifischer Rezeptor für Hyluronan identifiziert wurde (9), Prox-1, einem Homeobox-Gen-Produkt, welches in die Regulation der frühen lymphatischen Entwicklung involviert ist (10) sowie Podoplanin, einem glomerulären podocytären Membranprotein (11), spezifische Markermoleküle für Lymphendothelien. Diese Möglichkeiten zur Identifizierung von lymphatischen Endothelien haben zu einem neuen Modell der frühen Entwicklung des Lymphsystems geführt. Am Embryonaltag 8,5 (E8,5) zeigen alle Endothelzellen der Kardinalvenen lymphatische Kompetenz durch Expression der lymphendotheliealen Marker VEGFR-3 und LYVE-1. Um den Tag E9,5 – E10,5 erfolgt die Stimulation einer Untergruppe der Endothelzellen der Kardinalvenen zur Expression von Prox-1. An E11,5 sprossen diese Zellen aus und wandern zur Bildung der initial rudimentären Lymphsäcke aus. Diese knospenden

lymphendothelialen Vorläuferzellen verändern daraufhin ihr Genexpressionsprofil und nehmen einen lymphendothelialen Phänotyp durch Expression lymphatischer und Runterregulation blutendothelialer Marker an. Prox-1 – negative Zellen dagegen verlieren ihre Expression von VEGFR-3 und LYVE-1, um einen blutendothelialen Phänotyp anzunehmen (Übersicht: (3)).

Im adulten Organismus wird unter physiologischen Bedingungen mit wenigen Ausnahmen keine Angiogenese oder Lymphangiogenese beobachtet. Dies wird durch ein Gleichgewicht zwischen proangiogenen Faktoren wie zum Beispiel VEGF-A, TAF (tumour angiogenesis factor), EGF (epidermal growth factor), TGF- α und - β (transforming growth factor), TNF- α (tumour necrosis factor) sowie Angiogenin und antiangiogenen Faktoren wie zum Beispiel Angiostatin, Endostatin und Thrombospondin verursacht (12).

In pathologischen Prozessen wie Neoplasien (13), Infektionskrankheiten (14), Kaposi-Sarkomen bei AIDS-Patienten (15), Gefäßmissbildungen (16) oder Arthritiden (17) dagegen ist diese Balance oft gestört.

2.2 Die Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - Superfamilie

Die Bildung und Reifung neuer Gefäße unterliegt hochkomplexen Regulationsprozessen, bei denen die Aktivierung einer Vielzahl von Rezeptoren durch ihre Liganden erforderlich ist. Eine entscheidende Rolle wurde hierbei den unterschiedlichen VEGFs und ihren Rezeptoren zugeschrieben (18).

Die Mitglieder der VEGF – Familie werden als homodimerische Polypeptide in unterschiedlichen Isoformen sezerniert und besitzen eine hydrophobe Signalsequenz am Amino-Terminus für die Proteinsekretion (Sig). Alle Mitglieder der VEGF – Familie sind durch eine identische zentrale Region gekennzeichnet, die VEGF – Homologie – Domäne (VHD) und ein Cystein – Knoten - Motiv. Dabei handelt es sich um ein Strukturmerkmal jeder Untereinheit, welches aus drei Disulphidbrücken innerhalb der Untereinheit besteht und die Form eines Knotens aufweist. (1).

In seiner Funktion als wichtiger Faktor in der Regulation der Angiogenese wurde die Rolle von VEGF-A (auch VEGF) intensiv untersucht. Hierbei konnte ein starker Stimulus auf Wachstum und Migration von Gefäßendothelzellen aus Arterien, Venen und Lymphgefäßen gezeigt werden (19). Zudem besitzt VEGF-A eine starke Wirkung auf die Permeabilität von Gefäßwänden, weshalb er auch zunächst als „vascular permeability factor“ bezeichnet wurde (20). VEGF-A bindet an VEGFR-1 und VEGFR-2,

jedoch nicht VEGFR-3 (21, 22) (**Abb. 1**). Das Vorhandensein von VEGF-A ist für die embryonale Entwicklung des Herzkreislaufsystems essentiell. Untersuchungen mit heterozygoten *vegf-A* – Knockout – Mäusen zeigten, dass diese bereits in der Frühphase der Embryonalentwicklung (E11-12) durch ausbleibende, bzw. dysfunktionale Entwicklung des Gefäßsystems absterben (23, 24). Die klinische Bedeutung von VEGF-A ist unumstritten. In einer Vielzahl von malignen Erkrankungen ist VEGF-A mRNA und/oder Protein hochreguliert, was häufig mit einer schlechten Prognose für den Patienten einhergeht (25 - 27).

Die weiteren Mitglieder der VEGF – Familie konnten aufgrund ihrer Strukturhomologien zu VEGF-A identifiziert werden.

Mit dem Placenta Growth Factor (PlGF) wurde ein weiteres Mitglied der VEGF – Superfamilie beschrieben (28). Trotz seiner strukturellen Ähnlichkeit zu VEGF-A bindet PlGF ausschließlich an VEGFR-1 (29) (**Abb. 1**), dies jedoch mit einer höheren Affinität als VEGF-A und VEGF-B (30). Diese Tatsache verursacht durch Verdrängung von VEGF-A aus der Bindung zu VEGFR-1 eine vermehrte Freisetzung von VEGF-A, was wiederum zu einer verstärkten Bindung von VEGF-A an VEGFR-2 führt und somit indirekt proangiogen wirkt (29). Obwohl ein proangiogener Effekt von PlGF *in vitro* gezeigt werden konnte (31), führte der Knockout von PlGF im Mausmodell zu einer ungestörten embryonalen Entwicklung mit gesunden und fertilen Phänotypen (32). Darüber hinaus war die physiologische trainingsinduzierte Angiogenese in der Skelett- und Herzmuskulatur von PlGF – Knockoutmäusen nicht signifikant reduziert (33). Unter pathologischen Bedingungen dagegen wie Ischämie, Entzündung, Wundheilung und Tumoren war die Angiogenese und Kollateralenbildung bei PlGF – defizienten Mäusen gestört (32). Eine signifikante Überexpression von PlGF konnte in einer Vielzahl von Tumorentitäten, unter anderem in Mammakarzinomen (25, 34), kolorektalen Karzinomen (35), Bronchialkarzinomen (NSCLC) (36) gezeigt werden.

Der 1996 entdeckte VEGF-B (37) bindet ausschließlich an VEGFR-1 und hat strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit VEGF-A und PlGF (38) und bindet wie auch PlGF und VEGF-A an VEGFR-1 (38) (**Abb. 1**). Die Untersuchungen konzentrierten sich aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu VEGF-A zunächst auf eine vermutete angiogenesebezogene Funktion des VEGF-B. Hierbei ergaben *In vivo* – Studien mit *vegf-B* – Knockout-Mäusen, dass diese, im Gegensatz zu *vegf-A* – Knockout-Mäusen, welche im Verlauf der Embryogenese absterben, lebensfähig sind, jedoch geringere Herzgrößen entwickeln und über ein gestörtes Regenerationvermögen nach induzierter

Myocardischämie verfügen (39). Darüber hinaus zeigten Silvestre et al., dass VEGF-B nach intracutaner Applikation in Mäusen zu einer gesteigerten Einsprossung von Endothelzellen und so durch Bindung an VEGFR-1 zu einer gesteigerten Angiogenese führte (40). Ein Bezug zur Tumorangiogenese konnte von Shintani et al. hergestellt werden, indem eine Korrelation zwischen der Expression von VEGF-A und VEGF-B mit gesteigerter Tumorangiogenese in oralen Plattenepithelkarzinomen gezeigt wurde (41). Neuere Erkenntnisse dagegen legen eine Funktion im Rahmen des Fettstoffwechsels nahe (42), wobei gezeigt wurde, dass VEGF-B, im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der VEGF – Superfamilie, den Energiestoffwechsel durch eine Regulation der Fettsäureaufnahme entscheidend beeinflusst (42).

Den zwei Mitgliedern der VEGF-Familie VEGF-C und VEGF-D wird eine übergeordnete Rolle in der Lymphangiogenese zugeschrieben. Beide zeichnen sich durch Fähigkeit, hochaffin an den VEGFR-3 zu binden aus und verfügen über Propeptide am Carboxy – und Aminoterminus (N-Pro und C-Pro) (1). VEGF-C besitzt eine zu 30% identische Aminosäuresequenz zu VEGF-A₁₆₅ (5, 6) und wird als Präprotein synthetisiert und durch schrittweise Proteolyse zu verschiedenen Formen prozessiert, die jeweils ansteigende Affinität zu VEGFR-2 und VEGFR-3 aufweisen (43). Wie auch VEGF-A stimuliert VEGF-C die Migration von Endothelzellen, erhöht die Gefäßpermeabilität und induziert die Endothelzellproliferation, allerdings erst in höheren Konzentrationen als VEGF-A (5, 43). Der zweite lymphangiogene Wachstumsfaktor VEGF-D wurde erst im Verlauf identifiziert (7, 8) und besitzt zu 61% eine identische Aminosäuresequenz zu VEGF-C. Beide binden dieselben Rezeptoren (7), interessanterweise bindet und aktiviert murines VEGF-D nicht murines VEGFR-2 in vitro, obwohl es an den humanen VEGFR-2 bindet. Dagegen bindet humanes VEGF-D murines VEGFR-2 (44). Während die Wirkung von VEGF-A und VEGF-C für die embryonale Entwicklung von Blut- und Lymphgefäßen unerlässlich zu sein scheint (23, 45) konnten VEGF-D – defiziente Mäuse einen normalen Phänotyp entwickeln (46). Die entscheidende Bedeutung von VEGF-C und VEGF-D für den Verlauf und die Prognose maligner Erkrankungen ist in klinischen Studien vielfach belegt. So korrelierten VEGF-C und/oder VEGF-D mit lymphatischer Metastasierung, invasivem Tumorwachstum und/oder Prognose unter anderem in kolorektalen Karzinomen (47), Ovarial- (48) und Mammakarzinomen (49). In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten signifikante Korrelationen zwischen immunhistochemischer Positivität für VEGF-D und VEGF-C mit Lymphmetastasen und reduzierter Überlebensdauer in Magenkarzinomen gezeigt

werden, zudem gelang die Identifikation von Positivität für VEGF-D als unabhängiger prognostischer Faktor (50).

Als VEGF-E wurden zunächst homologe Polypeptide mit etwa zu 25%-35% übereinstimmender Aminosäuresequenz zu VEGF-A aus dem Genom des Orf-Virus identifiziert (51), einem Parapoxvirus, welches in erster Linie Schafe und Ziegen, seltener Menschen befällt und zu Hautläsionen mit gesteigerter Angiogenese führt. VEGF-E bindet und induziert ausschließlich VEGFR-2, eine Bindung von VEGFR-1 konnte nicht gezeigt werden (14) (**Abb. 1**).

2.3 VEGF-Rezeptoren

Die drei Hauptrezeptoren der VEGFs stellen eine Familie aus Tyrosinkinase dar, bestehend aus drei Mitgliedern, nämlich VEGFR-1 (ursprünglich Flt-1), VEGFR-2 (ursprünglich KDR/Flk-1) und VEGFR-3 (ursprünglich Flt-4) (**Abb. 1**).

2.3.1 VEGFR-1 und -2

Die humanen VEGFR-1 und VEGFR-2 bestehen aus 1338 und 1356 Aminosäuren und können in 4 unterschiedliche Regionen unterteilt werden. Sie sind strukturelle Homologe und bestehen aus einem extrazellulären Anteil mit 7 Immunglobulinartigen Domänen zur Ligandenbindung, einer transmembranösen Domäne, einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne und einem zytoplasmatischen Anteil mit einem Carboxyterminus (Übersicht:(52)) (**Abb. 1**). In Bezug auf ihre Ligandenspezifität unterscheiden sich VEGFR-1 und VEGFR-2 deutlich. Während VEGFR-2 die Liganden VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D and VEGF- E bindet (5, 7, 14), bindet VEGFR-1 VEGF-A, VEGF-B und PlGF (1, 29, 38) (**Abb. 1**). Darüber hinaus können die VEGF-Rezeptoren untereinander homo- und heterodimere Komplexe bilden, was zu einer veränderten Signaltransduktion und Ligandenspezifität führt (53, 54). Beide Rezeptoren sind für die embryonale Entwicklung des Organismus essentiell. *Vegfr-1* – Knockout führte zu einem Absterben des Embryos an Tag E8,5 – 9,0. Dies ist jedoch nicht durch ein reduziertes Gefäßwachstum, sondern vielmehr durch eine übermäßige und unorganisierte Angiogenese verursacht, was

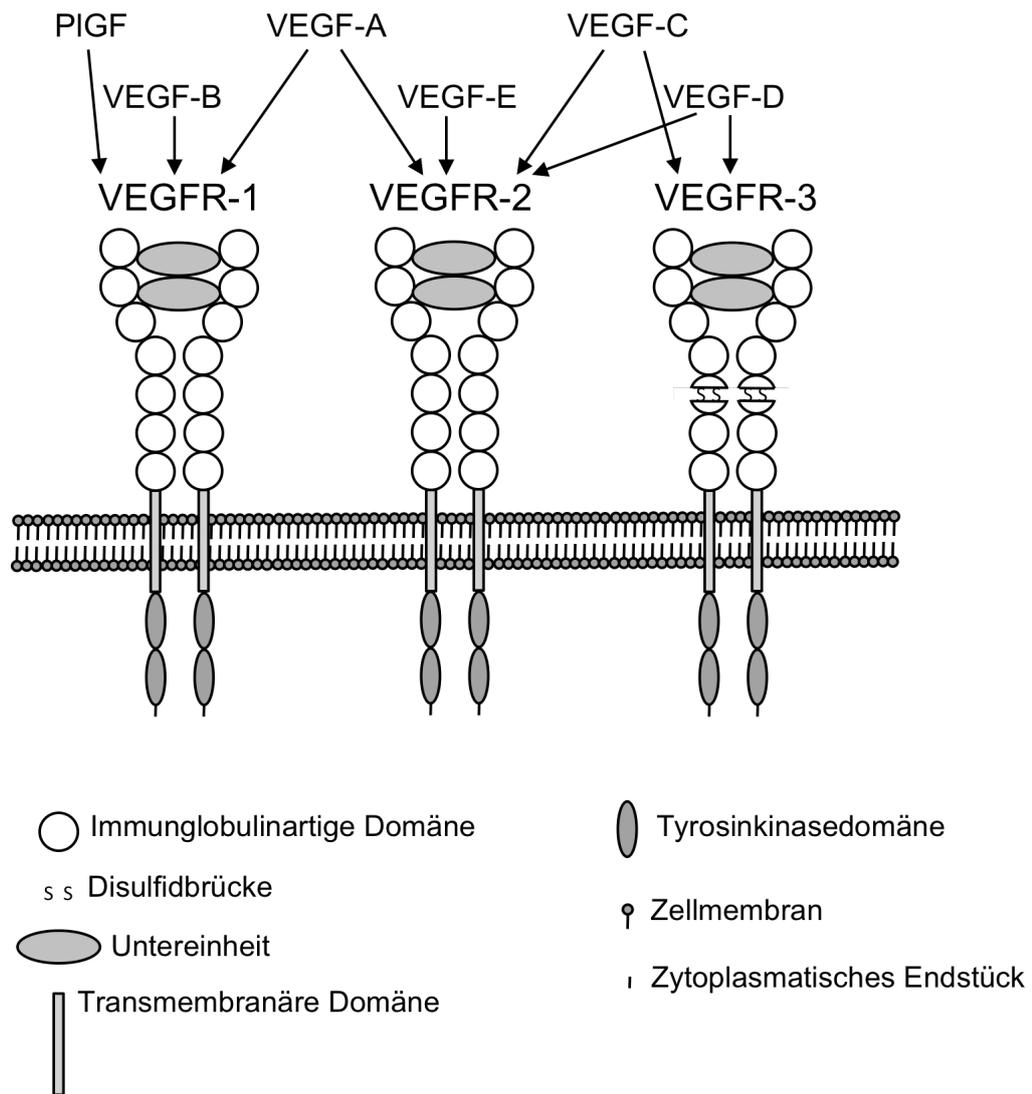


Abbildung 1: Rezeptorbindungsspezifität der VEGF-Liganden und schematische Darstellung der VEGF-Rezeptoren

Die Tyrosinkinaserzeptoren VEGFR-1, -2 und -3 setzen sich aus jeweils einem extrazellulären Anteil mit 7 immunglobulinartigen Domänen zur Ligandenbindung, einer transmembranösen Domäne, einer intrazellulären gespaltenen Tyrosinkinasedomäne und einem zytoplasmatischen Anteil am Carboxyterminus zusammen. Die fünfte immunglobulinartige Domäne des VEGFR-3 unterläuft zunächst einen proteolytischen Prozess, die Untereinheiten werden hier durch Disulfidbrücken (-S-S-) verbunden. Modifizierte Abbildung nach Karkkainen et al. (52).

zu dem Schluss führte, dass VEGFR-1 eine negative Rolle durch Suppression proangiogener Signale bei der Regulation der frühembryonalen Angiogenese besitzt (55). *Vegfr-2* - Knockout führte dagegen zu einem Absterben des Embryos am Tag E8.0-8.5 durch ein Ausbleiben der Vasculo- und Angiogenese (56). VEGFR-1 verfügt über eine etwa 10fach höhere Bindungsaffinität zu VEGF-A, jedoch über eine stark reduzierte Kinaseaktivität (21, 57). Damit einhergehend, sind Mäuse, welche VEGFR-1 mit einer funktionsunfähigen Kinasedomäne exprimieren, lebensfähig und bilden einen normalen Phänotyp aus (57). Dies führte zu der Annahme, dass VEGFR-1 im Zusammenspiel mit VEGFR-2 regulatorisch auf die VEGFR-2 – vermittelten Effekte durch Bindung von VEGF-A wirkt. (57, 58). Trotzdem konnte eine durch VEGFR-1 vermittelte deutlich gesteigerte Endothelaktivität und Angiogenese *in vitro* und *in vivo* belegt werden. Aktivierung von VEGFR-1 durch VEGF-A und PlGF steigerte die Zellmigration und das Überleben von Endothelien, gleichzeitig konnte durch VEGFR-1 – antagonistisch wirkende Peptide die endotheliale Migration und Kapillarbildung reduziert werden (59, 60). Immunhistochemische Studien haben eine Überexpression von VEGFR-1 in multiplen malignen Erkrankungen gezeigt, darunter Magen-, Mamma- und Bronchialkarzinome (61 - 63). Hierbei korrelierte eine erhöhte VEGFR-1 – Expression mit verkürzter Überlebenszeit und hatte einen negativen Einfluss auf die Prognose der Patienten (61 - 63). Über die VEGFR-2 – vermittelte Signalkette wird eine gesteigerte vaskuläre Permeabilität und Proliferation sowie ein Anstieg von Überleben und Migration von Endothelzellen vermittelt (64, 65). Obwohl die Rolle von VEGFR-2 in der Hämangiogenese allgemein etabliert ist, gibt es Hinweise, dass die Bindung von VEGF-A zur Induktion der Lymphangiogenese beiträgt. *In vitro* konnte ein deutlich proliferativer Effekt auf Lymphendothelien durch VEGF-A gezeigt werden (66), außerdem verursachte die Injektion von adenoviralem VEGF-A₁₆₄ Lymphangiogenese in Mausohren (67). Zudem konnte VEGFR-2 auf blut- und lymphendothelialen Zellen *in situ* und *in vitro* nachgewiesen werden (66, 68). Darüber hinaus inhibierte eine antikörpervermittelte Blockade des VEGFR-2 sowohl Angiogenese als auch Lymphangiogenese in der Wundheilung (69, 70). VEGFR-2 wird eine entscheidende Rolle in der Tumoriangiogenese zugeschrieben. Eine Überexpression konnte in einer Vielzahl von Tumoren, unter anderem in Mamma-, Ösophagus- und Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden (71 - 73).

2.3.2 VEGFR-3

2.3.2.1 Molekulare Struktur und Signaltransduktion des VEGFR-3

Das *vegfr-3* – Gen ist auf Chromsomen 5q33-q35 lokalisiert (74). Die genomische Organisation weist hohe Ähnlichkeiten zur Organisation der Homologen *vegfr-1* und *vegfr-2* auf (75, 76). Durch alternatives Splicing von Exon 30a und 30b entstehen 2 Isoformen des VEGFR-3, welche als VEGFR-3s (short) und VEGFR-3l (long) bezeichnet werden und sich um 65 Aminosäuren hinsichtlich ihres C-Terminus unterscheiden (77, 78). VEGFR-2 und VEGFR-3 besitzen eine große Ähnlichkeit zueinander hinsichtlich ihrer Struktur, bestehend aus jeweils einer extrazellulären Domäne mit sieben immunglobulinartigen Domänen (Ig), einer transmembranären Domäne (TM) und einer gespaltenen Tyrosinkinasedomäne (TK) mit einer Kinaseninsertsequenz (KI) und einem zytoplasmatischen Endstück (CT) am Carboxyterminus (77, 78) (**Abb. 1**). Die Funktionen scheinen sich hierbei zu überlappen, da eine selektive Neutralisierung von VEGFR-2 und VEGFR-3 ergab, dass eine gemeinsame Signalgebung von VEGFR-2 und VEGFR-3 notwendig für Migration und Proliferation von Lymphendothelien ist, die Funktion von VEGFR-3 für die Organisation von funktionellen Kapillaren jedoch vom VEGFR-2 übernommen werden kann (79). Eine selektive Stimulation von VEGFR-3 in transgenen Mäusen zeigte jedoch, dass dessen Signaltransduktion für die Lymphangiogenese ausreichend ist (80). Im Gegensatz zum VEGFR-2 unterläuft die fünfte immunglobulinartige Domäne des VEGFR-3 zunächst einen proteolytischen Prozess, die Untereinheiten werden hier durch Disulfidbrücken (-S-S-) verbunden (81). Die lange Isoform VEGFR-3l ist die prädominante Form in Geweben. Sie enthält drei zusätzliche Tyrosilreste, von denen Tyr-1337 eine entscheidende Funktion für die Autophosphorylierung des Rezeptors übernimmt (82). VEGFR-3 bindet VEGF-C und VEGF-D, (5, 7), die Rezeptorspezifität der Liganden wird, wie bereits erwähnt, durch proteolytische Prozessierung modifiziert (43, 83). Die Signaltransduktion des VEGFR-3 ist komplex und bislang nur in Teilen verstanden. Die Aktivierung der VEGFR-3 – Tyrosinkinase scheint dem allgemeinen Schema für Rezeptortyrosinkinasen zu folgen. Die Bindung eines Liganden führt zur Dimerisation des Rezeptors und sequentieller Aktivierung der intrinsischen Kinaseaktivität (53). Hierbei werden durch Transphosphorylierung innerhalb des Rezeptordimers die Kinaseaktivität reguliert und Bindungsstellen für Signalmoleküle mit charakteristischen Domänen wie Src homology (SH)-2 oder Phosphotyrosinbindungsdomänen geschaffen (53). Dixelius et al. zeigten zudem, dass

fünf (Tyr-1230, -1231, -1265, -1337, -1363) der sechs Tyrosylreste innerhalb des VEGFR-3 – Carboxyterminus potentielle Phosphorylierungsstellen darstellen (53). Es kommt zu einer Bindung der Adaptermoleküle growth factor receptor binding protein 2 (GRB2) sowie Src homology containing protein (SHC) (84). Dies führt zu einer Signaltransduktion, welche über eine Proteinkinase C (PKC)- abhängige Aktivierung der p42/p44 MAPK Signalkaskade sowie einer Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) und der nachgeschalteten Serin-Threonin-Kinase AKT Lymphendothelzellen vor Apoptose schützt und deren Wachstum und Migration induziert (85). Eine nähere Beschreibung der Aktivierungskaskade erfolgte durch Salameh et al., die zeigten, dass über den Tyrosylrest 1063 das rezeptorvermittelte Überleben über Rekrutierung von CRK1/II an den aktivierten Rezeptor gesteuert wird, was wiederum eine Signalkaskade induziert, welche über mitogen-activated protein kinase kinase-4 (MKK4) zu einer Aktivierung der c-JUN N-terminal kinase- 1/2 (JNK1/2) führt. Darüber hinaus zeigten sie, dass die Tyrosylreste 1230/1231, zusammen mit 1337 zu Proliferation, Migration und Überleben von Endothelien beitragen. Die phosphorylierten 1230/1231 führen hierbei zu einer direkten Rekrutierung von GRB-2 an den Rezeptor, was zu einer Aktivierung von AKT und extracellular signal-related kinase 1/2 (ERK1/2) führt (86). Zudem zeigten Wang et al., dass es unter dem Einfluss von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) über eine Induktion der Tyrosinphosphorylierung zu einer Assoziation des VEGFR-3 mit dem signaling adaptor protein SHC, GRB-2, Sos, p85, SHP-2 sowie Phospholipase C- γ kommt, was in einem gesteigerten Überleben von Endothelien resultierte (87). Darüber hinaus konnte eine ligandenunabhängige Induktion von c-Src-abhängiger Phosphorylierung der Tyrosylreste 1063 und 1337 des VEGFR-3 gezeigt werden, welche Bindungsstellen für CRK1/II und SHC darstellen und durch Zelladhäsion mit Kollagen I induziert werden (88). VEGF-C – Stimulation führte zudem zur Bildung eines VEGFR-3/VEGFR-2 – Heterodimers, was wiederum zu einer Veränderung der Phosphorylierungsvorgänge führte und somit zusätzliche Möglichkeiten der VEGFR-3 – Aktivierung darstellen könnte (53).

2.3.2.2 Die Rolle des VEGFR-3 in der Lymphangiogenese und Angiogenese

Während der Embryogenese ist VEGFR-3 mRNA am Tag 8,5 p.c. (postcoital) zunächst in Angioblasten des Kopfmesenchyms, der Kardinalvene sowie extraembryonal in der Allantois nachzuweisen. Am Tag 12,5 p.c. ist VEGFR-3 auf sich entwickelnde venöse und lymphatische Endothelien beschränkt, arterielle Endothelien sind bereits negativ.

Während der weiteren Entwicklung wird VEGFR-3 ausschließlich von Lymphendothelien sowie von hochdifferenzierten Lebervenolen exprimiert (4). Dies führte zunächst zu der Annahme, dass VEGFR-3 einen lymphspezifischen Marker darstellt (4). Im weiteren Verlauf stellte sich jedoch heraus, dass VEGFR-3 physiologisch neben seiner Expression in Lymphendothelien ebenfalls in fenestrierten Kapillaren in Knochenmark, Milz, Nierenglomeruli, endokrinen Organen sowie hepatischen Sinusoiden detektierbar ist (89). Darüber hinaus spielt VEGFR-3 eine Rolle im Rahmen der Wundheilung. VEGFR-3-positive Gefäße konnten im Granulationsgewebe zwischen Tag 5 und 14 gezeigt werden, zudem war eine Expression in vaskulären Endothelien in chronisch infizierten Wunden zu detektieren (90). Calvo et al. zeigten erst kürzlich, dass darüber hinaus eine Expression von VEGFR-3 neben VEGF-C im ZNS von Ratten nachweisbar ist und in neuronalen Stammzellen eine entscheidende Rolle für die Neurogenese beim Erwachsenen spielt (91). Für die embryonale Entwicklung ist VEGFR-3 essentiell. Im Mausmodell konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass die Inaktivierung des *vegfr-3* – Gens zu embryonaler Letalität am Tag E9,5 führt. Hierbei findet die Vasculogenese und Angiogenese statt, es kommt jedoch zu einer abnormen Organisation von großen Gefäßen mit defekten Lumina, was wiederum eine Ansammlung perikardialer Flüssigkeit und Absterben des Embryos durch kardiovaskuläres Versagen zur Folge hat (92). Allerdings zeigten Haiko et al., dass *vegfr-C/vegfr-D* Double-Knockout – Mäuse lebensfähig sind und zudem keine Störungen der Angiogenese aufweisen, was zu dem Schluss führte, dass andere Liganden oder eine ligandenunabhängige Signalkette eine Rolle in der VEGFR-3 abhängigen embryonalen Angiogenese spielen könnten (93). In transgenen Mäusen war nach rezeptorspezifischer Überexpression der VEGFR-3 – Liganden VEGF-C und VEGF-D eine Induktion von lymphatischer Hyperplasie zu messen, während die Hämangiogenese hierdurch nicht beeinflusst wurde. Darüber hinaus konnte in der gleichen Arbeit lymphatische Hyperplasie durch den Einsatz eines löslichen VEGFR-3 – Proteins blockiert werden (80). Zudem resultierte die Blockierung des VEGFR-3 – Signals durch Überexpression eines löslichen VEGFR-3 – Proteins in der Haut transgener Mäuse in einer Inhibition fetaler Lymphangiogenese sowie einer Regression sich bereits entwickelnder Lymphgefäße, ohne einen Effekt auf die Blutgefäßendothelien auszuüben, was zur Ausbildung eines partiell reversiblen Lymphödems bei den Phänotypen führte (94). Untersuchungen in postnatalen und adulten Mäusen zeigten, dass eine Inhibition der VEGFR-3 – Signalgebung durch

VEGF-C/-D – Trapping oder einen blockierenden monoklonalen Antikörper zu einer systemischen Regression von lymphatischen Kapillaren und mittelgroßen Lymphgefäßen in Mäusen bis zu einem Alter von 2 Wochen führte, während die Ausbildung großer Lymphgefäßen sowie Blutgefäßen nicht gestört war (95). Interessanterweise erfolgte trotz aufrechterhaltener Inhibition eine Regeneration durch Nachwachsen der Lymphgefäße nach 4 Wochen, was zu dem Schluss führte, dass das Lymphsystem im Verlauf unabhängig von der Ligandenbindung an VEGFR-3 wird (95). Zudem scheint VEGFR-3 einen Einfluss auf die Differenzierung vaskulärer Vorläuferzellen zu haben, da durch cDNA-Transfektion von VEGFR-3 in embryonischen Stammzellen eine Ausbildung von Lymphendothelien mit hoher Expression von LYVE-1 hervorgerufen werden konnte (96). Durch Mutationen in der Region 5q34-q35 verursachte Dysfunktionen des VEGFR-3 werden pathogenetisch mit der Ausprägung des hereditären Lymphödems (Milroy's disease) in Verbindung gebracht (97). Hierdurch ist aufgrund insuffizienter cutaner Lymphgefäße der Abtransport von Lymphflüssigkeit gestört, was in starken Extremitätenschwellungen resultiert (98). Im Mausmodell konnte dies anschließend durch eine heterozygote inaktivierende VEGFR-3 – Mutation gezeigt werden. In Form von Chy-Mäusen, welche postpartal chylösen Aszites und Schwellung der Glieder entwickeln, konnten Karkkainen et al. ein Modell zur Gentherapie dieser schwerwiegenden Erkrankung präsentieren (99).

2.3.2.3 Bedeutung des VEGFR-3 in der Lymphangiogenese und Angiogenese von Karzinomen

Bei Patienten mit Karzinomerkrankungen hängen Prognose und Lebenserwartung in hohem Maße von der Ausbildung hämatogener sowie lymphogener Metastasen ab, daher ist die Untersuchung von tumorbezogenen Funktionen der VEGFRs in den letzten Jahren in den Mittelpunkt intensiver Untersuchungen gerückt. Neben seiner oben ausgeführten, weitestgehend auf lymphatische Endothelien beschränkten physiologischen Expression, konnte eine erhöhte Expression von VEGFR-3 mRNA und/oder Protein im Zusammenhang mit einer Reihe maligner Erkrankungen nachgewiesen werden (100 - 104).

In multiplen Mammakarzinomzelllinien ergaben immunhistochemische Färbungen eine Überexpression des VEGFR-3 im Zytoplasma und den Zellkernen im Vergleich zu Normalgewebe (100). Daneben war VEGFR-3 in Tumorepithelien von Bronchialkarzinomen nachzuweisen. In invasiv wachsenden oder weit fortgeschrittenen

Bronchialkarzinomen war eine besonders starke Expression in der zytoplasmatischen Membran zu detektieren (104). Zusätzlich konnte VEGFR-3 im Zytoplasma von Ovarialkarzinomzellen (103) sowie in Magenkarzinomzellen und umliegenden Stromazellen nachgewiesen werden. (102). Jussila et al zeigten eine Expression des VEGFR-3 in Spindelzellen von AIDS-assoziierten Kaposisarkomen (101). Schoppmann et al. fanden darüber hinaus VEGFR-3 – exprimierende Monozyten, welche sich peritumoral zu VEGF-C-, VEGF-D- und VEGFR-3-exprimierenden tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) differenzieren und vermuteten hierdurch einen Einfluss auf die tumorassoziierte Lymphangiogenese (105).

Mehrere Studien haben durch Tierversuchsmodelle direkte Hinweise auf eine fundamentale Beteiligung von VEGFR-3, VEGF-C und/oder VEGF-D an der tumorassoziierten Lymphangiogenese oder lymphatischen Metastasierung gegeben, zudem konnte VEGFR-3 im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen sowohl auf Lymph-, als auch auf Blutgefäßendothelien nachgewiesen werden. Dementsprechend führte VEGF-C-Überexpression in malignen Melanomen nach Transplantation in Nacktmäuse zu einer Zunahme von Hämangiogenese und Lymphangiogenese (106). Valtola et al. wiesen VEGFR-3 auf „Gefäßkränzen“ nach, welche in direktem örtlichen Zusammenhang mit den intraduktal wachsenden Mammakarzinomzellen auf PAL-E positiven Blutendothelien nachgewiesen werden konnte, in etwas größerer Entfernung zu den Tumorzellen jedoch auf Lymphgefäße beschränkt war (107). In doppelt transgenen Mäusen mit gesteigerter VEGF-C - bzw. VEGF-D - Expression und Ausbildung von β -Zelltumoren des Pankreas zeigte sich eine verstärkte Lymphangiogenese sowie eine deutliche Steigerung der lymphatischen Metastasierung, die Überexpression von VEGF-D resultierte hier interessanterweise in einer verminderten tumorassoziierten Hämangiogenese (108, 109). Eine tragende Funktion für die Hämangiogenese im Rahmen von Tumorwachstum wurde in einer neueren Arbeit durch Tammela et al. nahegelegt. Im Mausmodell konnte VEGFR-3 hier in hohem Maße auf einsprießenden Blutgefäßen nachgewiesen werden (110). Liu et al. fanden eine erhöhte Expression von VEGFR-3 in Magenkarzinomzellen sowie in Endothelien von Blut- und Lymphgefäßen in umliegenden Stromazellen (102). Entsprechend konnte in einer Reihe von Studien durch Blockierung der VEGF-C/D-VEGFR-3 – Signalkette tumorbezogene Lymph- und/oder Hämangiogenese sowie lymphatische Metastasierung inhibiert werden. Karpanen et al. zeigten, dass nach Implantation eines VEGF-C überexprimierenden, humanen Mammakarzinoms die VEGF-C-induzierte

Lymphangiogenese durch ein lösliches VEGFR-3 – Fusionsprotein inhibiert werden konnte (111). Die Inaktivierung von VEGF-C und VEGF-D durch ein VEGFR-3-Ig Fusionsprotein inhibierte die tumorassoziierte Lymphangiogenese und lymphatische Metastasierung in xenotransplantierten, stark metastasierenden Bronchialkarzinomen, die Ausbildung von Lungenmetastasen konnte hierdurch jedoch nicht verhindert werden (112). Zudem konnte von der gleichen Gruppe das Übertreten von Tumorzellen in die umliegenden Lymphgefäßen inhibiert und das Risiko einer Streuung in zugehörige Lymphknoten gesenkt werden, jedoch nur bei sofortiger Applikation des Fusionsproteins zum Zeitpunkt der Tumorimplantation. Eine Langzeitexpression hatte hier zwar einen Einfluss auf die Ausbildung von Makrometastasen, die Ausbildung von Mikrometastasen konnte nicht verhindert werden. Das Metastasenwachstum wurde ebenfalls nicht beeinflusst. Eine Applikation nach einem Zeitraum von drei Wochen, nachdem eine lymphogene Streuung stattgefunden hatte, blieb ohne Wirkung (113). Kubo et al. zeigten eine Suppression des Tumorwachstums durch antikörpervermittelte Blockade des VEGFR-3 in xenotransplantierten Glioblastomen. Histologisch zeigten sich Mikrohämorrhagien innerhalb der tumoralen postkapillären Venolen, was sie als Hinweis für die Funktion des VEGFR-3 zur Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität deuteten (114). In einem Tumormodell mit immunkompetenten Ratten konnte zudem gezeigt werden, dass durch Blockade der Bindung von VEGF-C und VEGF-D an VEGFR-3 durch Überexpression eines löslichen VEGFR-3 Fusionsproteins sowohl die Größe von axillären Lymphknotenmetastasen als auch die Anzahl an peribronchialen Lymphmetastasen sowie die Neubildung peribronchialer Lymphgefäße signifikant reduziert werden konnte. Selektive VEGFR-3-Aktivierung resultierte in einem dramatischen Anstieg der Größe und Anzahl von Lymphknotenmetastasen, was den Schluss zuließ, dass die Aktivierung von VEGFR-3 für eine gesteigerte Lymphangiogenese ausreichend ist (115). Lin et al. zeigten, dass sich die tumorassoziierte Lymphangiogenese und die Entwicklung von Lymphknotenmetastasen in Tumor-Maus-Modellen mit stark metastasierendem malignem Melanom sowie Nierenzellkarzinom durch stabile systemische Expression eines löslichen VEGFR-3-Rezeptors und die Ausbildung von Lymphknoten- als auch Lungenmetastasen im Prostatakarzinommodell potent inhibieren lässt (116). In einem Mammakarzinom-Maus-Modell konnte durch VEGFR-3 – spezifische Antikörperblockade die Ausbildung VEGF-C – induzierter Lymphknotenmetastasen vollständig unterbunden werden, die antikörpervermittelte Blockierung von VEGFR-2 war hier deutlich weniger wirksam als

die von VEGFR-3. Die Blockade von VEGFR-3 resultierte in einer kompletten Normalisierung der peritumoralen Lymphgefäßen und inhibierte die Ausbildung intratumoraler Lymphgefäße vollständig (117). Laakonen et al. zeigten in einer weiteren Arbeit, dass durch den gleichen Antikörper das Tumorstadium, die tumorassoziierte Hämangiogenese sowie Lymphangiogenese in mehreren xenotransplantierten humanen Tumoren in immunkompromittierten Mäusen inhibiert werden konnte (118). Eine kombinierte Behandlung mit löslichem VEGFR-1, VEGFR-3 sowie löslichem Angiopoietinrezeptor Tie2 resultierte in einer signifikanten Größenreduzierung von intraperitonealen Tumoren sowie signifikant geringerer Tumorstadium in Ovarialkarzinomen (119). Inaktivierung des VEGFR-3 durch Mutation oder monoklonale Antikörper resultierte in erniedrigtem Einsprossen und Verzweigen von Blutgefäßen sowie einer erniedrigten Proliferation von Blutgefäßendothelien. Eine Stimulation von VEGFR-3 dagegen steigerte VEGF-A – induzierte Angiogenese sogar bei zeitgleicher Inhibition von VEGFR-2, während eine gemeinsame Inhibition von VEGFR-2 und VEGFR-3 zu einer Inhibition der Angiogenese führte (110). Darüber hinaus inhibierten Chen et al. tumorassoziierte Lymphangiogenese und Metastasierung in einem Maus-Mammakarzinom-Modell durch small interfering RNA (siRNA)–vermittelte *vegfc* - Genausschaltung, was aber aufgrund der rezeptorübergreifenden Funktion von VEGF-C keinen Rückschluss darüber lässt, ob es sich hierbei um einen VEGFR-3 oder VEGFR-2 vermittelten Effekt handelt (120).

In einer Vielzahl von klinischen Studien konnten Korrelationen zwischen VEGF-C, VEGF-D und/oder VEGFR-3 und klinisch-prognostisch entscheidenden Parametern wie lymphatischer Streuung, Invasivität oder schlechter Prognose hergestellt werden. Dies gelang für multiple Tumorentitäten, unter anderem im Bronchial- und Endometriumskarzinom, in NSCLC, im Mamma- und im Magenkarzinom, Weichteilsarkomen sowie im kolorektalen Adenokarzinom (50, 104, 121 - 127). In Bronchial-, Mamma- und Endometriums- und Magenkarzinomen korrelierten sowohl Positivität für VEGF-C/VEGF-D als auch VEGFR-3 mit dem Tumorstadium, Invasivität, lymphatischer Metastasierung sowie verkürztem Überleben. Sowohl VEGF-D als auch VEGFR-3 konnten als unabhängige prognostische Faktoren für das Endometriumskarzinom identifiziert werden (49, 104, 126). Neben den genannten Parametern wiesen Yonemura et al. einen Zusammenhang mit dem histologischen Typ im Magenkarzinom nach (127). In immunhistochemischen Färbungen in NSCLC konnten VEGF-C und VEGFR-3 fast ausschließlich im Zytoplasma der Tumorzellen und

in Makrophagen nachgewiesen werden. Positivität für VEGF-C und/oder VEGFR-3 korrelierte mit verkürzter Überlebensdauer sowie geringerer Überlebensrate in NSCLC, wobei eine kombinierte Positivität für VEGF-C und VEGFR-3 mit der ungünstigsten Prognose einherging (121). Darüber hinaus korrelierte in einer neueren Arbeit Positivität sowohl für VEGFR-2 als auch für VEGFR-3 mit reduziertem Überleben bei Patienten mit kolorektalen Adenokarzinomen (124). Hohe VEGFR-3-Expression konnte als unabhängiger prognostischer Faktor für reduziertes krankheitsspezifisches Überleben bei Patienten mit Weichteilsarkomen identifiziert werden (123). In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte eine Korrelation von VEGF-D und VEGF-C mit lymphatischer Metastasierung und reduziertem Überleben bei Patienten mit Adenokarzinom des Magens gezeigt werden. VEGFR-3 korrelierte mit reduziertem karzinomspezifischem Überleben, darüber hinaus konnten VEGF-D und VEGFR-3, jedoch nicht VEGF-C als unabhängige prognostische Parameter identifiziert werden. In lymphknoten-positiven Magenkarzinomen waren VEGF-D/VEGFR-3 zudem mit reduziertem Überleben einhergehend, während Negativität für VEGF-D/VEGFR-3 einer Untergruppe mit deutlich günstigerer Prognose kennzeichnete (50). Die Identifikation von VEGF-C als unabhängigen prognostischen Marker für das Magenkarzinom gelang Han et al., in deren Arbeit die Expression von VEGF-C und VEGFR-3 in Patienten mit Lymphknotenmetastasen korrelierte. Die Überlebensrate von VEGFR-3 positiven Patienten war hier ebenfalls signifikant niedriger, wobei erneut eine kombinierte Positivität für VEGF-C und VEGFR-3 mit der schlechtesten Prognose für die Patienten einherging (122). Dagegen stehen eine Reihe von Arbeiten an Ovarial-, Magen- und Mammakarzinomen, in denen zwar eine erhöhte Expression des VEGFR-3 gezeigt, ein klinischer Bezug jedoch nicht nachgewiesen werden konnte (102, 103, 128).

2.3.2.4 Transkriptionelle Regulation des *vegfr-3* – Gens

Obwohl hierdurch eine Rolle des VEGFR-3 als entscheidender Faktor in der tumorassoziierten Lymphangiogenese und lymphatischen Metastasierung nahegelegt wird, ist das aktuelle Verständnis bezüglich molekularer Vorgänge zur Regulation seiner Expression bislang beschränkt.

In deutlichem Gegensatz hierzu wurden die Promoterbereiche der beiden homologen Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 bereits eingehend charakterisiert und eine Reihe an regulierenden Strukturelementen und bindenden Transkriptionsfaktoren identifiziert (129 - 134).

Bezüglich der *vegfr-3* - Regulation konnte in der Vergangenheit ein negativer Zusammenhang durch TNF- α in Endothelzelllinien gezeigt werden (135). Darüber hinaus wurde eine Mutation des *vegfr-3* - Gens bei der Entstehung der Milroy - Erkrankung (Hereditäres Lymphödem Typ I) als ursächlich identifiziert (97). Zudem wurde eine Überexpression des VEGFR-3 auf mRNA- und Proteinebene durch Hypoxie in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 und der Bronchialkarzinomzelllinie A549 gezeigt (136). Shawber et al. konnten eine Notch-abhängige *vegfr-3* - Induktion in mehreren endothelialen Zelllinien nachweisen (137). Sie zeigten, dass für die Notch-vermittelte Transaktivierung des *vegfr-3* - Promoters eine Bindung eines Notch/CSL - Komplexes an eine spezifische Bindungssequenz innerhalb des *vegfr-3* - Promoters essentiell ist. Zudem hatten doppelt-heterozygote Mäuse für *Notch1* und *vegfr-3* eine signifikant reduzierte Lebensfähigkeit und wiesen am Tag E9,5 schwere vaskuläre Defekte auf (137). Iljin et al. fanden zwei Regionen innerhalb der *vegfr-3* - Promotersequenz mit nicht-repetitiver Sequenzhomologie, welche eine 70%ige Übereinstimmung zwischen der humanen und Mausequenz des *vegfr-3*-Promoters aufwiesen. Sie präsentierten multiple putative Bindungssequenzen, unter anderem für Myocyte enhancer factor - 2 (MEF-2) und für Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie sowie mehrere Bindungssequenzen für Sp-artige Faktoren (138). Zudem resultierten Deletionsanalysen eines 1,6kb *vegfr-3* - Promoterfragments in einer Steigerung der Promoteraktivität bis 819bp, weiteres Verkürzen führte zum Rückgang der Promoteraktivität (138). In einer neueren Arbeit konnte ein regulatorischer Zusammenhang mit entzündungsinduzierter Transkription durch nuclear factor κ B (NF- κ B) und Prox-1 durch Bindung des proximalen Promoters hergestellt werden (139).

3. Fragestellung

Obwohl die funktionelle und klinische Relevanz des Tyrosinkinase-Rezeptors VEGFR-3 für die tumorassoziierte Lymphangiogenese und lymphatische Metastasierung in einer Vielzahl von Studien belegt werden konnte, ist das Verständnis seiner molekularen Regulation bislang nur unzureichend. Während die Promoterbereiche der für die Hämangiogenese entscheidenden homologen Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 bereits eingehend charakterisiert und eine Reihe regulierender molekularer Mechanismen dargestellt wurden (130, 134, 140 - 144), wurden nur einzelne, die Expression des VEGFR-3 beeinflussende Vorgänge beschrieben (97, 135 - 139).

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe waren 1,9kb des 5'-flankierenden Promoterbereichs des humanen *vegfr-3* – Gens kloniert und durch 5'-Deletionsanalysen ein GC-reiches, für die *vegfr-3* – Transkription essentielles Promoterminimalelement identifiziert worden. Es wurden zwei GC-Boxen bei -100/-86 und -84/-66 identifiziert, welche durch die Zinkfingerproteine Sp1 und Sp3 gebunden und aktiviert werden.

Nach der Ermittlung dieser strukturellen Charakteristika sollten daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Welche funktionelle Relevanz haben die identifizierten GC-Boxen innerhalb des Minimalbereichs im proximalen Promoter des *vegfr-3* – Gens und die hier bindenden Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3?
2. Welchen Einfluss haben die epigenetischen Regulationsmechanismen Acetylierung und Methylierung auf die Aktivierung des *vegfr-3* – Promoters?
3. Welchen Einfluss haben die epigenetischen Regulationsmechanismen Acetylierung und Methylierung auf die Bindung und Transaktivierung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3?

4. Material und Methoden

Sämtliche Grundchemikalien wurden von den Firmen Difco (Becton, Dickinson, Sparks, MD, USA), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma Aldrich (Taufkirchen) bezogen und werden als Bezugsquellen im Weiteren nicht erwähnt. Die Erstellung von Primern und Oligonukleotiden erfolgte durch die Firma TIB Molbiol (Berlin), farbmarkierte, genspezifische Sonden wurden von der Metabion GmbH (Berlin) synthetisiert. Sämtliche Sequenzierungsarbeiten wurden von der Firma AGOWA (Berlin) übernommen.

4.1 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durch Verwendung einer Sterilbank Heto-Holten, Modell 1.8 durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien sind gesondert in **Tab. 1** aufgeführt. Die humanen Endothelzelllinien HMEC-1 und HPMEC wurden in MCDB-131 (Invitrogen, Karlsruhe) unter Zusatz von 15% hitzeinaktiviertem FCS (Fetal Calf Serum, Biochrom KG, Berlin), 10ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor, R&D, Wiesbaden Norderstedt), 1µg/ml Hydrokortison, 2mM Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe), 100U/ml Penicillin (Biochrom KG, Berlin) und 100µg/ml Streptomycin (Biochrom KG, Berlin) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zur Anzucht von HPMEC wurden die Zellkulturflaschen zuvor mit 0,2% Gelatine beschichtet. Die Primärzelllinie HUVEC wurde auf 199 Earle Medium (Biochrom KG, Berlin) mit 20% FCS und 1% RDGF (retina-derived growth factor) unter Zusatz von 2mM Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe), 100U/ml Penicillin (Biochrom KG, Berlin) und 100µg/ml Streptomycin (Biochrom KG, Berlin) bei 37°C und 5% CO₂ in mit 0,2% Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen angezogen. Die Kultivierung der humanen hybriden Endothelzelllinie EA.hy926, der humanen Magenkarzinomzelllinien AGS erfolgte in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, Karlsruhe) unter Zugabe von 10% hitzeinaktiviertem FCS, 2mM Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe), 100U/ml Penicillin (Biochrom KG, Berlin) und 100µg/ml Streptomycin (Biochrom KG, Berlin) bei 37°C und 5% CO₂. Zu allen angegebenen Medien wurden 2mM Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe), 100U/ml Penicillin (Biochrom KG, Berlin) und 100µg/ml Streptomycin (Biochrom KG, Berlin) zugesetzt. Die Anzucht der Insektenzelllinie *D. melanogaster* SL-2 erfolgte in Schneider's Drosophila Medium (Invitrogen, Karlsruhe) nach Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem insektenzellkultur-

getestetem FCS (Sigma Aldrich, Taufkirchen), 2mM Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe), 100U/ml Penicillin (Biochrom KG, Berlin) und 100µg/ml Streptomycin (Biochrom KG, Berlin) bei 25°C und atmosphärischem CO₂. Zur Entnahme der Zellen wurden diese mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, alle anderen verwendeten Zelllinien wurden durch Applikation von Trypsin (Biochrom KG, Berlin) abgelöst.

Name	Beschreibung	Referenz
HMEC-1	Immortalisierte humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie	(145)
HPMEC	Immortalisierte humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzelllinie	(146)
EA.hy926	Permanente humane Endothelzelllinie	(147)
AGS	Humane Adenokarzinomzelllinie des Magens, gut differenziert	(148)
Schneider SL-2	Insektenzelllinie aus <i>Drosophila melanogaster</i>	(149)

Tabelle 1: Zelllinien

4.1.1 Transiente Transfektionen

Die transiente Transfektion der Zelllinien erfolgte entweder durch Kalziumphosphat-Präzipitation oder mit Hilfe von Effectene® Transfection Reagent (Qiagen, Hilden). Hierzu wurden je nach Zelllinie zwischen 50.000 und 100.000 Zellen pro Well in Multiwell 24 – Well Gewebekulturplatten und zwischen 200.000 und 500.000 Zellen pro Well in Multiwell 6 – Well Gewebekulturplatten ausgesät und am Folgetag mit den Reportergenkonstrukten transfiziert. Die Transfektionsdauer betrug je nach Versuchskonzept 4 bis 24 Stunden. Als Reportergen wurde das Luziferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* eingesetzt. Über die am Folgetag photometrisch bestimmte Firefly - Luziferase - Aktivität kann auf die Menge des transkribierten Reportergens geschlossen werden und so ein Eindruck über die Aktivität des in den

Vektor einklonierten Promoterfragments gewonnen werden. Die Lyse der Zellen sowie die Messung der Firefly – Luziferase – Aktivität erfolgte unter Einsatz des Dual – Luciferase® - Reporter Assay Systems (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers in einem Monolight Luminometer (EG Berthold, Bad Wilbach). Zur Bestimmung des Einflusses bestimmter Transkriptionsfaktoren wurden je nach Versuchsaufbau zusätzlich Überexpressionskonstrukte eingesetzt. Um gleiche Plasmid – DNA - Mengen zu transfizieren wurden die Ansätze mit den entsprechenden Leervektoren auf die maximal eingesetzte DNA – Menge aufgefüllt. Die eingesetzte Plasmid – DNA - Menge variierte je nach Zelllinie und Versuchskonzeption, sie werden daher im Ergebnisteil gesondert beschrieben. Die Transfektionen wurden in Triplikaten durchgeführt, die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und als x-fache Anstiege zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle dargestellt. Auftretende Signifikanzen wurden durch Student's t-Test berechnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.1.2 Transfektion mittels Kalziumphosphatpräzipitation

Zur transienten Transfektion von AGS wurden 50.000 Zellen pro Multiwell 24 – Well Gewebekulturplatte ausgesät und am Folgetag mit je 500 ng des Reporterplasmids sowie in Überexpressionsexperimenten mit der gleichen Menge des Überexpressionskonstruktes transfiziert. Die Plasmidansätze wurden hierzu in 26 μl H_2O gelöst und im Anschluß mit 3,9 μl 2M Kalziumchlorid sowie 31,3 μl 2x DNA – Präzipitationspuffer (50 mM HEPES; 1,5 mM Na_2HPO_4 ; 10 mM KCl; 280 mM NaCl; 12 mM Glucose; pH 7,05) versetzt. Im Anschluss wurden sie zur Ausbildung von Präzipitaten bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Pro Schale wurden 62,6 μl des Transfektionsansatzes verwendet, die Transfektionsdauer betrug hier 4h und wurde bei 37°C unter 5% CO_2 durchgeführt.

4.1.3 Transfektion mittels Effectene®

Alle verwendeten Zelllinien ließen sich durch Effectene® Transfection Reagent (Qiagen, Hilden), einer auf Lipid DNA – Komplexbildung basierenden Transfektionsmethode, transfizieren. Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers bei 37°C unter 5% CO_2 durchgeführt. Transfektionen in SL-2 wurden bei 25°C unter atmosphärischem CO_2 ausgeführt. In den unterschiedlichen Zelllinien wurden je nach Versuchskonzept unterschiedliche Mengen der Plasmid – DNA eingesetzt, diese werden daher gesondert im Ergebnisteil beschrieben. Es wurden 8 μl Enhancer-Puffer sowie 6 μl Effectene-

Reagenz pro μg zu transfizierender DNA eingesetzt, die Transfektionsdauer variierte im Anschluss je nach verwendeter Zelllinie zwischen 4 und 24h.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Elektrophoretische Auftrennung von RNA und DNA-Fragmenten

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach molekularer Größe in horizontalen Agarose-TBE-Gelen (10x TBE-Puffer: 54,4 g Tris Base; 27,4 g Borsäure; 20 ml EDTA 0,5M, pH8,0 auf 500 ml mit Wasser auffüllen). Zur Visualisierung wurde den Gelen 5 μl Ethidiumbromid auf 100ml Agarosegel zugesetzt, hierdurch erfolgte eine durch UV-Licht detektierbare Interkalierung der Basen. Die Proben wurden je nach Größe des zu detektierenden Fragmentes entweder mit einem DNA-Ladepuffer auf Bromphenolblau- oder auf Xyancyanolblau-Basis auf die Gele aufgetragen und bei 110 V über 45 min aufgetrennt. Zur Größenbeurteilung der Fragmente wurden als Vergleichsmarker DNA-Ladder der Größen 50 bp, 100 bp sowie 1000b (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Die Detektion erfolgte im Anschluss an die Auftrennung unter UV-Licht.

4.2.2 Präparation von Total-RNA

Nach vollständiger Lyse der Zellen in 500 μl Trizol© (Invitrogen, Karlsruhe) wurde das Zellysat mit 100 μl Chloroform versetzt und über 3 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt mit 8500 U/min über 10 min. Hierauf wurde der Überstand abgenommen und mit 250 μl Isopropanol über 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Die Ansätze wurden darauf erneut bei 4°C über 10 min zentrifugiert. Das hierbei entstandene Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gereinigt und getrocknet. Die Resuspension der präparierten RNA erfolgte in Eppendorf Molecular Water©, die Lagerung bei -80°C. Die Bestimmung der Konzentration der so gewonnenen RNA erfolgte in einem UV-VIV Spectrophotometer von Shimadzu, Modell UV mini 1240 über eine Messung der optischen Dichte bei 260nm in einer Quarzküvette. Im Anschluss wurde eine weitere Bestimmung der OD bei 280nm mit Bildung des Quotienten $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ zur Qualitätsprüfung der präparierten RNA durchgeführt.

4.2.3 Synthese von cDNA durch Reverse Transkription

Die reverse Transkription zur Synthese von cDNA erfolgte mit Hilfe des Superscript-Kits (Invitrogen, Karlsruhe). Hierzu wurden jeweils Mengen zwischen 0,5 μg und 1 μg

Gesamt-RNA eingesetzt und durch Eppendorf Molecular Water© auf ein Volumen von 8µl aufgefüllt. Im Anschluss wurde je 1µl 10nM dNTP sowie 1µl Oligo-dT (0,5µg/µl) zugegeben und über 5 min in einem Thermal Cycler 480 von Perkin Elmer bei 65°C inkubiert. Hierauf erfolgte eine Zugabe von 2µl 10xRT-Puffer, 4µl 25 mM MgCl₂, 2µl 0,1 M DTT und 1µl RNase Out (40U/µl). Nach einem weiteren Inkubationsschritt von 2 min bei 42°C erfolgte die Zugabe von 1µl Superscript II (50U/µl). Nach weiteren 50 min bei 42°C wurde die Reaktion über 15 min bei 70°C abgestoppt und die Ansätze mit Eppendorf Molecular Water© auf 50µl aufgefüllt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

4.2.4 Quantitative Real-Time RT-PCR (Taqman ®)

Die Quantifizierung von exprimierten Genen auf mRNA-Ebene erfolgte mittels quantitativer Real-Time RT-PCR durch Einsatz eines Stratagene MX3000P Cyclers. Zur Durchführung wurden genspezifische Forward- und Reverse-Primer sowie FAM (6-carboxyfluorescein) -markierten Sonden eingesetzt. Die verwendeten Primer und Sonden sind gesondert in **Tab. 2** aufgeführt. Die eingesetzten Reagenzien entstammten einem Eurogentec qPCR Core Kit, pro Ansatz wurden hierzu je 7,5pmol des Forward- und des Reverse-Primers, 2,5pmol der FAM-markierten Sonde sowie 2,5µl 10xPuffer, 2,5µl 50mM MgCl₂, 1µl 5mM dNTPs und 0,125 µl HotStart Taq eingesetzt. Dies wurde mit 15,25 µl Eppendorf Molecular Water© aufgefüllt und mit 2µl der zu quantifizierenden cDNA versetzt. Die Aktivierung der Taq-Polymerase erfolgte im Cycler bei 95°C über 10min, anschließend erfolgte die Messung über 45 Zyklen von je 30s bei 95°C und 60s bei 60°C. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich von ΔC_T -Werten, diese wurden auf das gleichzeitig bestimmte Housekeeping-Gen *β-Actin* oder *gapdh* durch Berechnung von ΔC_T normalisiert.

	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	Probe (5'-Fam → 3'-Tamra)
<i>vegfr-3</i>	<i>gctgagaccctgggtcct</i>	<i>ctatgcctgctctctatctgctcaa</i>	<i>acgacctacaaaggctctgtggacaacca</i>
<i>gapdh</i>	<i>gaaggtgaaggtcggagtc</i>	<i>gaagatgggatgggatttc</i>	<i>caagcttcccgttctcagcc</i>
<i>β-actin</i>	<i>tgattgttacaggaagtcctt</i>	<i>gggagaggactgggcat</i>	<i>cctcctaaaagccacccttctctcta</i>

Tabelle 2: Primer- und Sondensequenzen für quantitative RT-PCR

Bei zuvor stimulierten Ansätzen erfolgte die Darstellung als relativer Anstieg zur unstimulierten Kontrolle. Die Bestimmung erfolgte in drei von einander unabhängigen Experimenten, Signifikanzen wurden unter Verwendung des Student's t-Test berechnet (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2.5 DNA-Konstrukte und Reportergenplasmide

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war ein Fragment von 918bp aus der 5'-flankierenden Region des humanen *vegfr-3*-Gens isoliert worden. Hierzu wurde unter Verwendung eines Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech, Heidelberg) humane genomische DNA mit den beiden im ersten Exon des *vegfr-3*-Gens (NM_002020) lokalisierten genspezifischen Primern *vegfr-3*(-859) und *vegfr-3*(+59) amplifiziert. Das 0,9 kb DNA Fragment wurde in den promoterlosen Luziferase-Reportergenvektor pGL3 (Promega, Mannheim) subkloniert. Das so entstandene Reportergenkonstrukt *vegfr-3*(- 859/+59) wurde durch 5'-Deletion unter Verwendung von entsprechenden 3'- und 5'-Primern sukzessive verkürzt. Die entstandenen Deletionskonstrukte wurden in transienten Transfektionen zur Untersuchung der basalen transkriptionellen Promoterregulation eingesetzt. Das *vegfr-3*(- 1876/+59) Konstrukt wurde durch Anfügen eines -1876/-856 Fragments an das -859/+59 Fragment generiert (GenBank accession no. GU733442). Die in der Arbeit verwendeten Reportergenkonstrukte sind in **Tab. 3** wiedergegeben.

4.2.5.1 Klonierung von Promoterfragmenten in Reportergenvektoren und Erstellung von Promotermutanten

Das Minimalfragment *vegfr-3*(-101/-66) wurde in das heterologe Promotersystem pT81-Luc (150) subkloniert. Der Vorteil des heterologen Promotersystems pT81-Luc ist der enhancerlose, aus Herpes simplex Virus stammende TK- (Thymidinkinase-) Promoter. Dadurch ist es möglich, die Aktivität des einklonierten Konstruktes ohne störende Einflüsse anderer Enhancer zu untersuchen. Außerdem wurden gezielt mutierte Varianten des Minimalfragments hergestellt, in deren veränderten Sequenzen potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren bestanden. Die Basensequenzen der einklonierten Oligonukleotide sind in **Tab. 4** wiedergegeben. Es wurden die beiden GC-reichen Elemente der Sequenz durch Veränderung multipler Basen in zwei

Name	Beschreibung	Referenz
pGL3 Basic	Reportergenvektor	Promega, Mannheim
<i>vegfr-3</i> (-1876/+59)	in PGL3	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe
<i>vegfr-3</i> (-859/+59)	in PGL3, 5'-Deletionskonstrukt	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe
<i>vegfr-3</i> (-594/+59)	in PGL3, 5'-Deletionskonstrukt	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe
<i>vegfr-3</i> (-319/+59)	in PGL3, 5'-Deletionskonstrukt	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe
<i>vegfr-3</i> (-198/+59)	in PGL3, 5'-Deletionskonstrukt	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe
<i>vegfr-3</i> (-113/+59)	in PGL3, 5'-Deletionskonstrukt	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe
<i>vegfr-3</i> (-42/+59)	in PGL3, 5'-Deletionskonstrukt	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe
pT81-Luc	Reportergenvektor mit enhancerlosem Tk-Promoter	(150)
<i>vegfr-3</i> (-101/-32)	in pT81-Luc	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe
<i>vegfr-3</i> (-101/-66)	in pT81-Luc, Minimalkonstrukt	Diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-101/-66) mt1	in pT81-Luc, Mutation der 5'-GC-Box	Diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-101/-66) mt2	in pT81-Luc, Mutation der 3'-GC-Box	Diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-101/-66) mt3	in pT81-Luc, Mutation der 5'- und 3'-GC-Box	Diese Arbeit
pPac Ubx	Expressionsvektor in <i>D. melanogaster</i>	(151)
pPac-Sp1	Sp1-cDNA in pPac	(151)
pPac-Sp3	Sp3-cDNA in pPac	(152)
pPac-Sp1-DBD	dominant-negativ Sp1 in pPac (nur DBD, keine AD)	(153)
pPac-Sp3-DBD	dominant-negativ Sp3 in pPac (nur DBD, keine AD)	(152)
Gal4-Luc	Reportergenvektor mit 5x Gal4-Bindestellen	(154)
Gal4-Sp1	Gal4-DBD mit Sp1-AD	(153)
Gal4-Sp3	Gal4-DBD mit Sp3-AD	(153)

Tabelle 3: Reportergenkonstrukte für transiente Transfektionen.

Mutanten jeweils einzeln und in der Doppelmutante gemeinsam verändert, um so die Funktionalität der für die Bindung von Transkriptionsfaktoren essentiellen Bereiche

aufzuheben (Tab. 4). Die mutierten Bereiche sind in der Tabelle fett gedruckt. Die Inserts wurden zuvor als komplementäre Einzelstränge synthetisiert, zusätzlich zu den spezifischen Basen des Inserts wurden an die jeweiligen Enden für die Restriktionsenzyme XhoI und HindIII spezifische Bindungssequenzen angefügt. Zur Überprüfung des Klonierungserfolgs erfolgte nach erneutem Restriktionsenzymverdau eine Sequenzierung des jeweiligen Konstrukts.

Name	Sequenz (5'→3')
<i>vegfr-3(-101/-32)</i>	tcccgggcccgcctccggccccgccccgccccgccccgccccagccagccggcgcccgcggacactt
<i>vegfr-3(-101/-66)</i>	tcccgggcccgcctccggccccgccccgccccgccc
<i>vegfr-3(-101/-66) mt1</i>	tcccg tttt cgct at cggccccgccccgccccgccc
<i>vegfr-3(-101/-66) mt2</i>	tcccgggcccgcctccgg cttt cgct tt cgct tt cgct
<i>vegfr-3(-101/-66) mt3</i>	tcccg tttt cgct at cgg cttt cgct tt cgct tt cgct

Tabelle 4: Oligonukleotidsequenzen für EMSA (Sonde/Kompetition) und Subklonierung in das heterologe Promotersystem pT81-Luc. Mutationen sind fett gedruckt.

4.2.5.2 Annealing von Oligonucleotiden

Vor ihrem Einsatz für die Klonierung mussten die als Einzelstränge synthetisierten Sequenzen hybridisiert werden. Hierzu wurden je 5µg der komplementären Einzelstränge eingesetzt, auf 50µl mit Wasser aufgefüllt und für 5min auf 95°C erhitzt. Im Anschluss kühlten sich die Proben langsam auf Raumtemperatur ab. Auf diesem Wege lagerten sich die komplementären Stränge aneinander. Der Erfolg dieses Annealing wurde anschließend durch Auftragen auf ein TBE-haltiges Agarosegel überprüft, indem die Wanderungsgeschwindigkeit der Doppelstränge mit der der jeweiligen Einzelstränge verglichen wurde.

4.2.5.3 Phosphorylierung des Inserts

Da es sich bei den synthetisch hergestellten Inserts um dephosphorylierte Einzelstränge handelte, war es notwendig, die zu klonierenden Fragmente zuvor zu phosphorylieren. Dies geschah durch Verwendung von T4-Polynukleotid-Kinase (Invitrogen, Karlsruhe). Hierzu wurden 2µl der zuvor durch Annealing aneinander

gelagerten Oligonukleotide mit 1mM ATP (Adenosintriphosphat), 10U T4-Polynukleotid-Kinase, 2µl des zugehörigen 5xT4-Polynukleotidkinase-Puffers und 4µl H₂O über 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms durch Inkubation der Proben über 10 min bei 70°C.

4.2.5.4 Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Aufreinigung des Leervektors

Um einen Leervektor mit den zum Insert passenden Bindungssequenzen zu erhalten, war es nötig, diesen zuvor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen zu verdauen. Hierfür wurden 1µg des Vektors, je 10U der Restriktionsenzyme *XhoI* und *HindIII* sowie 2µl des zugehörigen 10xRestriktionspuffers mit 15µl H₂O versetzt und bei 37°C über mindestens 2 Stunden inkubiert. Um eine Religation des Vektors zu verhindern wurde im Anschluss an den Verdau eine Dephosphorylierung des linearisierten Vektors durchgeführt. Dies geschah durch Zugabe von 2U von Alkalischer Phosphatase, Shrimp (SAP, Roche, Mannheim) sowie 6µl des zugehörigen 10xPuffers und anschließender Inkubation bei 37°C über 30min. Das Produkt des Restriktionsverdaus wurde nun auf ein TBE-haltiges Agarosegel aufgetragen, unter UV-Licht ausgeschnitten und durch Einsatz eines Gel-Extraktions-Kits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Zur Kontrolle wurde die Wanderungsgeschwindigkeit des linearisierten Vektors mit der des unverdauten durch erneute Gelelektrophorese verglichen.

4.2.5.5 Ligation von Insert und Leervektor

Um das optimale Verhältnis zwischen Vektor und Insert für den Ligationsansatz zu wählen, ist es notwendig, die Anzahl der einzusetzenden Moleküle zu berechnen. Dies geschah mit Hilfe der folgenden Formeln:

$$\text{DNA-Menge[pmol]} = \text{Masse[pg]} / (660[\text{g/mol}] \times \text{Anzahl der Basenpaare})$$

$$\text{DNA-Menge}_{\text{Insert}} = 5 \times \text{DNA-Menge}_{\text{Vektor}}$$

$$\text{Masse}_{\text{Insert}}[\text{ng}] = 5 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}}[\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}}[\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}}[\text{bp}]$$

Es wurden jeweils 25ng des Vektors eingesetzt, die Ligation erfolgte durch Einsatz von 1U T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe) und 5µl des zugehörigen 2xPuffers bei 16°C über Nacht. Zur Kontrolle der Ligationseffizienz wurde außerdem ein Ansatz ohne das zu klonierende Insert mit den Ligationsenzymen inkubiert.

4.2.5.6 Transformation von Plasmiden in *E.coli*

Die Transformation von Plasmiden erfolgte in *E.coli* XL1-Blue Subcloning Grade (Stratagene, La Jolla, USA). Die verwendeten Plasmide enthielten ein Resistenzgen für Ampicillin. Hierzu wurden die Bakterien zur Erhöhung der Transformationskompetenz mit 1,42M β -Mercaptoethanol versetzt und 10min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l der *E.coli* mit 5 μ l des Ligationsansatzes über 30min auf Eis inkubiert. Hierauf folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s, danach wurden die Ansätze wiederum für 2min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900 μ l vorgewärmtem LB-Medium wurden die Proben über 60min bei 37°C unter Schütteln inkubiert, anschließend wurden die Ansätze auf mit 100 μ g/ml Ampicillin (Sigma Aldrich, Taufkirchen) versetzten LB-Agar-Platten (1% NaCl; 1% Bactotrypton, 0,5% Hefeextrakt; 1,5% (w/v) Agar-Agar, pH 7,0) ausplattiert und für 17h bei 37°C inkubiert.

4.2.5.7 Plasmidpräparation mittels Mini-Prep©

Nach Inkubation der Agarplatten wurden einzelne Klone gepickt und anschließend in mit 100 μ g/ml Ampicillin versetzten LB-Medium angezogen. Die Plasmidpräparation erfolgte durch Einsatz eines JETquick® Plasmid Miniprep Spin Kits (Genomed, Bad Oeynhausen) nach Angaben des Herstellers. Zur Kontrolle wurden die so gewonnenen Plasmide mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Hind*III verdaut und anschließend die einzelnen Restriktionsfragmente durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurde bei ausgewählten Klonen der Klonierungserfolg durch Sequenzierung der Basenfolge überprüft und mit Hilfe der Software Vector NTI (Invitrogen, Karlsruhe) ausgewertet. Die Lagerung positiver Klone erfolgte als Dauerkultur in 30% (v/v) Glycerol bei -80°C.

4.2.5.8 Plasmidpräparation mittels Maxi-Prep©

Zur Präparation von Plasmiden zum Einsatz in Transfektionsexperimenten wurden Bakterien aus der entsprechenden Dauerkultur über Nacht in mit 100 μ g/ml Ampicillin versetzten LB-Medium angezogen. Am Folgetag erfolgte die Plasmidgewinnung durch Einsatz eines JETquick® Plasmid Maxiprep Kits (Genomed, Bad Oeynhausen) nach Angaben des Herstellers. Zur Kontrolle wurde das so präparierte Plasmid mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf die Größe seiner Fragmente analysiert.

4.2.6 Untersuchung von Zellen auf Mycoplasmenkontamination mittels PCR

Zur Untersuchung der verwendeten Zelllinien auf eventuelle Kontamination durch Mycoplasmen wurde in regelmäßigen Abständen eine PCR mit Mycoplasma-spezifischen Primern durchgeführt. Hierzu wurden 2,5µl der zu untersuchenden Zellsuspension mit 2,5µl des zugehörigen 10x PCR-Puffers, 1µl 10mM dNTPs, 0,5µl Taq-Polymerase sowie den spezifischen Primern Myco1 und Myco2 und 19µl H₂O versetzt. Die Sequenzen der eingesetzten Primer sind nachfolgend in **Tab.5** beschrieben. Die PCR wurde in einem RoboCycler Gradient 96 von Stratagene durchgeführt. Sie lief über einen Zyklus von 5 min bei 95°C zur Aktivierung der Taq-Polymerase, anschließend folgten 40 Zyklen mit drei Temperaturschritten von 45 s bei 94°C, 45 s bei 55°C und 60 s bei 72°C. Hierauf folgte ein weiterer Zyklus für 10 min bei 72°C.

Name	Sequenz (5'→3')
Myco1	<i>gggagcaaacaggattagataccct</i>
Myco2	<i>tgcaccatctgtcactctgttaacctc</i>

Tabelle 5: Basensequenzen der zur Mycoplasmentestung eingesetzten Primer.

4.2.7 Electro Mobility Shift Assay (EMSA)

4.2.7.1 Hybridisierung und radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Da Kernproteine an doppelsträngige DNA binden, war es für den Einsatz in EMSA-Studien notwendig, ein Annealing der als Einzelstränge synthetisierten Oligonukleotide durchzuführen. Dies wurde bereits unter **4.2.5.2** bei der Klonierung des Minimalfragments *vegfr-3(-101/-66)* sowie seiner Mutanten in das heterologe Promotersystem pT81-Luc beschrieben und hier in analoger Weise durchgeführt. In EMSA-Experimenten verwendete Oligonukleotide sind in **Tab. 4** wiedergegeben. Die radioaktive Markierung der in EMSA-Studien als Sonden verwendeten doppelsträngigen Oligonukleotide erfolgte durch enzymatischen Austausch der 5'-Phosphatgruppe durch radioaktives [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (Amersham Biosciences, Braunschweig) durch Einsatz der T4-

Polynukleotid-Kinase (Invitrogen, Karlsruhe). Es wurden 200ng der hybridisierten Oligonukleotide mit 2µl [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP zusammen mit 5U T4-Polynukleotid-Kinase und dem zugehörigen T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20µl eingesetzt. Die Ansätze wurden über 30 min bei 30°C inkubiert und im Anschluss durch Einsatz eines Nucleotide Removal Kits (Qiagen, Hilden) nach den Empfehlungen des Herstellers aufgereinigt.

4.2.7.2 Präparation von Kernextrakten

Zur Präparation nukleärer Kernextrakte aus Zellkulturen wurden jeweils 10^6 Zellen in 10cm-Schalen ausgesät und je nach Versuchsaufbau ggf. am Folgetag stimuliert. Hierzu wurden die Zellen je nach Versuchskonzept über 72h mit 1µM sowie 5µM 5-Aza dC und/oder über 24h mit 100ng/ml TSA behandelt. Bei der Stimulation mit 5-Aza dC wurde täglich das Medium mit dem Stimulationsansatz erneuert, bei gleichzeitiger Behandlung mit TSA erfolgte die Stimulation simultan über die letzten 24h. Die Kernpräparation erfolgte nach folgendem Protokoll. Nach Entfernen des Zellmediums wurden die Zellen zweifach mit PBS (Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen und nach Zugabe von 300µl Puffer A (10mM Tris pH 7,9; 10mM KCl; 1,5mM MgCl_2 ; 10% (v/v) Glycerol, 10mM K_2HPO_4 ; 1mM Na_3VO_4 ; 10mM NaF; 0,5mM DTT; 0,5mM PMSF) mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturschale gelöst und suspendiert. Nach Zugabe von 0,125 % (v/v) Nonidet P-40 (Boehringer, Mannheim) wurden die Ansätze kurz zur Dissemblierung der Zellmembran auf Eis inkubiert und anschließend über 10 min bei 4°C mit 4300 U/min zentrifugiert. Nach Abnahme des Zytoplasmaüberstandes wurde die Kernfraktion im Pellet in 40µl Puffer C (20mM Tris pH 7,9; 0,42mM NaCl; 1,5mM MgCl_2 ; 0,2mM EDTA; 10% (v/v) Glycerol, 10mM K_2HPO_4 ; 1mM Na_3VO_4 ; 10mM NaF; 0,5mM DTT; 0,5mM PMSF) aufgetrennt. Die Trennung von restlichen Zellbestandteilen und Kernmembranresten erfolgte durch weitere Zentrifugation über 10 min bei 4°C mit 12000 g. Der Proteingehalt wurde im Anschluß nach der Methode von Bradford 1976 unter Verwendung eines Protein Assay Kits® von BioRad Laboratories (Hercules, USA) gemessen, die Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.2.7.3 EMSA

Zur Identifizierung bindender Kernproteine an eine radioaktiv markierte Sonde wurden 5µg des Kernextrakts mit der ^{32}P -markierten DNA mit einer Aktivität von 50000 cpm in Shift-Puffer (20mM HEPES pH 8,4; 60mM KCl; 10% (v/v) Glycerol; 1mM ZnCl_2), 10µg

BSA und 5mM DTT in einem Gesamtvolumen von 20µl über 30 min bei 30°C inkubiert. In Verdrängungsexperimenten wurden die Kernproteine vor Zugabe der Sonde mit 200fachem molarem Überschuss nicht-radioaktiv-markierter doppelsträngiger Oligonukleotide über 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Sämtliche als Sonden und/oder Verdrängungssequenzen eingesetzten Oligonukleotide sind in **Tab. 4** aufgeführt. In Supershift-Experimenten erfolgte vor Zugabe der radioaktiv markierten Sonde eine Inkubation des Reaktionsansatzes mit jeweils 2µg des jeweils spezifischen Antikörpers gegen Sp1 / Sp3 (Pep 2 / D-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) über 15 min bei Raumtemperatur. Die eingesetzten Antikörper sind in **Tab. 6** aufgeführt. Je nach Größe der zu detektierenden Banden wurden 6-8% (w/v) native 0,5x TBE-Polyacrylamidgele (0,5x TBE-Puffer: 50mM Tris-Borat; 1mM EDTA) eingesetzt, die nach einem Vorlauf von 1 h bei 100V mit dem Reaktionsansatz beladen wurden. Anschließend erfolgte die Auftrennung über 2 h bei einer Spannung von 200V. Hierauf wurde das Gel mit Hilfe einer Vakuumpumpe bei 85°C getrocknet und im Anschluss bei -80°C unter Einsatz einer Verstärkerfolie (Kodak BioMax Intensifying Screen®, Amersham, Biosciences, Braunschweig) auf Kodak BioMax MR Films® (Amersham, Biosciences, Braunschweig) für 24-36 h exponiert und anschließend entwickelt.

Name	Bezugsquelle
Sp1 (PEP-2)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Sp3 (D-20)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Tabelle 6: In EMSA-Studien eingesetzte Antikörper.

4.2.8 Stimulationsexperimente mit TSA und 5-Aza dC

In Stimulationsexperimenten wurden die Zellen im Anschluss an die Transfektion der Reportergergenkonstrukte über 24 Stunden in serumfreiem UltraCulture® - Medium (Biowhitaker Inc., Walkersville, MD, USA) unter Zusatz von 2mM Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin gehalten. Die Stimulation erfolgte durch 20ng/ml bis 300ng/ml TSA (Trichostatin A, Sigma Aldrich, Taufkirchen) über 24 Stunden,

anschließend wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität bestimmt. Die unbehandelten Kontrollansätze wurden mit der jeweils entsprechenden Menge DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma Aldrich, Taufkirchen) versetzt. Zur Untersuchung des Einflusses der epigenetischen Regulationsmechanismen Acetylierung und Methylierung auf die Expression von Genen auf RNA-Ebene wurden die Zellen nach Aussaat über 24 Stunden stimuliert. Je nach Zelllinie wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen TSA und/oder 5-Aza dC (5-Aza-2'-Deoxycytidine, Sigma Aldrich, Taufkirchen) behandelt. Da diese in den einzelnen Versuchskonzeptionen variierten, werden sie gesondert im Ergebnisteil beschrieben. Im Anschluss erfolgte die Lyse der Zellen in Trizol© (Invitrogen, Karlsruhe). Die Darstellung erfolgte als x-facher Anstieg zur unbehandelten Kontrolle, Signifikanzen wurden mit Student's t-test errechnet (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5. Ergebnisse

5.1 Strukturelle Charakteristika des *vegfr-3* – Promoters

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe waren 1,9kb des 5'-flankierenden Promoterbereichs des humanen *vegfr-3* – Gens kloniert und durch 5'-Deletionsanalysen ein GC-reiches, für die *vegfr-3* – Transkription essentielles Promoterminimalelement identifiziert worden. Es wurden zwei GC-Boxen bei -100/-86 und -84/-66 identifiziert, welche durch die Zinkfingerproteine Sp1 und Sp3 gebunden und aktiviert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse anhand neuer Versuche überprüft und werden zur Vollständigkeit der Studie gezeigt.

5.1.1 Untersuchung der endogenen Expression des *vegfr-3*-Gens in endothelialen und epithelialen Zelllinien

Die endogene Expression des *vegfr-3* – Gens wurde durch Einsatz von spezifischen Primern und Sonden durch Messung der mRNA – Mengen in einer Auswahl endothelialen sowie der Magenkarzinomzelllinie AGS bestimmt (**Abb. 2A**). Es zeigte sich, dass die endotheliale Zelllinie HMEC-1 sowie die Primärzelllinie HUVEC *vegfr-3* in höherem Maße, die pulmonalendotheliale Zellen HPMEC dagegen nur gering exprimieren. In den außerdem untersuchten Zelllinien EA.hy926 und AGS konnte keine basale Expression des *vegfr-3* – Gens gemessen werden.

5.1.2 Eingrenzung des funktionell relevanten Promoterbereichs durch Transfektionsstudien mit 5'-Deletionskonstrukten

In Transfektionsstudien mit sukzessiv verkürzten 5'-Deletionskonstrukten zeigte sich, dass durch Verkürzung von -1776 zu -319 keine deutliche Änderung der Luciferaseaktivität erreicht werden konnte, weitere 5'-Deletionen bis -113 erhöhten die Reporterogenaktivität um das 18fache (**Abb.2B**). Eine weitere Reduktion auf -98 führte zu keinem signifikanten Rückgang der Luciferaseaktivität, eine Verkürzung auf -42 ergab nur noch eine 2fache Luciferaseaktivität gegenüber dem Leervektor, was zum Schluss geführt hatte, dass ein für die Regulation essentielles Element zur Kontrolle der basalen *vegfr-3*-Transkription innerhalb der Sequenz zwischen -98 und -42 liegen musste. Die Analyse der *vegfr-3*-Promotersequenz zwischen -101 und -32 durch Transfac-Datenbanksuche (155) hatte eine GC-reiche Region mit Teilen von repetitiven Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren ergeben. Diese Sequenz war zur

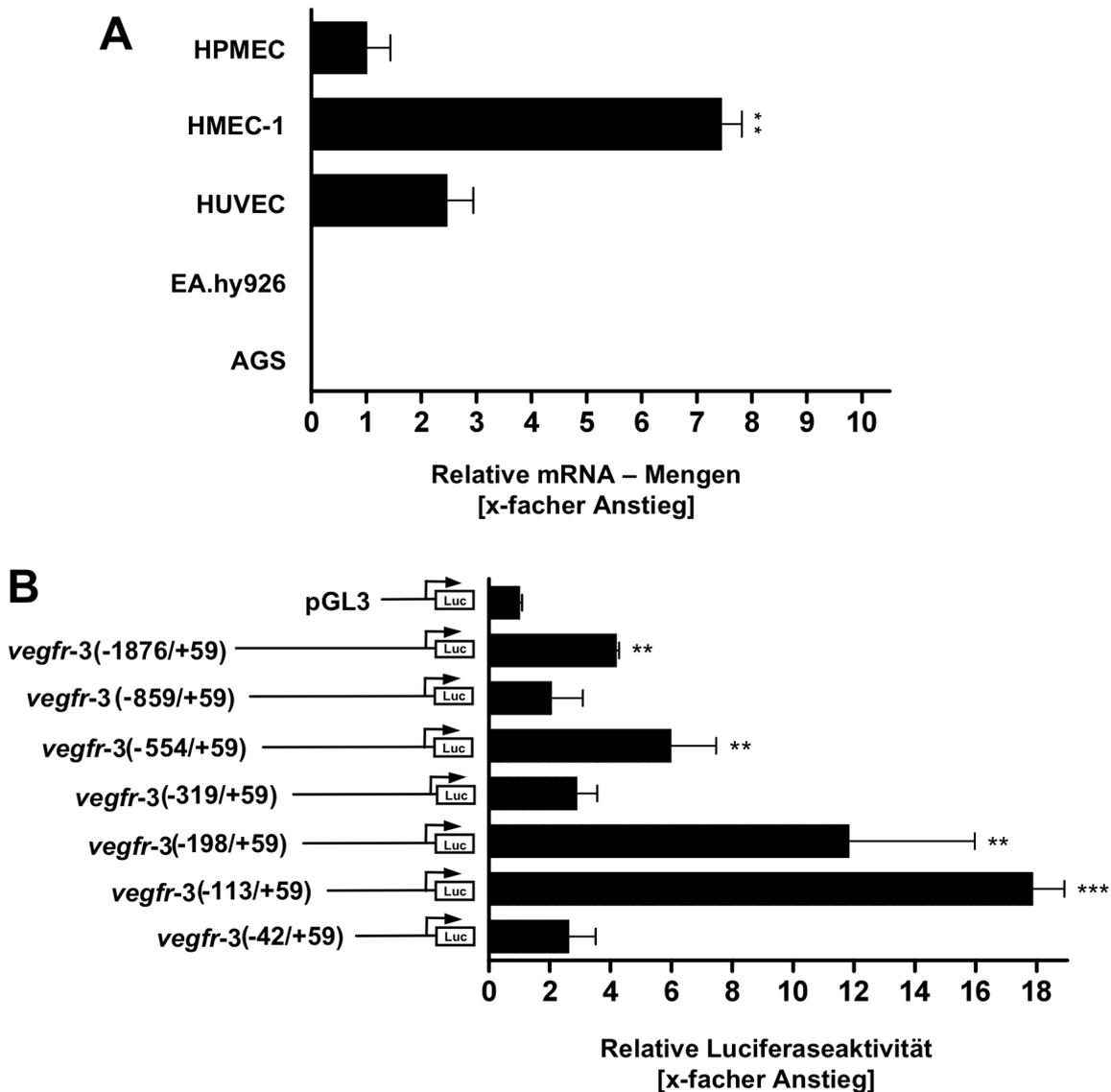


Abbildung 2: Basalexpression des *vegfr-3* – Gens in endothelialen und epithelialen Zelllinien und Eingrenzung des funktionell relevanten Promoterbereichs

A: Unter Verwendung von spezifischen Primern wurde die Expression von *vegfr-3* in verschiedenen Endothelzelllinien und der epithelialen Magenkarzinomzelllinie AGS durch quantitative Realtime RT-PCR bestimmt. Die Darstellung erfolgte als Vielfaches der Expression in der endothelialen Zelllinie HPMEC, die Auswertung geschah unter Verwendung des Student's t-test (** $p < 0,005$). **B:** HMEC-1 Zellen wurden mit einer Serie 5'-Deletionskonstrukten des *vegfr-3*-Promoterbereichs transient transfiziert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Darstellung erfolgte als x-facher Anstieg der mit dem Leervektor pGL3 transfizierten Ansätze. Die Ergebnisse sind als mittlere \pm SEM von drei voneinander unabhängigen Experimente dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Untersuchung der Enhancerkapazität des *vegfr-3(-101/-32)* – Konstrukts in das heterologe, enhancerlose Luciferasereportersystem pT81 subkloniert worden.

5.1.3 Darstellung von Sp1 und Sp3 als bindende Transkriptionsfaktoren durch EMSA – Supershift – Studien

Zur Bestimmung der bindenden Transkriptionsfaktoren an die beschriebenen potentiellen Bindungsstellen innerhalb der minimalen Promotersequenz des *vegfr-3* wurde die Sequenz des *vegfr-3(-101/-66)* (**Abb. 3A**) als radioaktiv markierte Sonde in Electro Mobility Shift Assays (EMSA) - Bindungsstudien mit Kernextrakten der Zelllinie HMEC-1 eingesetzt. Diese wurden im Rahmen der vorliegenden Studie überprüft. Die Bindung der Kernproteine an *vegfr-3(-101/-66)* führte zur Bildung von zwei typischen Kernkomplexen, einem oberen Komplex I und einem unteren Komplex II (**Abb. 3B, Bahn 1**). Um die Identität der die Komplexe bildenden Transkriptionsfaktoren zu klären, wurden spezifische Antikörper gegen Sp1 und Sp3 in EMSA – Supershift – Studien eingesetzt. Der Zusatz des α -Sp1 – Antikörpers führte analog den Voruntersuchungen zu einer Abschwächung der Ausbildung von Komplex I (**Abb. 3B, Bahn 2**) und resultierte in der Ausbildung einer langsamer im elektrischen Feld wandernden Supershift – Bande. Komplex II wurde durch Zugabe von α -Sp1 – Antikörper in seiner Intensität nicht verändert (**Abb. 3B, Bahn 2**). Der Zusatz von α -Sp3 dagegen führte zu einer Abschwächung von Komplex II ohne hier einen Supershift oder eine Abschwächung von Komplex I auszulösen (**Abb. 3B, Bahn 3**). Durch simultanen Einsatz beider Antikörper konnten sowohl Komplex I als auch Komplex II in ihrer Intensität vermindert werden (**Abb. 3B, Bahn 4**).

5.2 Funktionelle Analyse des proximalen *vegfr-3* – Promoters und der bindenden Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3

5.2.1 Transkriptionelle Feinanalyse der funktionell relevanten Minimalsequenz durch Transfektionsstudien im heterologen Promotersystem pT81

Nachdem mittels Transfektionsstudien unter Einsatz von 5'-Deletionskonstrukten der funktionell relevante Promoterbereich identifiziert werden konnte und die funktionelle Relevanz des *vegfr-3(-101/-32)* im heterologen Promotersystem pT81 nachgewiesen

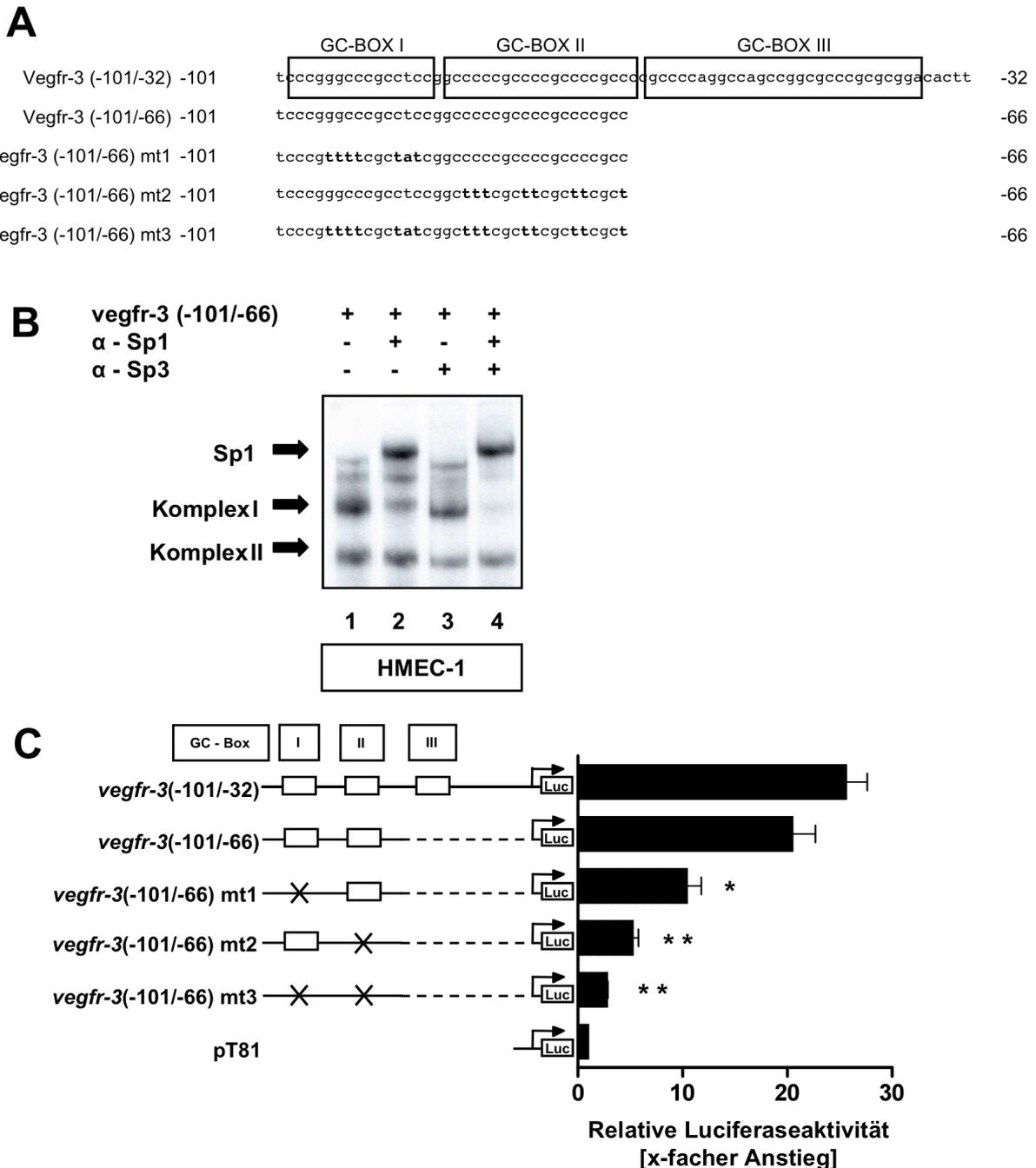


Abbildung 3: Basensequenz des *vegfr-3* Promoterelements und der Mutanten, Eingrenzung des minimalen Promoterbereichs und Darstellung der Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an den *vegfr-3* – Promoter

A: Darstellung der in Transkriptions- und EMSA-Studien verwendeten Basensequenz des *vegfr-3* Promoterelements zwischen -101 und -32 als Wildtyp oder Mutanten. **B:** Darstellung von Bindungs- und Supershift – Analyse der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an *vegfr-3*(-101/-66): Zur Identifikation der an die Sequenz des *vegfr-3*(-101/-66) bindenden Transkriptionsfaktoren wurde Kernprotein der Zelllinie HMEC-1 präpariert und mit ^{32}P -markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden des *vegfr-3*(-101/-66) als radioaktiv markierte Sonde und den spezifischen Antikörpern gegen Sp1 und Sp3 inkubiert. **C:** Die -101/-32 *vegfr-3* Sequenz wurde in das heterologe Promotersystem pT81 subkloniert und durch Transfektionsstudien in HMEC-1 funktionell untersucht. Das Minimalkonstrukt -101/-66 sowie seine Mutanten wurden analog in HMEC-1 transfiziert. GC-reiche Sequenzabschnitte sind als Boxen dargestellt, Mutationen als Kreuze. Die Darstellung erfolgte als x-facher Anstieg der mit pT81 transfizierten Ansätze. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

werden konnte (**Abb. 3C**), wurde im Anschluss daran ein weiter verkürztes Konstrukt *vegfr-3(-101/-66)* im gleichen Promotersystem erstellt (**Abb. 3A**). Außerdem wurden durch selektiven Basenaustausch in den beiden für die Bindung vieler Transkriptionsfaktoren essentiellen Sequenzbereichen mit repetitiven GC-Strukturen, den so genannten GC-Boxen, Mutationen des Wildtyps erstellt (**Abb. 3A**). Hier wurde ein Konstrukt mit der 5'-gerichteten funktionell inaktivierten GC-Box *vegfr-3(-101/-66)mt1*, ein Konstrukt mit der 3'-gerichteten funktionell inaktivierten GC-Box *vegfr-3(-101/-66)mt2* sowie ein Konstrukt mit beidseits inaktivierten GC-Boxen *vegfr-3(-101/-66)mt3* ebenfalls in das Promotersystem pT81 subkloniert und zunächst hinsichtlich ihrer transkriptionellen Aktivität in Transfektionsexperimenten in HMEC-1 untersucht (**Abb. 3C**). Es zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Aktivität des *vegfr-3(-101/-32)* und des *vegfr-3(-101/-66)* bestand, jedoch bei Transfektion der einseitig mutierten Konstrukte deutliche Rückgänge in der Luciferaseaktivität zu messen waren (**Abb. 3C**). Hier war bemerkenswert, dass die 5'-mutierte Sequenz mt1 einen signifikant geringer abgeschwächten Effekt aufwies als das 3'-mutierte Konstrukt mt2. Dagegen war die doppelt mutierte Sequenz mt3 nur geringfügig aktiver als der zur Kontrolle transfizierte Leervektor pT81-Luc (**Abb. 3C**).

5.2.2 Darstellung der funktionellen Relevanz der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 durch Transfektionsstudien in *D. melanogaster* SL-2

Nachdem die Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an das Minimalkonstrukt gezeigt werden konnte, sollten diese Faktoren nun hinsichtlich ihrer funktionellen Relevanz untersucht werden. Hierzu wurden Transfektionsstudien in der Insektenzelllinie *D. melanogaster* SL-2 durchgeführt. Diese Zelllinie zeichnet sich dadurch aus, dass sie für eine Vielzahl mammalischer Transkriptionsfaktorhomologe defizient ist. Es ist so möglich, durch Kotransfektion spezifischer Überexpressionsplasmide die Beteiligung einzelner Transkriptionsfaktoren bei der Expression des untersuchten Gens zu analysieren. Hierzu wurden zunächst 500ng des in das heterologe Promotersystem pT81 subklonierten Konstrukts *vegfr-3(-101/-32)* in Kombination mit ansteigenden Mengen der Überexpressionsplasmide pPAC-Sp1 und pPac-Sp3 kotransfiziert, nach einer Transfektionsdauer von 24h geerntet und hinsichtlich ihrer Luciferaseaktivität gemessen. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu dem mit dem Leervektor kotransfizierten Ansatz die relative Luciferaseaktivität sowohl der in Kombination mit Sp1 als auch mit Sp3 kotransfizierten Zellen deutlich signifikant

anstieg. Durch Einsatz von 250ng konnte bereits eine 30-50fache Steigerung der Aktivität erzielt werden, eine Erhöhung der eingesetzten Menge der Überexpressionplasmide hatte einen weiteren Anstieg der relativen Luziferaseaktivität beider untersuchten Transkriptionsfaktoren zur Folge (**Abb. 4**).

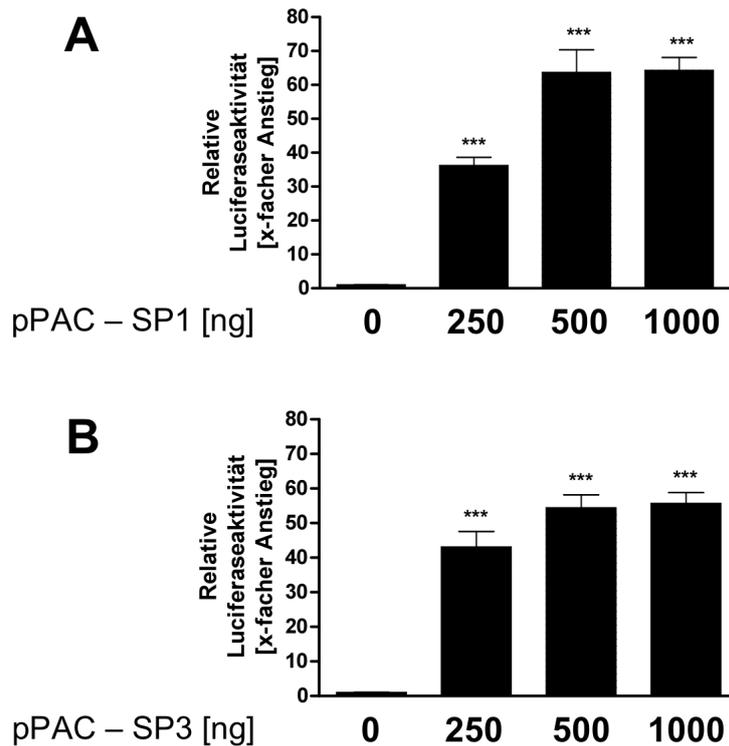


Abbildung 4: Funktionelle Relevanz der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 für die Aktivierung des *vegfr-3* – Promoters

A, B: Funktionelle Analyse des Einflusses von Überexpressionsplasmiden von Sp1 und Sp3 auf den VEGFR-3 – Promotor: *D. melanogaster* SL-2 Zellen wurden mit 500 ng des *vegfr-3*(-101/-32) sowie mit unterschiedlichen Mengen der Expressionsplasmide Sp1(A) sowie Sp3(B) über 24h transient transfiziert. Zur Transfektion gleicher Mengen wurde jeweils mit pPac-Leervektor auf die maximal eingesetzte Plasmidmenge aufgefüllt. Die Abbildung zeigt eines von drei von einander unabhängigen Experimenten, die Darstellung erfolgte als x-facher Anstieg der mit dem Leervektor pPac cotransfizierten Ansätze. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test (**p<0,001).

Um nun den Effekt von Sp1 und Sp3 auf den Bindungsbereich näher zu charakterisieren wurden weitere Transfektionsexperimente unter Einsatz des Minimalkonstruktes *vegfr-3(-101/-66)* sowie seiner drei spezifisch mutierten Konstrukte durchgeführt (**Abb. 5**). Zur Kontrolle wurden hier neben den Überexpressionsplasmiden pPAC-Sp1 und pPAC-Sp3 die entsprechenden dominant-negativen DNA-Bindungsdomänen der beiden Transkriptionsfaktoren eingesetzt. Bei Verwendung des *vegfr-3(-101/-66)* konnte sowohl für Sp1 als auch für Sp3 ein signifikanter, 30-40fach stärkerer Effekt auf die relative Luciferaseaktivität gezeigt werden, der Einsatz der jeweiligen DBD hatte erwartungsgemäß einen Rückgang der Aktivität auf das Niveau des mit dem Leervektor kotransfizierten Ansatzes zur Folge (**Abb. 5A**). Sowohl bei Transfektion des 5'-mutierten Konstruktes *vegfr-3(-101/-66)mt1* (**Abb. 5B**) als auch bei Transfektion des 3'-mutierten Konstruktes *vegfr-3(-101/-66)mt2* (**Abb. 5C**) konnten starke Rückgänge der relativen Luciferaseaktivität detektiert werden. Das 5'-mutierte Konstrukt mt1 zeigte einen relativen Anstieg der Luciferaseaktivität von 15-20 bei Kotranfektion von pPac-Sp1 und einen 7-10fach stärkeren Effekt mit pPac-Sp3 (**Abb. 5B**). Das 3'-mutierte Konstrukt mt2 zeigte dagegen einen weniger stark abgeschwächten Effekt. Hier war ein 25-30facher durch Sp1 sowie ein 18-22facher durch Sp3 vermittelter Anstieg zu messen (**Abb. 5C**). Im Gegensatz dazu war bei Verwendung des doppelt mutierten, ohne funktionell aktive GC-Boxen ausgestatteten Konstrukts *vegfr-3(-101/-66)mt3* ein Rückgang der relativen Luciferaseaktivität auf das Niveau des Leervektors sowohl für Sp1 als auch für Sp3 zu beobachten (**Abb. 5D**).

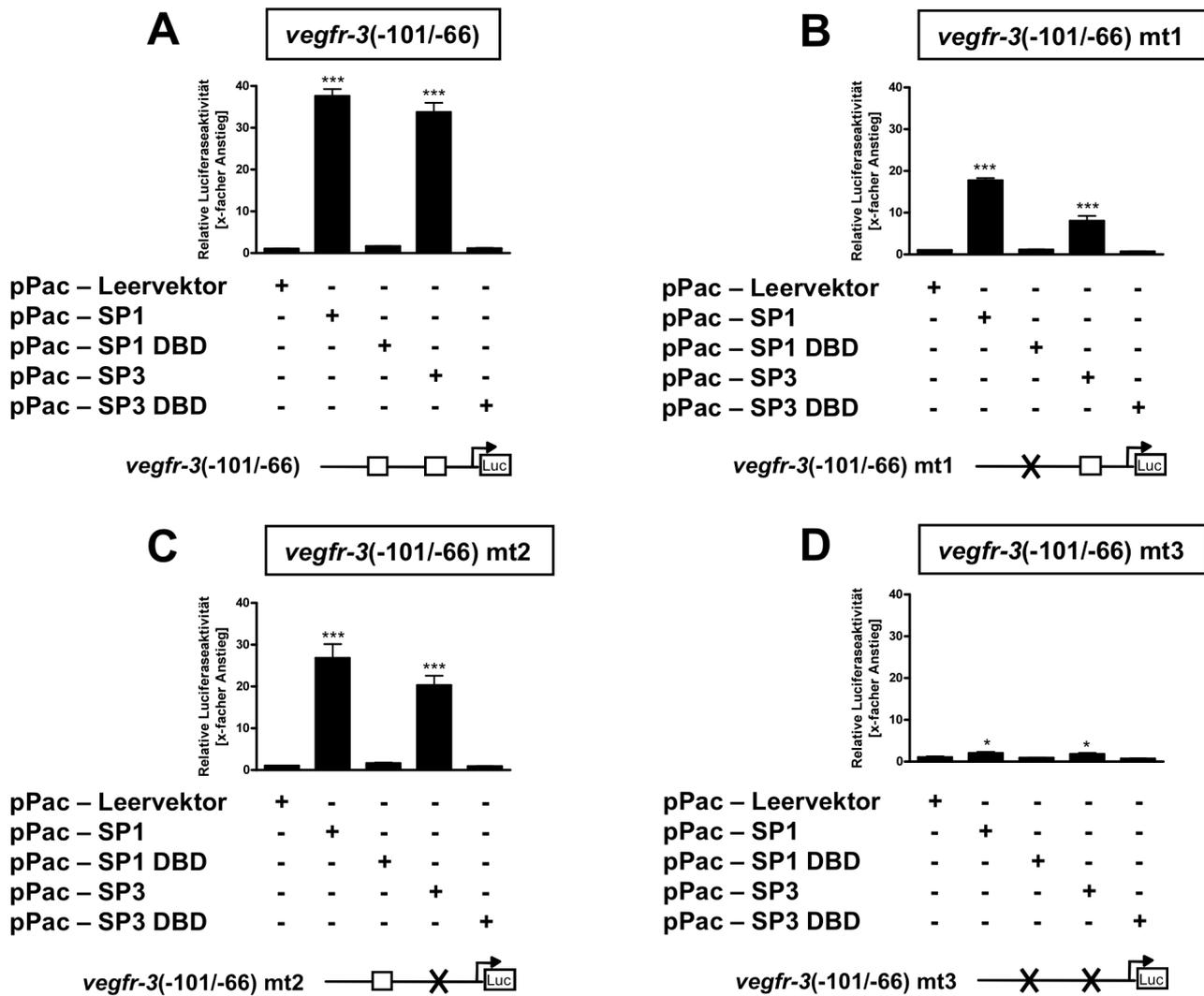


Abbildung 5: Funktionelle Feinanalyse von Sp1 und Sp3 durch Überexpressionsexperimente in SL-2

Drosophila melanogaster SL-2 Zellen wurden mit dem Minimalkonstrukt *vegfr-3(-101/-66)* (A) sowie den in den mutierten Konstrukten *vegfr-3(-101/-66)mt1* (B), *vegfr-3(-101/-66)mt2* (C), *vegfr-3(-101/-66)mt3* (D) transient transfiziert. Zusätzlich erfolgte eine Kotransfektion mit dem Leervektor pPac, pPac-Sp1, pPac-Sp1-DBD, pPac-Sp3 und pPac-Sp3-DBD. Zur Transfektion gleicher Mengen wurde jeweils mit pPac-Leervektor auf analoge DNA-Mengen aufgefüllt. Die Abbildung zeigt eines von drei von einander unabhängigen Experimente. Die Darstellung erfolgte als x-facher Anstieg der mit dem Leervektor pPac cotransfizierten Ansätze. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test (***p<0,001).

5.3 Einfluss der epigenetischen Regulationsmechanismen Methylierung und Acetylierung auf die Expression des *vegfr-3* – Gens in endo- und epithelialen Zelllinien

Da die Sp-Faktoren Sp1 und Sp3 oft in Komplexen mit Histondeacetylasen (HDACs) assoziiert sind und hinsichtlich ihrer transkriptionellen Aktivität durch Methylierung und Acetylierung reguliert werden, erfolgte eine Testung des Einflusses des HDAC-Inhibitors TSA sowie des Methylierungsinhibitors 5-Aza dC auf die Expression des *vegfr-3*-Gens in mehreren, unterschiedlich stark endogen exprimierenden endothelialen und epithelialen Zelllinien.

5.3.1 Untersuchung epigenetischer Regulation des *vegfr-3*-Gens durch Acetylierung

Zur Untersuchung des Einflusses von HDAC-Inhibition auf die Transkription des *vegfr-3* – Gens in Endothelien wurden HMEC-1 - Zellen 24h nach Aussaat auf Ultraculture© gesetzt und mit 50ng/ml, 100ng/ml und 300ng/ml TSA stimuliert. Während die mit 50ng/ml und 100ng/ml stimulierten Ansätzen keine messbare Steigerung der *vegfr-3* – Expression zeigten, war im mit 300ng/ml stimulierten Ansatz eine signifikante Steigerung des Expressionsniveaus des *vegfr-3*-Gens (~6fach) im Vergleich zur unstimulierten, mit analoger Konzentration des Lösungsmittel DMSO behandelten Kontrolle zu messen (**Abb. 6A**). Darüber hinaus führte die Stimulation von HMEC-1 Zellen nach transienter Transfektion mit dem Reportergenkonstrukt *vegfr-3*(-859/+59) zu einer signifikanten Induktion im Vergleich zum Leervektor-transfizierten, mit analoger Konzentration TSA stimulierten, Ansatz (**Abb. 6B**).

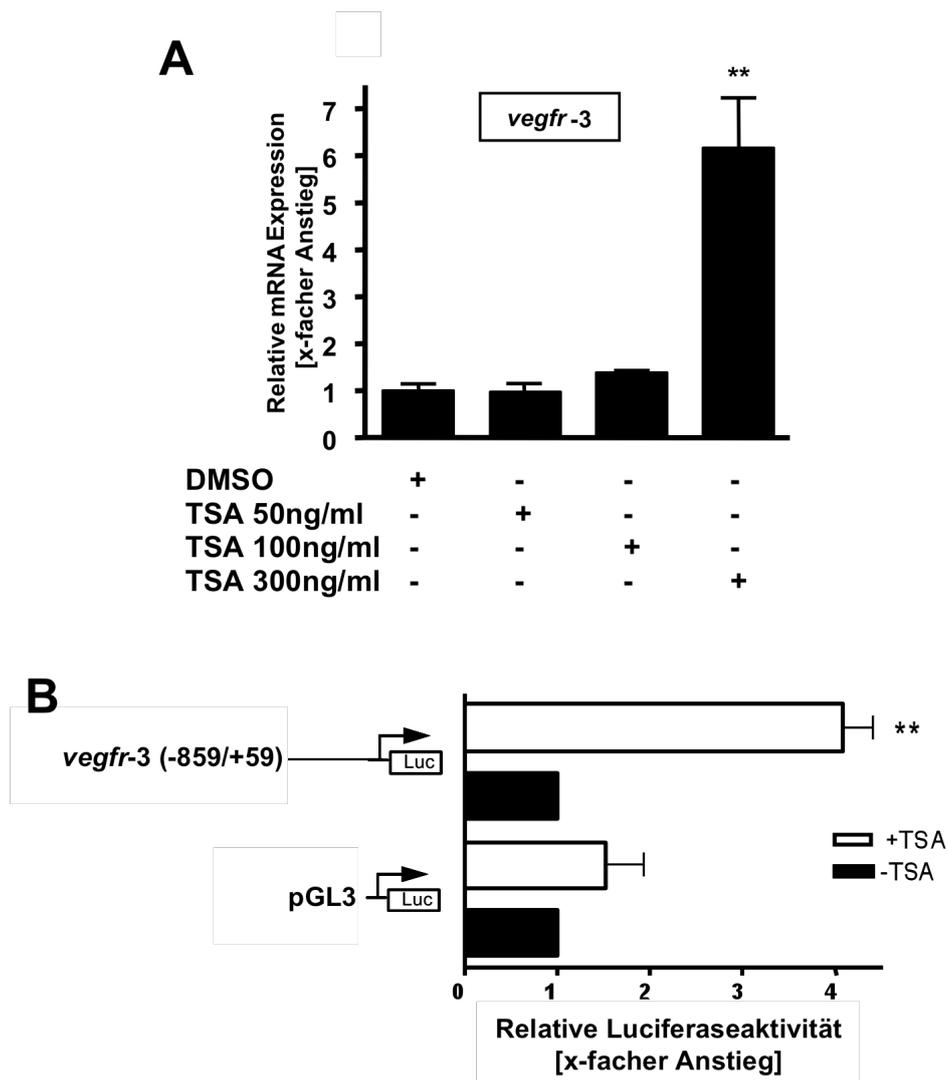
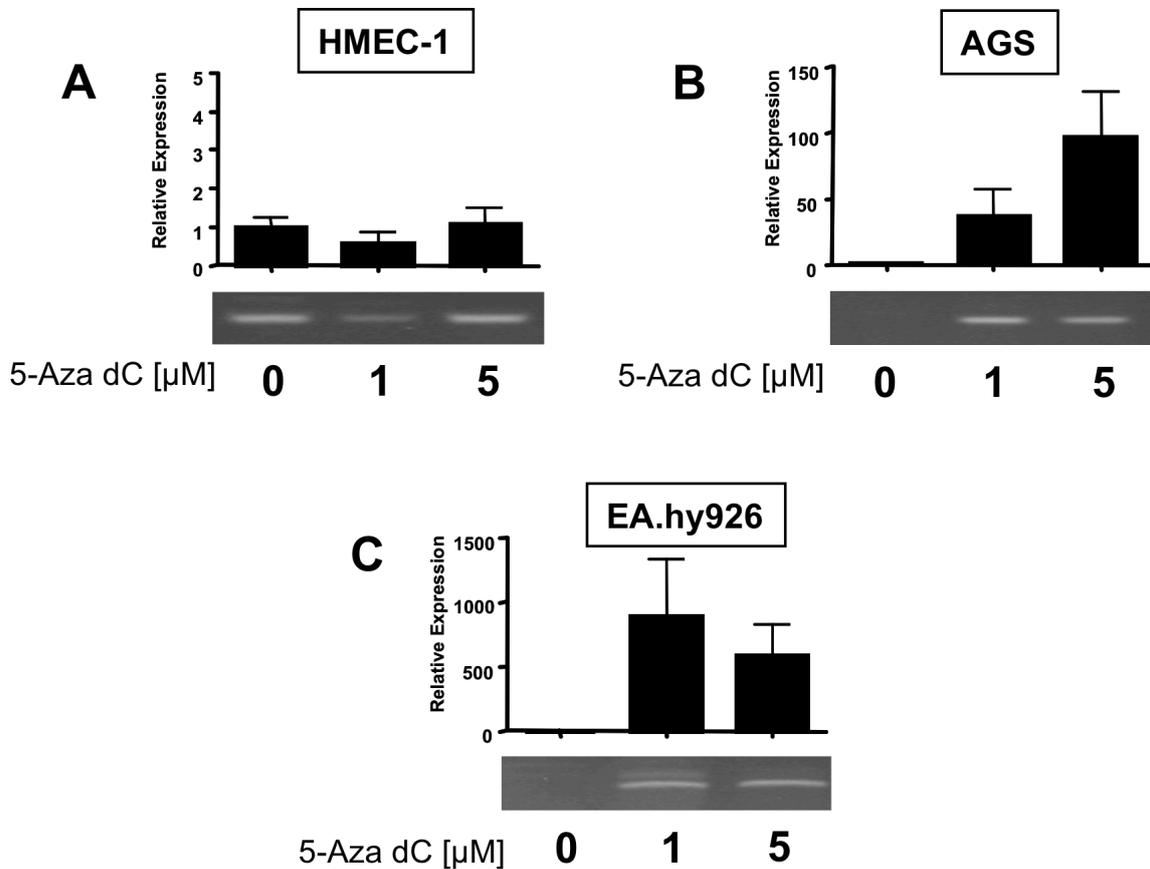


Abbildung 6: Einfluss von Promoteracetylierung auf die *vegfr-3* – Expression

A: HMEC-1 Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen TSA für 24h inkubiert. Anschließend wurde *vegfr-3* mRNA durch RT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung wurde das Housekeeping-Gen β -Actin verwendet, die Expression ist jeweils als Vielfaches der mit der entsprechenden Menge DMSO behandelten Kontrolle angegeben. Die Darstellung zeigt ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten, die Auswertung erfolgte mittels Student's t-Test (**= $p < 0,01$). **B:** HMEC-1 Zellen wurden mit *vegfr-3* (-859/+59) und dem Leervektor pGL3 transient transfiziert. Nach 24stündiger Inkubation mit TSA wurde Luciferaseaktivität bestimmt und zwischen TSA-stimulierten und nicht stimulierten Zellen verglichen. Die Ergebnisse sind als mittlere +/- SEM von drei voneinander unabhängigen Experimente dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test (**= $p < 0,01$).

5.3.2 Untersuchung epigenetischer Regulation des *vegfr-3*-Gens durch Methylierung

Um den Einfluss von Methylierung auf die Expression des *vegfr-3*-Gens zu untersuchen, wurden verschiedene Zelllinien mit unterschiedlichen endogenen Expressionsniveaus mit dem methylierungsspezifischen Inhibitor 5-Aza dC behandelt. Hierzu wurden die Zellen 24h nach Aussaat über 72h mit 1µM und 5µM 5-Aza dC stimuliert. Nach je 24h wurden die verschiedenen Stimulationsansätze erneuert, um gleich bleibende Konzentrationen des Inhibitors zu gewährleisten und einer eventuellen Abschwächung des Effekts durch Zerfall der Wirkstoffe entgegenzuwirken. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, die RNA präpariert und cDNA durch reverse Transkriptase synthetisiert. Die Bestimmung des Expressionsniveaus erfolgte durch quantitative Real Time RT-PCR. Es zeigte sich, dass in HMEC-1, die sich durch eine bereits endogen messbare Expression des *vegfr-3* auszeichnen (**Abb. 2A**), durch eine Stimulation mit 5-Aza dC keine signifikante Hochregulation des Gens zu bewirken war (**Abb. 7A**). Dagegen bewirkte die Behandlung mit 1µM und 5µM 5-Aza dC in AGS, in denen das *vegfr-3*-Gen in unstimulierten Zellen nur sehr schwach zu detektieren ist, eine deutlich signifikante Steigerung der Expression von 30 bis 50facher sowie 80 bis 120facher Ausprägung (**Abb. 7B**). In der endothelialen Hybridzelllinie EA.hy926, die sich durch eine endogen nicht messbare Expression des *vegfr-3*-Gens auszeichnet, konnte nach Stimulation der Zellen durch 5-Aza dC eine Expression gemessen werden (**Abb. 7C**). Zur Verdeutlichung dieser Stimulationseffekte wurden die PCR-Produkte nach der quantitativen Bestimmung durch Auftragen auf Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. Es zeigte sich, dass die genspezifische Bande in bereits endogen exprimierenden Zelllinien sowohl in den unbehandelten als auch in den stimulierten Ansätzen zu erkennen war (**Abb. 7A**). In den unbehandelt nur schwach oder gar nicht exprimierenden Zelllinien war im unstimulierten Ansatz keine Bande zu sehen, diese wurde jedoch nach Behandlung mit 5-Aza dC in beiden Zelllinien deutlich sichtbar (**Abb. 7B, C**).

**Abbildung 7: Einfluss von Promotermethylierung auf die *vegfr-3* – Expression**

Die Zelllinien HMEC-1, AGS und EAhy926 (A – C) wurden über 72h mit 1 μ M oder 5 μ M 5-Aza dC stimuliert, anschließend wurde die Expression des *vegfr-3* – Gens durch quantitative Real-Time PCR bestimmt. Nach Normalisierung auf das Housekeeping-Gen β -Actin erfolgte die Darstellung der Expression von *vegfr-3* jeweils als Vielfaches der mit dem Lösungsmittel behandelten Kontrolle. Zur Verdeutlichung des Stimulationseffektes wurden die PCR-Produkte im Anschluss durch Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht photographiert. Die Darstellung zeigt ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

5.3.3 Untersuchung des Einflusses von Acetylierung und Methylierung auf die Bindung von Sp1 und Sp3 an den *vegfr-3* - Promoter

Zur Klärung des Einflusses der epigenetischen Regulationsmechanismen Acetylierung und Methylierung auf die bindenden Transkriptionsfaktoren an den Promoterbereich wurde die Sequenz des *vegfr-3*(-101/-32) als radioaktiv markierte Sonde in EMSA - Bindungsstudien mit Kernextrakten der Zelllinie HPMEC eingesetzt. HPMEC eigneten sich hierzu im Besonderen, da in diesen Zellen die basal schwache *vegfr-3* - Expression durch 5-Aza dC hochreguliert wurde, darüber hinaus ließ sich durch TSA bereits mit der geringeren Konzentration 100ng/ml eine Steigerung der *vegfr-3* - Expression bewirken. Hierzu wurden Kernproteine aus unstimulierten Ansätze mit Kernextrakten aus zuvor stimulierten Zellen hinsichtlich ihres Laufverhaltens im elektrischen Feld sowie ihrer Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 verglichen. Das Kernprotein der stimulierten Zellen war aus zuvor über 24h mit 100ng/ml TSA (**Abb. 8A**) beziehungsweise über 72h mit 5µM 5-Aza dC (**Abb. 8B**) behandelten HPMEC präpariert worden. Die Bindung der Kernproteine an *vegfr-3*(-101/-32) führte auch hier erwartungsgemäß zur Bildung des typischen Bandenmusters, dem Komplex I und dem Komplex II (**Abb. 8A und 8B, Bahn 1**). Im Vergleich zum unstimulierten Ansatz führte die Behandlung mit TSA zur Bildung der beiden typischen Kernkomplexe mit vergleichbarer Bandenintensität (**Abb. 8A, Bahn 2**). Durch Einsatz des α-Sp1 - Antikörpers konnte wiederum ein Supershift des Komplex I induziert werden (**Abb. 8A, Bahn 3**), ohne einen deutlichen Unterschied zum Supershift des mit TSA behandelten Kernproteins zu zeigen (**Abb 8A, Bahn 4**). Komplex II wurde durch Zugabe von α-Sp1 - Antikörper sowohl in den unbehandelten als auch in den stimulierten Ansätzen in seiner Intensität nicht verändert (**Abb. 8A, Bahn 3 und 4**). Der Zusatz von α-Sp3 dagegen führte zu einer Abschwächung von Komplex II ohne hier einen Supershift oder eine Abschwächung von Komplex I auszulösen (**Abb. 8A, Bahn 5 und 6**). Der Einsatz beider Antikörper verminderte sowohl die Intensität von Komplex I als auch von Komplex I mit einem geringfügigen Intensitätsunterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Kernextrakten. (**Abb. 8A, Bahn 7 und 8**). Die vorherige Behandlung der Zellen mit 5µM 5-Aza dC erbrachte ein vergleiches Bild wie die Stimulation der Zellen durch TSA (**Abb. 8B, Bahn 1 bis 8**).

5.3.4 Untersuchung des Einflusses von Acetylierung und Methylierung auf die Transaktivierung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3

Um zu untersuchen, ob die in Stimulationsexperimenten mit TSA und 5-Aza dC eindeutig dargestellten Effekte durch eine verstärkte Transaktivierung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 erfolgte, wurden transiente Transfektionsstudien im Gal4-Luciferase-System in AGS-Zellen durchgeführt (**Abb. 8C und 8D**). Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass die beiden für Transkriptionsfaktoren typischen Domänen, die DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne, auch dann ihre Funktion behalten, wenn sie aus ihrem natürlichen Protein entfernt werden. Es ist so möglich, Hybridproteine zu erstellen, die die DNA-Bindedomäne des einen, jedoch die Aktivierungsdomäne eines anderen Transkriptionsfaktors enthalten. Beim Gal4-Protein handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der Hefe, durch den die Expression von unterschiedlichen Enzymen des Galaktosestoffwechsels beeinflusst wird. Durch Verbinden dieser Gal4-DNA-Bindedomäne mit den transaktivierenden Domänen von Sp1 und Sp3 ist es möglich, die Fusionsproteine Gal4-Sp1 und Gal4-Sp3 zu erstellen. Dies ermöglicht es, die Aktivierungsdomänen dieser Transkriptionsfaktoren hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Transkription des cotransfizierten Reportergenkonstrukts 5xGal4-Luc zu induzieren, zu analysieren. Dieses Reportergenkonstrukt wiederum besitzt stromaufwärts des Luziferasegens fünf Gal4-Bindungsstellen, diese sind selektiv für Gal4-Bindedomänen. Es zeigte sich, dass die Cotransfektion der Fusionsproteine Gal4-Sp1 und Gal4 Sp3 zusammen mit dem Reportergenkonstrukt 5xGal4-Luc schon ohne Zusatz von stimulierenden Substanzen zu einem 5-10fachen Anstieg gegenüber dem unstimulierten mit dem zum Auffüllen auf gleiche Plasmidmengen verwendeten leeren Fusionsprotein pSG424 und 5xGal-4-Luc cotransfizierten Ansatz führte (**Abb. 8C und 8D**). Unter Zusatz von 20ng/ml TSA konnte, genauso wie unter 50ng/ml TSA ein 8-10facher Anstieg der Aktivierung durch Sp1 gemessen werden (**Abb. 8C**), ein vergleichbares Bild zeigte sich bei der Verwendung des Fusionsproteins Gal4-Sp3 (**Abb. 8D**). Eine Stimulation durch 5µM 5-Aza dC führte zu einer 2-3fachen Aktivierungserhöhung sowohl für Gal4-Sp1 als auch für Gal4-Sp3 (**Abb. 8C und 8D**). Im Gegensatz zu Gal4-Sp3 ließ sich jedoch Gal4-Sp1 durch simultanen Einsatz von 20ng/ml TSA mit 5µM 5-Aza dC über die allein durch den Einsatz von TSA verursachte Aktivierungserhöhung hinaus steigern. Sie lag für Gal4-Sp1 bei einer 13fachen Erhöhung, für Sp3 bei einer 9-10fachen Erhöhung der Aktivierung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (**Abb. 8C und 8D**).

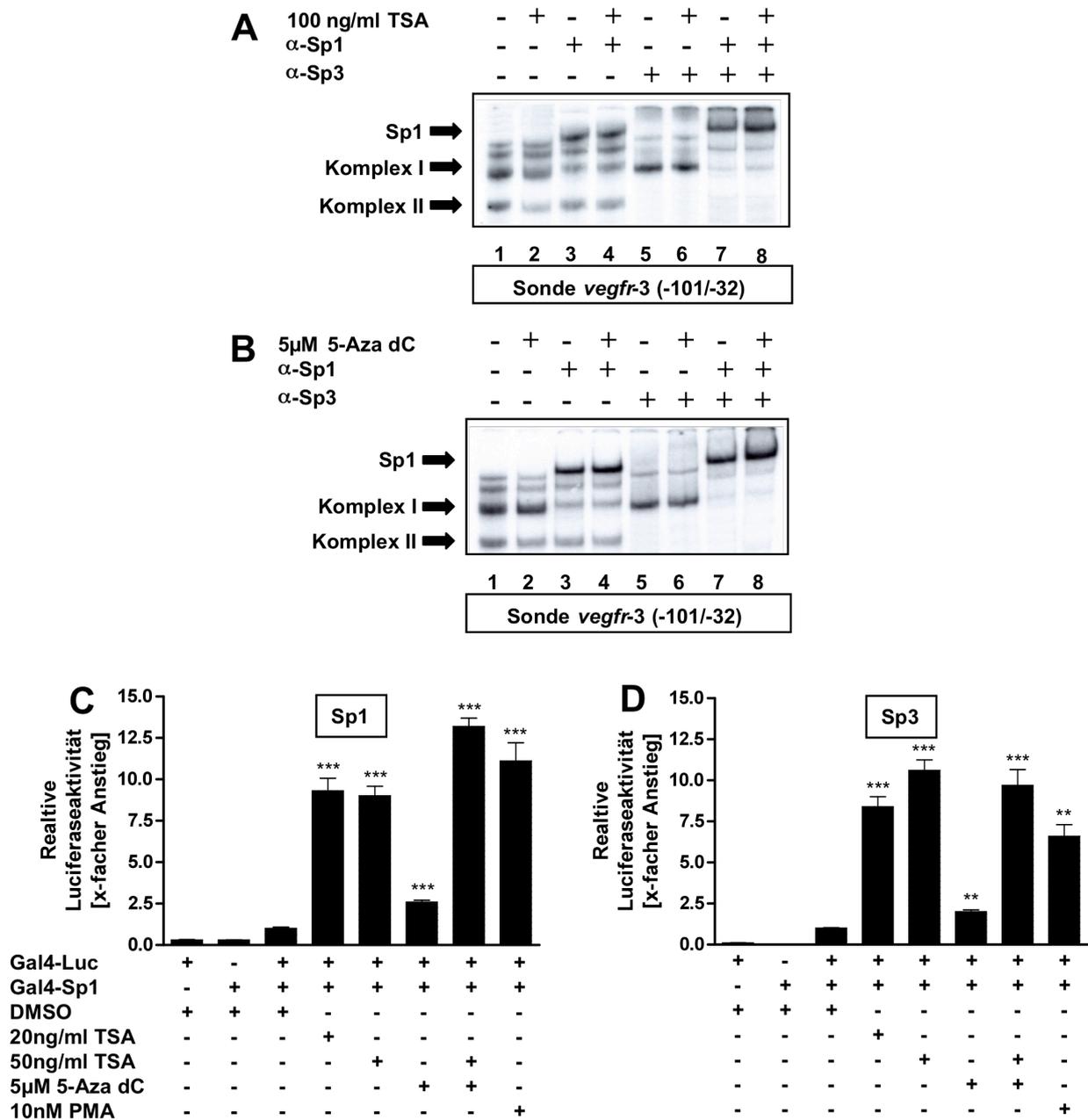


Abbildung 8: Einfluss von epigenetischer Modifikation auf die Bindung und Transaktivierung von Sp1 und Sp3

A: HPMEC Zellen wurden über 24h mit 100ng/ml TSA bzw. DMSO stimuliert. Es erfolgte die Kernpräparation und Inkubation mit 32 P-markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden des *vegfr-3*(-101/-32) als radioaktiv markierte Sonde für EMSA-Studien. Supershift-Analysen wurden unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Sp1 und Sp3 zum Vergleich stimulierter und unstimulierter Kernproteine durchgeführt. **B:** HPMEC Zellen wurden über 72h mit 5 μ M 5-Aza dC bzw. DMSO stimuliert. Es erfolgte die Kernpräparation und Inkubation mit 32 P-markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden des *vegfr-3*(-101/-32) als radioaktiv markierte Sonde für EMSA-Studien. Supershift-Analysen wurden unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Sp1 und Sp3 zum Vergleich stimulierter und unstimulierter Kernproteine durchgeführt. AGS-Zellen wurden mit gleichen Mengen des Reportergenplasmids Gal4-Luc sowie den Expressionsplasmiden Gal4-Sp1 (**C**) und Gal4-Sp3 (**D**) über 4h transfiziert und anschließend über 20h auf Ultraculture© Medium gehalten. Anschließend erfolgte eine Stimulation der Ansätze durch TSA und/oder 5-Aza dC. Die Positivkontrolle erfolgte mit 10nM PMA. Die Darstellung erfolgt als x-facher Anstieg bezogen auf den unstimulierten, mit Gal4-Luc und Gal4 - Sp1/ - Sp3 cotransfizierten Ansatz. Die in der Abbildung gezeigten Daten sind ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit werden entscheidende molekulare Regulationsmechanismen zur Kontrolle der Transkription des *vegfr-3* – Gens gezeigt, welches eng mit der Lymphangiogenese und Angiogenese in malignem und physiologischem Gewebe verknüpft ist.

Zwei benachbarte GC-Boxen zwischen -101 und -66 (GC-Box I und GC-Box II) sind hierbei essentiell für die Regulation der *vegfr-3* – Promoteraktivität und werden durch die Zinkfinger – Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 gebunden und aktiviert (**Abb. 3B**). Dagegen zeigte sich, dass eine dritte GC-Box im Bereich -65/-32 (GC-Box III) von geringer funktioneller Relevanz war (**Abb. 3C**).

6.1 Sp-Faktoren und GC-reiche Promoterelemente

Eine Vielzahl von Promoterbereichen enthält GC-reiche Elemente, welche auch als GC-(GGGGCGGGG) – Boxen bezeichnet werden und über die Bindung von Transkriptionsfaktoren für die Regulation zahlreicher Gene verantwortlich sind (Übersicht: (156)). Der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor Sp1 (Specificity Protein 1) gehört zu einer wachsenden Gruppe von Transkriptionsfaktoren, welche eine Untergruppe der Krüppel-like family of transcription factors (XKLF) bilden. Durch Bindung und Interaktion an GC- und GT-Boxen ist er neben seiner Kontrolle über grundlegend exprimierte „Housekeeping – Genes“ an der Regulation einer Vielzahl verschiedener Gene mit entscheidenden Funktionen bei der Kontrolle von Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (157 - 159). Das menschliche Sp1-Protein besteht aus 778 Aminosäuren und wurde ursprünglich als Transkriptionsfaktor mit Bindung an multiple GC-Boxen des SV40 – Virus – Promoters identifiziert (160). Alle Mitglieder der Sp/XKLF-Familie verfügen über eine 81 Aminosäuren lange DNA-Bindungsdomäne in der Nähe des C-Terminus. Zudem bestehen sie aus drei Zinkfingern in der Nähe des C-Terminus und glutaminreichen Domänen in der Nachbarschaft von Serin-/Threoninstrecken in der N-terminalen Region. Der namensgebende Zinkfinger besteht aus jeweils zwei benachbarten Cystein- und Histidinresten, welche eine Bindung zu einem Zink-Ion eingehen und so den sogenannten Zinkfinger (C_2-Zn-H_2) bilden (156). Sp5–Sp8 haben strukturelle Ähnlichkeit zu Sp1 – Sp4. Sie scheinen verkürzte Formen von Sp1–Sp4 zu sein, in

denen Anteile der N-terminalen Region fehlen (161). Die zinkfingerbildende Domäne stellt den höchstkonservierten Teil der Proteine dar, was sich dadurch äußert, dass die strukturell näher verwandten Sp1, Sp3 und Sp4 die klassische GC-reiche Sp1-Bindungsstelle mit gleicher Affinität erkennen (152, 162). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Sp2 an ein GT-reiches Element innerhalb der 5'-flankierenden Region des T-Zellrezeptor – Gens bindet (163). Das Sp1-Protein enthält mehrere funktionelle Domänen. Beide glutaminreichen Regionen können als starke Aktivierungsdomänen fungieren (151), zudem zeigte sich, dass eingestreute hydrophobe Aminosäuren und nicht die Glutaminreste an sich für die transkriptionelle Aktivierung verantwortlich sind (164). Es ist bekannt, dass Sp1 in phosphorylierten (165) und glykolysierten Zustand (166) vorliegen kann. Der Phosphorylierungsstatus hat hierbei einen regulatorischen Einfluss auf die DNA – Bindung und die transkriptionelle Aktivität (167) und wird unter anderem über die Ras-abhängige Aktivierung der MEK1/ERK – Kaskade beeinflusst (168, 169). Darüber hinaus werden weitere Phosphorylierungsvorgänge genspezifisch durch die p42/p44 MAP - Kinase sowie die stress-activated protein kinase/Jun - Kinase (SAPK/JNK) vermittelt (170). Sp1 interagiert mit TATA-binding protein associated factors (TAFs) (171) und es wurde eine TGF- β – induzierte Komplexbildung mit Smad – Proteinen beschrieben (172). Zusätzlich wurden Interaktionen von Sp1/Sp3 mit transkriptionellen Cofaktoren wie p300 (173) oder eine Komplexbildung mit cofactor required for Sp1 activation (CRSP) gezeigt (174), welche weitere wichtige transkriptionellen Kontrollmechanismen darstellen könnten. Im Gegensatz zu Sp1 ist die transkriptionelle Wirkung von Sp3 uneinheitlich. Es konnte gezeigt werden, dass Sp3 ähnlich wie Sp1 als transkriptioneller Aktivator fungiert (129, 130, 141, 175, 176), in anderen Experimenten blieb Sp3 dagegen inaktiv oder fungierte als Repressor (152, 177, 178). In diesem Zusammenhang zeigten Majello et al., dass Sp3 die basale Expression des HIV-1 – Promoters unterdrückt, während Sp1 und Sp4 als transkriptionelle Aktivatoren fungierten (178). Darüber hinaus konnte durch Sp3 eine Inhibition der Sp1-vermittelten Aktivität des cardiac Troponin T – Promoters in vivo und in vitro gezeigt werden (177). Hagen et al. zeigten, dass durch Sp3 im Gegensatz zu Sp1 und Sp4 keine Aktivierung mehrerer, Sp1 - induzierbarer Promotoren erreicht werden konnte, zudem inhibierte Sp3 die Sp1 – vermittelte Aktivierung in Sp-defizienten SL-2 – Zellen (152). In dieser Arbeit dagegen konnte sowohl Sp1 als auch Sp3 eine aktivierende Funktion hinsichtlich der Promoterregulation des *vegfr-3* – Gens zugeordnet werden (**Abb. 4 und 5**), wenn auch die

Aktivierungskapazität der beiden Transkriptionsfaktoren unterschiedlich stark ausfiel. Die experimentellen Bedingungen unter denen Sp3 jedoch als Aktivator oder Repressor der Transkription fungiert, sind bislang nicht vollständig verstanden. Es scheint, dass die Anordnung der Bindungsstellen bestimmen, ob Sp3 inaktiv wirkt und somit die Funktion von Sp1 supprimiert oder selbst als starker Aktivator wirkt. Promoter mit einer einzigen Bindungsstelle werden aktiviert, während Promoter mit multiplen Bindungsstellen oft nicht aktiviert werden oder nur schwach auf Sp3 reagieren (156, 179, 180), zusätzlich konnte der Acetylierungsstatus eines einzelnen Lysinrestes als entscheidend für die Regulation der transkriptionellen Aktivität von Sp3 identifiziert werden (181). Obendrein scheint das Mengenverhältnis zwischen Sp1 und Sp3 einen entscheidenden regulatorischen Einfluss auf die Promoteraktivierung zu haben, da Sp1 und Sp3 bei gleichzeitiger Expression um dieselben Bindungsstellen konkurrieren. Hata et al zeigten dies im Zusammenhang mit einer Sp-abhängigen *vegfr-2* - Expression in Endothelien (140). Die molekulare Grundlage für die Inaktivität von Sp3 konnte auf eine inhibitorische Domäne zwischen der zweiten glutaminreichen Aktivierungsdomäne und dem ersten Zinkfingermotiv zurückgeführt werden. Ein spezifisches Aminosäuretriplet scheint demnach absolut essentiell für die Inaktivität von Sp3 zu sein (180). Im Gegensatz zu den ubiquitär vorkommenden Faktoren Sp1 und Sp3 schien die Expression von Sp4 lange Zeit auf wenige Gewebe wie das zentrale Nervensystem beschränkt zu sein (162, 182). Neuere Arbeiten zeigen dagegen eine Expression in multiplen Karzinomzelllinien, hierunter Mamma- (183), Ovarial- (184) und Pankreaskarzinomzelllinien (129, 130, 141). Die Relevanz von Sp-Faktoren wurde durch Beobachtungen aus Gen-Knockout-Experimenten unterstrichen, da eine gezielte Abschaltung dieser Faktoren zu schweren embryonalen Fehlentwicklungen führte (182, 185 - 187). Sp1^{-/-} Mäuse weisen deutliche Wachstumstörungen auf und sterben am Tag E10 ab. Sie weisen ein breites Spektrum an Fehlentwicklungen auf, einige imponieren als undifferenzierte Zellmasse, während in anderen frühe embryonale Strukturen erkennbar sind (187). Sp3-defiziente Embryos haben ebenfalls ein gestörtes Wachstum und sind aufgrund von respiratorischem Versagen direkt nach der Geburt nicht lebensfähig. Histologisch weisen sie eine gestörte Zahnentwicklung auf (185) und zeigen Ossifikationsstörungen am Tag E 18,5 (186). Sp4 – Knockout – Mäuse sind lebensfähig, jedoch sterben zwei Drittel in den ersten Lebenstagen. Die Phänotypen zeigen reduziertes Körpergewicht, darüber hinaus weisen homozygote männliche Tiere ein vollständig fehlendes Paarungsverhalten auf, obwohl die Geschlechtsorgane voll

ausgebildet sind. Diese Verhaltensauffälligkeit wird auf einen neurologischen Defekt zurückgeführt und unterstreicht die Hauptfunktion des Sp4 in der Entwicklung des ZNS (182).

6.2 Vergleich der Promoterregionen der VEGF-Superfamilie

Mehrere Arbeiten haben gezeigt, dass GC-reiche Elemente auch in die Regulation von Angiogenese – Schlüsselgenen wie *vegfr-A*, *vegfr-1* und *vegfr-2* involviert sind (129, 130, 141, 175, 176). Der *vegfr-2* - Genpromoter ist strukturell sehr komplex und verfügt über multiple spezifische Sequenzen, über die eine Bindung regulierender Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. In einer detaillierten Analyse des proximalen *vegfr-2* – Promoters fanden Higgins et al. zwei GC-reiche Elemente zwischen -60 und -37, die durch Sp1, Sp3 und Sp4 gebunden und aktiviert werden (141). Analog zu unseren Erkenntnissen zeigten sie durch 5'-Deletionsanalysen und selektive Mutationsanalysen, dass die basale Promoteraktivität hauptsächlich durch die Integrität von zwei proximal gelegenen GC-reichen Bindungsmotiven zwischen -60 und -37 vermittelt wird, während überlappende GC-reiche/AP-2 – Bindungsmotive zwischen -77 und -61 nur geringfügig zur Aufrechterhaltung der *vegfr-2* – Promoteraktivität beitragen. Hier wurde neben der auffallenden strukturellen Ähnlichkeit zum *vegfr-3* – Promoter mit zwei essentiellen, eng benachbarten GC-Boxen, eine Bindung und Transaktivierung des *vegfr-2* – Promoters durch Sp1, Sp3 und Sp4 gezeigt (141). Hata et al. zeigten ebenfalls im Einklang mit unseren Erkenntnissen eine *vegfr-2* – Induktion durch Bindung von Sp1 an ein Bindungselement zwischen -79 und -68. Darüber hinaus zeigten sie eine Bindung von Sp3 an das gleiche Element, hierdurch wurde die Sp1-vermittelte Induktion im Gegensatz zu unseren Untersuchungen jedoch abgeschwächt, was sie zu dem Schluss brachte, dass die endothelspezifische Expression möglicherweise durch eine Variation des Verhältnisses Sp1/Sp3 reguliert wird (140). Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass innerhalb 5'-flankierender Region des *vegfr-2* – Promoters mehrere GC-Elemente existieren und diese, analog der des *vegfr-3* - Promoters über keine TATA-Box verfügt (138, 143). Zudem hatten Röncke et al. gezeigt, dass sich zwischen -96 und -72 sowie zwischen -71 und -37 stark aktivierende Elemente mit Konsensussequenzen für AP-2 und nuclear factor- κ B (NF- κ B) sowie potentielle Bindungssequenzen für Sp1 befinden (143). Darüber hinaus konnte eine Bindung und Regulation durch cAMP response element binding protein (CREB) sowie NF- κ B gezeigt werden (142), zudem wird durch eine Bindung des multifunktionalen

Transkriptionsfaktor TFII-I an ein den Transkriptionsstartpunkt überlappendes Initiatorelement (Inr) zwischen -10 und +10 eine Promoteraktivierung verursacht (144). Für den *vegfr-1* – Promoter zeigten Abdelrahim et al. die Existenz von zwei GC-reichen Elementen zwischen -884 und -334 und eine dritte GC-reiche Sequenz in direkter Nachbarschaft zu einer Egr-1 – Konsensussequenz, welche durch Sp1, Sp3 und Sp4 gebunden und aktiviert werden. In dieser Studie wurde jedoch keine detaillierte Analyse des *vegfr-1* – Promoters durchgeführt, es wurde lediglich eine Reduktion der *vegfr-1* – Expression durch den Einsatz von small interference – RNA (siRNA) präsentiert (130). Daneben konnte durch Takeda et al. einer HIF-1 – Bindungsstelle zwischen -1160 und -886 innerhalb des *vegfr-1* – Promoters eine entscheidende Rolle für die EPAS1-abhängige Promotertransaktivierung zugewiesen werden (134).

Analog zu den Erkenntnissen aus der vorliegenden Arbeit konnte durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass zwei GC-Boxen bei -73/-66 sowie -58/-52 unter dem Einfluss von oxidativem Stress oder *Helicobacter pylorii* durch Sp1/Sp3 gebunden und aktiviert werden, und somit eine entscheidende Rolle bei der Regulation des *vegfr-A* – Gens, welches für den Hauptliganden des VEGFR-2 codiert, spielen (175, 176).

Im *vegfr-C* - Promoter konnten multiple putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie Sp-1, AP-2, and NF- κ B gezeigt werden (188), eine detaillierte Analyse bindender und regulierender Transkriptionsfaktoren wurde jedoch bislang nicht durchgeführt.

Unsere Beobachtungen beim *vegfr-3* – Gen in Verbindung mit Erkenntnissen aus vorangegangenen Arbeiten über die Angiogenese – Schlüsselgene *vegfr-A* und *vegfr-2* legen nahe, dass die Sp1/Sp3 – abhängige Aktivierung von proximalen GC-Elementen einen Kernmechanismus darstellt, durch den bestimmte Gene aus der VEGF – Superfamilie kontrolliert werden.

Eine Ausnahme zu diesem Konzept bildet allerdings *vegfr-D*, in dessen proximalem Promoter in einer vorangegangenen Arbeit der Gruppe ein atypisches direct repeat (DR) - Element bestehend aus einer Consensushälfte mit der Sequenz (AGGTCA) bei -125/-119 sowie einer degenerierten DR - Hälfte (ATGTTA) bei -99/-94 nachgewiesen werden konnte, welches einen entscheidenden Einfluss auf die *vegfr-D*-Transkription hatte. Dieses Element wird durch einen Komplex aus den Orphanrezeptoren HNF-4 α und COUP-TF1/COUP-TF2 sowie den Coaktivatoren glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP-1) und cyclic AMP–responsive element binding protein–binding protein (CBP) gebunden und aktiviert (189).

6.3 Sp-Faktoren in Karzinomen

Das Konzept einer übergreifenden Sp1/Sp3 - vermittelten Regulation von angiogenesebezogenen Schlüsselgenen wird zudem durch die Erkenntnis gestützt, dass in Magen- und Pankreaskarzinomen die Expression von Sp1 signifikant mit VEGF-A korrelierte und in Tumorgeweben im Vergleich zu Normalgeweben sowohl Sp1 als auch VEGF-A verstärkt exprimiert wurde (190, 191). Im Magenkarzinom zeigten Yao et al., dass eine erhöhte Sp1-Expression klinisch mit dem Krankheitsstadium, lymphatischer Metastasierung und verkürzter Überlebenszeit korrelierte (191). Eine starke Sp1 - Expression wurde in den Nuclei von Magenkarzinomzellen nachgewiesen, während keine oder nur schwache Sp1-Expressionen in Stromazellen oder normalem Drüsengewebe innerhalb oder in der Umgebung des Tumors nachzuweisen war (192). Darüber hinaus konnte eine starke Expression von Sp1 als unabhängiger prognostischer Marker für reduziertes Überleben bei Magenkarzinompatienten identifiziert werden (191, 192). Für das duktales Pankreasadenokarzinom war eine Überexpression von Sp1 mit verkürzter Überlebenszeit, dem Krankheitsstadium, dem histologischen Grad sowie mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen assoziiert. Für letzteres ergab sich bei starker Expression von Sp1 eine Spezifität von 100% (193). Eine erhöhte Sp1 - Expression zeigte sich zudem in 10 von 14 Mammakarzinomschnitten, während nur in 1 von 5 gutartigen Brusttumoren eine schwache Sp1 - Expression nachgewiesen werden konnte (194). Darüber hinaus zeigte sich in weiteren Studien eine erhöhte Expression von Sp1 in hepatozellulären Karzinomen (HCC) (195), Schilddrüsen- (196) und Kolorektalkarzinomen (197) im Vergleich zu Normalgeweben.

Eine Analyse der Expressionen von VEGFR-3 und Sp-Faktoren in Korrelation mit klinisch-prognostischen Parametern in Karzinomen ist bislang nicht publiziert, sie stellt jedoch angesichts der eingangs beschriebenen Relevanz des VEGFR-3 für die tumorassoziierte Lymphangiogenese und lymphatische Metastasierung einen interessanten Ansatz zur Unterstreichung der im Rahmen der vorliegenden Studie gewonnenen Erkenntnisse dar.

6.4 Epigenetische Modifikation von Sp-Faktoren

Nach der Identifikation regulatorisch beteiligter Cis-Elemente auf Promoterebene erfolgte eine Untersuchung des Einflusses epigenetischer Modifikationen in Form von Methylierung und Acetylierung auf die Expression des *vegfr-3* - Gens. Es ist bekannt,

dass Acetylierung/Deacetylierung von Histonen sowie die Hypermethylierung von Promotern eine wichtige Rolle bei der Regulation von Genexpression spielen (198, 199). Der Acetylierungsstatus von Histonen wird dabei von der Aktivität zweier gegensätzlich fungierender Enzymgruppen gesteuert, den Histonacetylasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs). Die Mehrzahl der identifizierten Histonacetylasen wirken als transkriptionelle Koaktivatoren, während Histondeacetylasen gegensätzlich zu Histonacetylasen durch eine Deacetylierung von Lysinresten innerhalb von Histonschwänzen wirken (199). Eine Modifikation der ϵ -Gruppe von Lysinresten verändert dabei die Konfiguration des Nukleosoms. Die positive Ladung deacetylierter Lysine wird dabei von negativ geladener DNA angezogen, was zu einer kompakten Formation des Chromatins und so zu einer Behinderung der Transkription führt. Acetylierung der Lysinreste durch Histonacetylasen entfernt diese positive Ladung, was wiederum zu einer offenen Chromatinstruktur führt und so die Expression des jeweiligen Gens erleichtert. Histondeacetylasen machen diesen Prozess wiederum rückgängig durch eine Entfernung der Acetylgruppe, was zu einem Gene-Silencing führt (200). DNA-Methylierung von Promotern spezifischer Gene stellt daneben einen weiteren grundlegenden Mechanismus von epigenetischem Gene – Silencing dar. Sie geschieht vor allem im Bereich CpG-reicher Areale 5'-gerichteter Promoterregionen und inhibiert die Transkription durch Unterbindung des Initiationsprozesses oder durch eine Reduzierung der Bindungsaffinität sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren (198). Fehlerhafte Rekrutierung von Histondeacetylasen konnte in malignen Zellen mit der Aktivierung transkriptioneller Abläufe, welche die Entstehung und Progression von Karzinomen unterstützen, in Verbindung gebracht werden (198, 199). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass HDAC1 durch eine Interaktion mit dem Estrogenreceptor α (ER- α) und dadurch verursachte Zellproliferation die Progression des Mammakarzinoms beeinflusst (201). Darüber hinaus konnte eine Interaktion mit dem Tumorsuppressorgen BRCA-1 mit HDAC1 und HDAC2 gezeigt werden (202). Daneben konnten auch Veränderungen von CBP und p300, welche als HATs fungieren, mit multiplen Tumorentitäten in Verbindung gebracht werden (203). Histondeacetylaseninhibitoren wie TSA konnte ein Potenzial als antikarzinomatös wirkende Substanzen zugeschrieben werden (199, 204, 205), ein Effekt, der teilweise durch eine Inhibition von proangiogenen Faktoren wie VEGF-A vermittelt sein könnte (205). Neben TSA liegen einige weitere stabile HDAC-Inhibitoren vor, hierunter Natriumbutyrat, Apicidin und SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid), welche aufgrund

ihrer evidenten Wirkung in klinischen Untersuchungen der Phase I und II an Karzinompatienten getestet werden (199, 206).

Da vorangegangene Arbeiten eine Beeinflussung von Angiogenese – Genen einschließlich *vegfr-3* gezeigt hatten (205, 207), wurde der Effekt von TSA und 5-Aza dC auf den *vegfr-3* – Promoter untersucht. Interessanterweise führte die Behandlung durch TSA zu einer starken Induktion der *vegfr-3* – Transkription (**Abb. 6**). Eine demethylierende Behandlung durch 5-Aza dC führte in Zelllinien, in denen unter basalen Bedingungen die *vegfr-3* - Expression durch Gene – Silencing unterdrückt wird, zu einer Hochregulation der *vegfr-3* – Expression, in basal exprimierenden Zelllinien hatte dies jedoch keinen Effekt (**Abb. 7**). Da sowohl TSA als auch 5-Aza dC keinen Einfluss auf die quantitative Bindung von Sp1 und Sp3 an den *vegfr-3* – Promoter hatten, wie ausführlich in EMSA – Untersuchungen dargestellt (**Abb. 8A und B**), erfolgte der Einsatz eines Gal4-Sp1/Sp3/Gal4-Luciferase Kotransfektionssystems zur Untersuchung möglicher posttranslationaler Modifikationen beider Transkriptionsfaktoren durch epigenetische Modifikationen. Das Gal4-Sp1/Sp3/Gal4-Luciferase – System zeichnet sich, wie bereits eingangs beschrieben, dadurch aus, dass die Expression des Luciferasegens durch ein Multimer des Gal4 – Hefe- Transkriptionsfaktors vermittelt wird, was wiederum die Untersuchung direkter Effekte auf die Transaktivierungskapazität von Sp1 und Sp3 erlaubt (153). Die Transaktivierungskapazität von Sp1 und Sp3 wurde durch TSA, und in einem geringeren Umfang auch durch 5-Aza dC, erhöht (**Abb. 8C und D**), was nahe legt, dass sowohl Sp1 als auch Sp3 durch epigenetische Mechanismen modifiziert werden.

Direkte Effekte von epigenetischen Mechanismen auf Transkriptionsfaktoren wurden bereits beschrieben (Übersicht: (199)). Mehrere Arbeitsgruppen fanden analog zu unseren Erkenntnissen zwar eine transkriptionelle Induktion durch HDAC-Inhibition, dies war jedoch nicht mit einer erhöhten Bindung von Sp1/Sp3 an den jeweiligen Promoterbereich verbunden. Eine Anzahl von Studien präsentierte unterschiedliche Sp1/Sp3 – Multiproteinkomplexe sowie Interaktionen mit transkriptionellen Kofaktoren als zugrunde liegende Mechanismen für die HDAC-Inhibitionsvermittelten Effekte auf die Genaktivierung. In diesem Zusammenhang zeigte sich die Rekrutierung eines HDACs-mSin3A - Komplex an den hLHR – Genpromoter durch Interaktion zwischen HDAC1/2 und Sp1 als entscheidend für die transkriptionelle Kontrolle des Luteinizing hormone receptor (LHR) (208). Die Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit TSA aktivierte zudem den Promoter des Tumorsuppressorgens Transforming growth factor β

type II (TßRII) durch Einbindung von p300 und PCAF in einen Sp1-NF-Y-HDAC - Multiproteinkomplex, was mit einer direkten Acetylierung von Sp1 einherging (209). Swingler et al. zeigten, dass im Rahmen einer Induktion des MMP28 - Promoters durch TSA keine vermehrte Expression von Sp1/Sp3 zu detektieren war, jedoch p300, P/CAF [p300/CREB (cAMP-response-element-binding protein)- binding protein-associated factor] sowie STRAP (serine/threonine kinase receptor-associated protein) als Komplexpartner mit Sp1 fungieren (210). Darüber hinaus zeigte sich durch TSA eine Veränderung im Zusammenspiel zwischen Sp1 und HDAC1 oder p300, was einen induzierenden Einfluss auf die Expression des Tumorsuppressorgens NECL1 hatte. TSA führte hier zu einer Assoziation von p300 an Sp1, während HDAC1 dissoziierte (211). Gao et al. vermuteten, dass Sp1 gemeinsam mit seiner spezifischen Bindungsstelle im NECL1-Promoter einen molekularen Adapter für die HDAC1- oder p300-vermittelte Wirkung darstellen könnte (211). Zudem konnte nach TSA-Stimulation eine Veränderung des HDACs/HATs – Gleichgewichts am CYP46A1 – Promoters gezeigt werden. TSA verursachte hier ebenfalls keine gesteigerte Bindung von Sp1, jedoch zeigte sich eine Dissoziation von HDAC1 und HDAC2 bei gleichzeitiger Zunahme der Coaktivatoren p300/CBP (cAMP response element binding protein) (212). Darüber hinaus zeigte sich durch Behandlung mit TSA in mehreren Arbeiten eine signifikante Steigerung der Rekrutierung von RNA - Polymerase II an den Promoter (208, 212, 213).

Andere zeigten im Gegensatz zu unseren Erkenntnissen nach Stimulation durch HDAC-Inhibitoren eine quantitativ gesteigerte Bindung von Sp-Faktoren. HDAC-Inhibition durch TSA führte im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zu einer gesteigerten Bindung von Sp1 und Sp3 am 5-LO – Promoter (213). In einer neueren Arbeit kam es zu einer Dissoziation eines transkriptonell inhibitorisch wirkenden CTPI2/HDAC2/NurD2 – Komplex, was eine deutliche Rekrutierung von Sp1, jedoch nicht Sp3 an den p57Kip2 – Promoter bewirkte (214). TSA verursachte zudem eine transkriptionelle Aktivierung des insulin growth factor binding protein – 3 (IGFBP-3), einhergehend mit einer deutlichen Steigerung der Sp1 – Bindung (215). Zusätzlich war hier der Effekt durch Veränderung des Phosphorylierungsstatus von Sp1 und einer veränderten Zusammensetzung des Sp1/Sp3/HDAC1/p300 – Multiproteinkomplexes vermittelt (215).

Im Einklang mit unseren Erkenntnissen bezüglich des durch Promoter-Methylierung vermittelten Gene - Silencing (**Abb. 7**) konnte in einer aktuellen Arbeit eine inverse Korrelation zwischen dem Methylierungsstatus des *vegfr-3* – Promoters und der

Rezeptorexpression in mehreren Zelllinien gezeigt werden. Analog unseren Erkenntnissen konnte die Behandlung durch 5-Aza dC in methylierten, jedoch nicht in unmethylierten Zelllinien zu einer Expressionssteigerung des *vegfr-3* führen (216). Ob und über welche Mechanismen DNA - Methylierung Sp - vermittelte Effekte modifizieren kann, ist noch nicht vollständig verstanden, es ist jedoch bekannt, dass Methylgruppen von CpG-Inseln direkt die Bindung von Sp1 und Sp3 behindern können (217, 218).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Expression des *vegfr-3* – Gens durch epigenetische Kontrollmechanismen beeinflusst wird und dass Sp1 und Sp3 diese Effekte vermitteln. Die Details dieses regulatorischen Kontrollmechanismus und wie reversibles epigenetisches Gene – Silencing des *vegfr-3* – Genpromoters zur Kontrolle der *vegfr-3* – Genexpression im Zusammenhang mit vaskulärer Differenzierung und/oder Karzinomen beiträgt, könnten interessante Ansätze in zukünftigen Untersuchungen darstellen.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Stacker, SA, Achen, MG, Jussila, L, Baldwin, ME, Alitalo, K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002 ;2:573-83
- 2 Yancopoulos, GD, Davis, S, Gale, NW, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000 ;407:242-8
- 3 Hong, YK, Shin, JW, Detmar, M. Development of the lymphatic vascular system: A mystery unravels. *Dev Dyn* 2004 ;
- 4 Kaipainen, A, Korhonen, J, Mustonen, T, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 ;92:3566-70
- 5 Joukov, V, Pajusola, K, Kaipainen, A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996 ;15:290-8
- 6 Lee, J, Gray, A, Yuan, J, et al. Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 ;93:1988-92
- 7 Achen, MG, Jeltsch, M, Kukk, E, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 ;95:548-53
- 8 Orlandini, M, Marconcini, L, Ferruzzi, R, Oliviero, S. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 ;93:11675-80
- 9 Banerji, S, Ni, J, Wang, SX, et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999 ;144:789-801
- 10 Wigle, JT, Oliver, G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999 ;98:769-78
- 11 Breiteneder-Geleff, S, Soleiman, A, Kowalski, H, et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 1999 ;154:385-94
- 12 Ferrara, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer* 2002 ;2:795-803

- 13 Carmeliet, P, Jain, RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000 ;407:249-57
- 14 Meyer, M, Clauss, M, Lepple-Wienhues, A, et al. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *Embo Journal* 1999 ;18:363-74
- 15 Barillari, G, Ensoli, B. Angiogenic effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and its role in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Clinical Microbiology Reviews* 2002 ;15:310-+
- 16 Vikkula, M, Boon, LM, Carraway, KL, et al. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell* 1996 ;87:1181-90
- 17 Luttun, A, Tjwa, M, Moons, L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nature Medicine* 2002 ;8:831-40
- 18 Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 2000 ;6:389-95
- 19 Ferrara, N, Gerber, HP, LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003 ;9:669-76
- 20 Senger, DR, Galli, SJ, Dvorak, AM, et al. Tumor-Cells Secrete A Vascular-Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites-Fluid. *Science* 1983 ;219:983-5
- 21 de Vries, C, Escobedo, JA, Ueno, H, et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992 ;255:989-91
- 22 Terman, BI, Carrion, ME, Kovacs, E, et al. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1991 ;6:1677-83
- 23 Carmeliet, P, Ferreira, V, Breier, G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996 ;380:435-9
- 24 Ferrara, N, Carver-Moore, K, Chen, H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996 ;380:439-42
- 25 Maae, E, Olsen, DA, Steffensen, KD, et al. Prognostic impact of placenta growth factor and vascular endothelial growth factor A in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012 ;133:257-65

- 26 Tokunaga, T, Oshika, Y, Abe, Y, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer* 1998 ;77:998-1002
- 27 Uthoff, SM, Duchrow, M, Schmidt, MH, et al. VEGF isoforms and mutations in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 2002 ;101:32-6
- 28 Maglione, D, Guerriero, V, Viglietto, G, Delli-Bovi, P, Persico, MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 ;88:9267-71
- 29 Park, JE, Chen, HH, Winer, J, Houck, KA, Ferrara, N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994 ;269:25646-54
- 30 Olofsson, B, Korpelainen, E, Pepper, MS, et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 ;95:11709-14
- 31 Ziche, M, Maglione, D, Ribatti, D, et al. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest* 1997 ;76:517-31
- 32 Carmeliet, P, Moons, L, Luttun, A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001 ;7:575-83
- 33 Gigante, B, Tarsitano, M, Cimini, V, De Falco, S, Persico, MG. Placenta growth factor is not required for exercise-induced angiogenesis. *Angiogenesis* 2004 ;7:277-84
- 34 Parr, C, Watkins, G, Boulton, M, Cai, J, Jiang, WG. Placenta growth factor is over-expressed and has prognostic value in human breast cancer. *Eur J Cancer* 2005 ;41:2819-27
- 35 Wei, SC, Tsao, PN, Yu, SC, et al. Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer. *Gut* 2005 ;54:666-72
- 36 Zhang, L, Chen, J, Ke, Y, Mansel, RE, Jiang, WG. Expression of Placenta growth factor (PIGF) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and the clinical and prognostic significance. *World J Surg Oncol* 2005 ;3:68
- 37 Olofsson, B, Pajusola, K, Kaipainen, A, et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996 ;93:2576-81

- 38 Makinen, T, Olofsson, B, Karpanen, T, et al. Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J Biol Chem* 1999 ;274:21217-22
- 39 Bellomo, D, Headrick, JP, Silins, GU, et al. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 2000 ;86:E29-E35
- 40 Silvestre, JS, Tamarat, R, Ebrahimian, TG, et al. Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res* 2003 ;93:114-23
- 41 Shintani, S, Li, C, Ishikawa, T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004 ;40:13-20
- 42 Hagberg, CE, Falkevall, A, Wang, X, et al. Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* 2010 ;464:917-21
- 43 Joukov, V, Sorsa, T, Kumar, V, et al. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 1997 ;16:3898-911
- 44 Baldwin, ME, Catimel, B, Nice, EC, et al. The specificity of receptor binding by vascular endothelial growth factor-d is different in mouse and man. *J Biol Chem* 2001 ;276:19166-71
- 45 Karkkainen, MJ, Haiko, P, Sainio, K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004 ;5:74-80
- 46 Baldwin, ME, Halford, MM, Roufail, S, et al. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 2005 ;25:2441-9
- 47 Onogawa, S, Kitadai, Y, Tanaka, S, et al. Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 2004 ;95:32-9
- 48 Yokoyama, Y, Charnock-Jones, DS, Licence, D, et al. Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2003 ;88:237-44
- 49 Nakamura, Y, Yasuoka, H, Tsujimoto, M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor d in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 2003 ;9:716-21
- 50 Juttner, S, Wissmann, C, Jons, T, et al. Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: Two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 2006 ;24:228-40

- 51 Lyttle, DJ, Fraser, KM, Fleming, SB, Mercer, AA, Robinson, AJ. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* 1994 ;68:84-92
- 52 Karkkainen, MJ, Petrova, TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 2000 ;19:5598-605
- 53 Dixelius, J, Makinen, T, Wirzenius, M, et al. Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem* 2003 ;278:40973-9
- 54 Huang, K, Andersson, C, Roomans, GM, Ito, N, Claesson-Welsh, L. Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int J Biochem Cell Biol* 2001 ;33:315-24
- 55 Fong, GH, Rossant, J, Gertsenstein, M, Breitman, ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995 ;376:66-70
- 56 Shalaby, F, Rossant, J, Yamaguchi, TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995 ;376:62-6
- 57 Hiratsuka, S, Minowa, O, Kuno, J, Noda, T, Shibuya, M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 ;95:9349-54
- 58 Hiratsuka, S, Maru, Y, Okada, A, et al. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res* 2001 ;61:1207-13
- 59 El Mousawi, M, Tchistiakova, L, Yurchenko, L, et al. A vascular endothelial growth factor high affinity receptor 1-specific peptide with antiangiogenic activity identified using a phage display peptide library. *J Biol Chem* 2003 ;278:46681-91
- 60 Lacal, PM, Morea, V, Ruffini, F, et al. Inhibition of endothelial cell migration and angiogenesis by a vascular endothelial growth factor receptor-1 derived peptide. *Eur J Cancer* 2008 ;44:1914-21
- 61 Dhakal, HP, Naume, B, Synnestvedt, M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in invasive breast carcinoma: prognostic significance and relationship with markers for aggressiveness. *Histopathology* 2012 ;
- 62 Hirashima, Y, Yamada, Y, Matsubara, J, et al. Impact of vascular endothelial growth factor receptor 1, 2, and 3 expression on the outcome of patients with gastric cancer. *Cancer Sci* 2009 ;100:310-5

- 63 Seto, T, Higashiyama, M, Funai, H, et al. Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006 ;53:91-6
- 64 Kliche, S, Waltenberger, J. VEGF receptor signaling and endothelial function. *IUBMB Life* 2001 ;52:61-6
- 65 Zachary, I. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* 2003 ;31:1171-7
- 66 Hirakawa, S, Hong, YK, Harvey, N, et al. Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol* 2003 ;162:575-86
- 67 Nagy, JA, Vasile, E, Feng, D, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002 ;196:1497-506
- 68 Kriehuber, E, Breiteneder-Geleff, S, Groeger, M, et al. Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med* 2001 ;194:797-808
- 69 Hong, YK, Lange-Asschenfeldt, B, Velasco, P, et al. VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *FASEB J* 2004 ;
- 70 Kunstfeld, R, Hirakawa, S, Hong, YK, et al. Induction of cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in VEGF-A transgenic mice results in chronic skin inflammation associated with persistent lymphatic hyperplasia. *Blood* 2004 ;
- 71 Carrillo de Santa, PE, Arias, FC, Caso, PE, et al. Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their receptors R1, R2, and R3 in patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2009 ;115:1701-12
- 72 Gockel, I, Moehler, M, Frerichs, K, et al. Co-expression of receptor tyrosine kinases in esophageal adenocarcinoma and squamous cell cancer. *Oncol Rep* 2008 ;20:845-50
- 73 Nakopoulou, L, Stefanaki, K, Panayotopoulou, E, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1 in breast carcinomas: correlation with proliferation. *Hum Pathol* 2002 ;33:863-70
- 74 Galland, F, Karamysheva, A, Mattei, MG, et al. Chromosomal localization of FLT4, a novel receptor-type tyrosine kinase gene. *Genomics* 1992 ;13:475-8
- 75 Kondo, K, Hiratsuka, S, Subbalakshmi, E, Matsushime, H, Shibuya, M. Genomic organization of the flt-1 gene encoding for vascular endothelial growth factor

(VEGF) receptor-1 suggests an intimate evolutionary relationship between the 7-Ig and the 5-Ig tyrosine kinase receptors. *Gene* 1998 ;208:297-305

76 Yin, LY, Wu, Y, Ballinger, CA, Patterson, C. Genomic structure of the human KDR/flk-1 gene. *Mamm Genome* 1998 ;9:408-10

77 Galland, F, Karamysheva, A, Pebusque, MJ, et al. The FLT4 gene encodes a transmembrane tyrosine kinase related to the vascular endothelial growth factor receptor. *Oncogene* 1993 ;8:1233-40

78 Pajusola, K, Aprelikova, O, Korhonen, J, et al. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res* 1992 ;52:5738-43

79 Goldman, J, Rutkowski, JM, Shields, JD, et al. Cooperative and redundant roles of VEGFR-2 and VEGFR-3 signaling in adult lymphangiogenesis. *FASEB J* 2007 ;21:1003-12

80 Veikkola, T, Jussila, L, Makinen, T, et al. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J* 2001 ;20:1223-31

81 Pajusola, K, Aprelikova, O, Pelicci, G, et al. Signalling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors. *Oncogene* 1994 ;9:3545-55

82 Fournier, E, Dubreuil, P, Birnbaum, D, Borg, JP. Mutation at tyrosine residue 1337 abrogates ligand-dependent transforming capacity of the FLT4 receptor. *Oncogene* 1995 ;11:921-31

83 Stacker, SA, Stenvers, K, Caesar, C, et al. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem* 1999 ;274:32127-36

84 Fournier, E, Rosnet, O, Marchetto, S, et al. Interaction with the phosphotyrosine binding domain/phosphotyrosine interacting domain of SHC is required for the transforming activity of the FLT4/VEGFR3 receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1996 ;271:12956-63

85 Makinen, T, Veikkola, T, Mustjoki, S, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J* 2001 ;20:4762-73

86 Salameh, A, Galvagni, F, Bardelli, M, Bussolino, F, Oliviero, S. Direct recruitment of CRK and GRB2 to VEGFR-3 induces proliferation, migration, and survival of endothelial cells through the activation of ERK, AKT, and JNK pathways. *Blood* 2005 ;106:3423-31

- 87 Wang, JF, Zhang, X, Groopman, JE. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and its downstream signaling promote cell survival under oxidative stress. *J Biol Chem* 2004 ;279:27088-97
- 88 Galvagni, F, Pennacchini, S, Salameh, A, et al. Endothelial cell adhesion to the extracellular matrix induces c-Src-dependent VEGFR-3 phosphorylation without the activation of the receptor intrinsic kinase activity. *Circ Res* 2010 ;106:1839-48
- 89 Partanen, TA, Arola, J, Saaristo, A, et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J* 2000 ;14:2087-96
- 90 Paavonen, K, Puolakkainen, P, Jussila, L, Jahkola, T, Alitalo, K. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol* 2000 ;156:1499-504
- 91 Calvo, CF, Fontaine, RH, Soueid, J, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 3 directly regulates murine neurogenesis. *Genes Dev* 2011 ;25:831-44
- 92 Dumont, DJ, Jussila, L, Taipale, J, et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998 ;282:946-9
- 93 Haiko, P, Makinen, T, Keskitalo, S, et al. Deletion of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF-D is not equivalent to VEGF receptor 3 deletion in mouse embryos. *Mol Cell Biol* 2008 ;28:4843-50
- 94 Makinen, T, Jussila, L, Veikkola, T, et al. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* 2001 ;7:199-205
- 95 Karpanen, T, Wirzenius, M, Makinen, T, et al. Lymphangiogenic growth factor responsiveness is modulated by postnatal lymphatic vessel maturation. *Am J Pathol* 2006 ;169:708-18
- 96 Suzuki, H, Watabe, T, Kato, M, Miyazawa, K, Miyazono, K. Roles of vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling in differentiation of mouse embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells into endothelial cells. *Blood* 2005 ;105:2372-9
- 97 Irrthum, A, Karkkainen, MJ, Devriendt, K, Alitalo, K, Vikkula, M. Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase. *American Journal of Human Genetics* 2000 ;67:295-301
- 98 Brice, G, Child, AH, Evans, A, et al. Milroy disease and the VEGFR-3 mutation phenotype. *J Med Genet* 2005 ;42:98-102
- 99 Karkkainen, MJ, Saaristo, A, Jussila, L, et al. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 ;98:12677-82

- 100 Garces, CA, Kurenova, EV, Golubovskaya, VM, Cance, WG. Vascular endothelial growth factor receptor-3 and focal adhesion kinase bind and suppress apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res* 2006 ;66:1446-54
- 101 Jussila, L, Valtola, R, Partanen, TA, et al. Lymphatic endothelium and Kaposi's sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Res* 1998 ;58:1599-604
- 102 Liu, XE, Sun, XD, Wu, JM. Expression and significance of VEGF-C and FLT-4 in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004 ;10:352-5
- 103 Nishida, N, Yano, H, Komai, K, et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 2004 ;101:1364-74
- 104 Su, JL, Yang, PC, Shih, JY, et al. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell* 2006 ;9:209-23
- 105 Schoppmann, SF, Birner, P, Stockl, J, et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002 ;161:947-56
- 106 Skobe, M, Hamberg, LM, Hawighorst, T, et al. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol* 2001 ;159:893-903
- 107 Valtola, R, Salven, P, Heikkila, P, et al. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 1999 ;154:1381-90
- 108 Kopfstein, L, Veikkola, T, Djonov, VG, et al. Distinct roles of vascular endothelial growth factor-D in lymphangiogenesis and metastasis. *Am J Pathol* 2007 ;170:1348-61
- 109 Mandriota, SJ, Jussila, L, Jeltsch, M, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001 ;20:672-82
- 110 Tammela, T, Zarkada, G, Wallgard, E, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 2008 ;454:656-U68
- 111 Karpanen, T, Egeblad, M, Karkkainen, MJ, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001 ;61:1786-90

- 112 He, Y, Kozaki, K, Karpanen, T, et al. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002 ;94:819-25
- 113 He, Y, Rajantie, I, Pajusola, K, et al. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res* 2005 ;65:4739-46
- 114 Kubo, H, Fujiwara, T, Jussila, L, et al. Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood* 2000 ;96:546-53
- 115 Krishnan, J, Kirkin, V, Steffen, A, et al. Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. *Cancer Res* 2003 ;63:713-22
- 116 Lin, J, Lalani, AS, Harding, TC, et al. Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor. *Cancer Res* 2005 ;65:6901-9
- 117 Roberts, N, Kloos, B, Cassella, M, et al. Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res* 2006 ;66:2650-7
- 118 Laakkonen, P, Waltari, M, Holopainen, T, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res* 2007 ;67:593-9
- 119 Sallinen, H, Anttila, M, Grohn, O, et al. Cotargeting of VEGFR-1 and -3 and angiopoietin receptor Tie2 reduces the growth of solid human ovarian cancer in mice. *Cancer Gene Ther* 2011 ;18:100-9
- 120 Chen, Z, Varney, ML, Backora, MW, et al. Down-regulation of vascular endothelial cell growth factor-C expression using small interfering RNA vectors in mammary tumors inhibits tumor lymphangiogenesis and spontaneous metastasis and enhances survival. *Cancer Res* 2005 ;65:9004-11
- 121 Arinaga, M, Noguchi, T, Takeno, S, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2003 ;97:457-64
- 122 Han, FH, Li, HM, Zheng, DH, He, YL, Zhan, WH. The effect of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor-3 on the clinical outcome in patients with gastric carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2010 ;36:1172-9

- 123 Kilvaer, TK, Valkov, A, Sorbye, S, et al. Profiling of VEGFs and VEGFRs as prognostic factors in soft tissue sarcoma: VEGFR-3 is an independent predictor of poor prognosis. *PLoS One* 2010 ;5:e15368
- 124 Kim, JY, Bae, BN, Kwon, JE, Kim, HJ, Park, K. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor in colorectal adenocarcinoma. *APMIS* 2011 ;119:449-59
- 125 Nakamura, Y, Yasuoka, H, Tsujimoto, M, et al. Flt-4-positive vessel density correlates with vascular endothelial growth factor-d expression, nodal status, and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003 ;9:5313-7
- 126 Yokoyama, Y, Charnock-Jones, DS, Licence, D, et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-D and Its Receptor, VEGF Receptor 3, as a Prognostic Factor in Endometrial Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003 ;9:1361-9
- 127 Yonemura, Y, Fushida, S, Bando, E, et al. Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2001 ;37:918-23
- 128 Ozmen, F, Ozmen, MM, Ozdemir, E, et al. Relationship between LYVE-1, VEGFR-3 and CD44 gene expressions and lymphatic metastasis in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2011 ;17:3220-8
- 129 Abdelrahim, M, Smith, R, III, Burghardt, R, Safe, S. Role of Sp proteins in regulation of vascular endothelial growth factor expression and proliferation of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2004 ;64:6740-9
- 130 Abdelrahim, M, Baker, CH, Abbruzzese, JL, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-1 expression by specificity proteins 1, 3, and 4 in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2007 ;67:3286-94
- 131 Gerber, HP, Condorelli, F, Park, J, Ferrara, N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997 ;272:23659-67
- 132 Higgins, KJ, Liu, S, Abdelrahim, M, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression is down-regulated by 17beta-estradiol in MCF-7 breast cancer cells by estrogen receptor alpha/Sp proteins. *Mol Endocrinol* 2008 ;22:388-402
- 133 Patterson, C, Perrella, MA, Hsieh, CM, et al. Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1995 ;270:23111-8
- 134 Takeda, N, Maemura, K, Imai, Y, et al. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res* 2004 ;95:146-53

- 135 Yang, H, Li, M, Chai, H, et al. Expression and regulation of neuropilins and VEGF receptors by TNF-alpha in human endothelial cells. *Journal of Surgical Research* 2004 ;122:249-55
- 136 Simiantonaki, N, Jayasinghe, C, Michel-Schmidt, R, et al. Hypoxia-induced epithelial VEGF-C/VEGFR-3 upregulation in carcinoma cell lines. *International Journal of Oncology* 2008 ;32:585-92
- 137 Shawber, CJ, Funahashi, Y, Francisco, E, et al. Notch alters VEGF responsiveness in human and murine endothelial cells by direct regulation of VEGFR-3 expression. *Journal of Clinical Investigation* 2007 ;117:3369-82
- 138 Iljin, K, Karkkainen, MJ, Lawrence, EC, et al. VEGFR3 gene structure, regulatory region, and sequence polymorphisms. *FASEB J* 2001 ;15:1028-36
- 139 Flister, MJ, Wilber, A, Hall, KL, et al. Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3 mediated by NF-kappaB and Prox1. *Blood* 2010 ;115:418-29
- 140 Hata, Y, Duh, E, Zhang, K, Robinson, GS, Aiello, LP. Transcription factors Sp1 and Sp3 alter vascular endothelial growth factor receptor expression through a novel recognition sequence. *J Biol Chem* 1998 ;273:19294-303
- 141 Higgins, KJ, Abdelrahim, M, Liu, S, Yoon, K, Safe, S. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in pancreatic cancer cells by Sp proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 ;345:292-301
- 142 Illi, B, Puri, P, Morgante, L, Capogrossi, MC, Gaetano, C. Nuclear factor-kappaB and cAMP response element binding protein mediate opposite transcriptional effects on the Flk-1/KDR gene promoter. *Circ Res* 2000 ;86:E110-E117
- 143 Ronicke, V, Risau, W, Breier, G. Characterization of the endothelium-specific murine vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) promoter. *Circ Res* 1996 ;79:277-85
- 144 Wu, Y, Patterson, C. The human KDR/flk-1 gene contains a functional initiator element that is bound and transactivated by TFII-I. *J Biol Chem* 1999 ;274:3207-14
- 145 Ades, EW, Candal, FJ, Swerlick, RA, et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 1992 ;99:683-90
- 146 Krump-Konvalinkova, V, Bittinger, F, Unger, RE, et al. Generation of human pulmonary microvascular endothelial cell lines. *Lab Invest* 2001 ;81:1717-27

- 147 Edgell, CJ, McDonald, CC, Graham, JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983 ;80:3734-7
- 148 Barranco, SC, Townsend, CM, Casartelli, C, et al. Establishment and Characterization of An Invitro Model System for Human Adenocarcinoma of the Stomach. *Cancer Research* 1983 ;43:1703-9
- 149 Schneider, I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 1972 ;27:353-65
- 150 Nordeen, SK. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* 1988 ;6:454-8
- 151 Courey, AJ, Tjian, R. Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* 1988 ;55:887-98
- 152 Hagen, G, Muller, S, Beato, M, Suske, G. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J* 1994 ;13:3843-51
- 153 Hagen, G, Dennig, J, Preiss, A, Beato, M, Suske, G. Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J Biol Chem* 1995 ;270:24989-94
- 154 Westwick, JK, Cox, AD, Der, CJ, et al. Oncogenic Ras activates c-Jun via a separate pathway from the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 ;91:6030-4
- 155 Wingender, E, Dietze, P, Karas, H, Knuppel, R. TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Res* 1996 ;24:238-41
- 156 Suske, G. The Sp-family of transcription factors. *Gene* 1999 ;238:291-300
- 157 Dong, XP, Pfister, H. Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 1999 ;80 (Pt 8):2097-101
- 158 Finkenzeller, G, Sparacio, A, Technau, A, Marme, D, Siemeister, G. Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene* 1997 ;15:669-76

- 159 Ryuto, M, Ono, M, Izumi, H, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem* 1996 ;271:28220-8
- 160 Dynan, WS, Tjian, R. Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell* 1983 ;32:669-80
- 161 Safe, S, Abdelrahim, M. Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer* 2005 ;41:2438-48
- 162 Hagen, G, Muller, S, Beato, M, Suske, G. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* 1992 ;20:5519-25
- 163 Kingsley, C, Winoto, A. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 1992 ;12:4251-61
- 164 Gill, G, Pascal, E, Tseng, ZH, Tjian, R. A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 ;91:192-6
- 165 Jackson, SP, MacDonald, JJ, Lees-Miller, S, Tjian, R. GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* 1990 ;63:155-65
- 166 Jackson, SP, Tjian, R. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* 1988 ;55:125-33
- 167 Daniel, S, Zhang, S, DePaoli-Roach, AA, Kim, KH. Dephosphorylation of Sp1 by protein phosphatase 1 is involved in the glucose-mediated activation of the acetyl-CoA carboxylase gene. *J Biol Chem* 1996 ;271:14692-7
- 168 Chupreta, S, Du, M, Todisco, A, Merchant, JL. EGF stimulates gastrin promoter through activation of Sp1 kinase activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000 ;278:C697-C708
- 169 Merchant, JL, Du, M, Todisco, A. Sp1 phosphorylation by Erk 2 stimulates DNA binding. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 ;254:454-61
- 170 Benasciutti, E, Pages, G, Kenzior, O, et al. MAPK and JNK transduction pathways can phosphorylate Sp1 to activate the uPA minimal promoter element and endogenous gene transcription. *Blood* 2004 ;104:256-62

- 171 Emili, A, Greenblatt, J, Ingles, CJ. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol* 1994 ;14:1582-93
- 172 Feng, XH, Lin, X, Derynck, R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J* 2000 ;19:5178-93
- 173 Billon, N, Carlisi, D, Datto, MB, et al. Cooperation of Sp1 and p300 in the induction of the CDK inhibitor p21WAF1/CIP1 during NGF-mediated neuronal differentiation. *Oncogene* 1999 ;18:2872-82
- 174 Ryu, S, Zhou, S, Ladurner, AG, Tjian, R. The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* 1999 ;397:446-50
- 175 Schäfer, G, Cramer, T, Suske, G, et al. Oxidative stress regulates vascular endothelial growth factor-A gene transcription through Sp1- and Sp3-dependent activation of two proximal GC-rich promoter elements. *J Biol Chem* 2003 ;278:8190-8
- 176 Strowski, MZ, Cramer, T, Schafer, G, et al. Helicobacter pylori stimulates host vascular endothelial growth factor-A (vegf-A) gene expression via MEK/ERK-dependent activation of Sp1 and Sp3. *FASEB J* 2003 ;
- 177 Azakie, A, Fineman, JR, He, Y. Sp3 inhibits Sp1-mediated activation of the cardiac troponin T promoter and is downregulated during pathological cardiac hypertrophy in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 ;291:H600-H611
- 178 Majello, B, De Luca, P, Hagen, G, Suske, G, Lania, L. Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Res* 1994 ;22:4914-21
- 179 Birnbaum, MJ, van Wijnen, AJ, Odgren, PR, et al. Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochemistry* 1995 ;34:16503-8
- 180 Dennig, J, Beato, M, Suske, G. An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains. *EMBO J* 1996 ;15:5659-67
- 181 Braun, H, Koop, R, Ertmer, A, Nacht, S, Suske, G. Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation. *Nucleic Acids Res* 2001 ;29:4994-5000
- 182 Supp, DM, Witte, DP, Branford, WW, Smith, EP, Potter, SS. Sp4, a member of the Sp1-family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability, and male fertility. *Dev Biol* 1996 ;176:284-99

- 183 Higgins, KJ, Liu, S, Abdelrahim, M, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression is induced by 17beta-estradiol in ZR-75 breast cancer cells by estrogen receptor alpha/Sp proteins. *Endocrinology* 2006 ;147:3285-95
- 184 Basha, R, Ingersoll, SB, Sankpal, UT, et al. Tolfenamic acid inhibits ovarian cancer cell growth and decreases the expression of c-Met and survivin through suppressing specificity protein transcription factors. *Gynecol Oncol* 2011 ;122:163-70
- 185 Bouwman, P, Gollner, H, Elsasser, HP, et al. Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. *EMBO J* 2000 ;19:655-61
- 186 Gollner, H, Dani, C, Phillips, B, Philipsen, S, Suske, G. Impaired ossification in mice lacking the transcription factor Sp3. *Mech Dev* 2001 ;106:77-83
- 187 Philipsen, S, Suske, G. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* 1999 ;27:2991-3000
- 188 Chilov, D, Kukk, E, Taira, S, et al. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem* 1997 ;272:25176-83
- 189 Schafer, G, Wissmann, C, Hertel, J, Lunyak, V, Hocker, M. Regulation of vascular endothelial growth factor D by orphan receptors hepatocyte nuclear factor-4 alpha and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors 1 and 2. *Cancer Res* 2008 ;68:457-66
- 190 Shi, Q, Le, X, Abbruzzese, JL, et al. Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001 ;61:4143-54
- 191 Yao, JC, Wang, L, Wei, D, et al. Association between expression of transcription factor Sp1 and increased vascular endothelial growth factor expression, advanced stage, and poor survival in patients with resected gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2004 ;10:4109-17
- 192 Wang, L, Wei, D, Huang, S, et al. Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2003 ;9:6371-80
- 193 Jiang, NY, Woda, BA, Banner, BF, et al. Sp1, a new biomarker that identifies a subset of aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008 ;17:1648-52
- 194 Zannetti, A, Del Vecchio, S, Carriero, MV, et al. Coordinate up-regulation of Sp1 DNA-binding activity and urokinase receptor expression in breast carcinoma. *Cancer Res* 2000 ;60:1546-51

- 195 Lietard, J, Musso, O, Theret, N, et al. Sp1-mediated transactivation of LamC1 promoter and coordinated expression of laminin-gamma1 and Sp1 in human hepatocellular carcinomas. *Am J Pathol* 1997 ;151:1663-72
- 196 Chiefari, E, Brunetti, A, Arturi, F, et al. Increased expression of AP2 and Sp1 transcription factors in human thyroid tumors: a role in NIS expression regulation? *BMC Cancer* 2002 ;2:35
- 197 Hosoi, Y, Watanabe, T, Nakagawa, K, et al. Up-regulation of DNA-dependent protein kinase activity and Sp1 in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2004 ;25:461-8
- 198 Jones, PA, Baylin, SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002 ;3:415-28
- 199 Marks, PA, Richon, VM, Miller, T, Kelly, WK. Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res* 2004 ;91:137-68
- 200 de Ruijter, AJ, van Gennip, AH, Caron, HN, Kemp, S, van Kuilenburg, AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003 ;370:737-49
- 201 Kawai, H, Li, H, Avraham, S, Jiang, S, Avraham, HK. Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha. *Int J Cancer* 2003 ;107:353-8
- 202 Yarden, RI, Brody, LC. BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 ;96:4983-8
- 203 Giles, RH, Peters, DJ, Breuning, MH. Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet* 1998 ;14:178-83
- 204 Dong, XF, Song, Q, Li, LZ, Zhao, CL, Wang, LQ. Histone deacetylase inhibitor valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in KM3 cells via downregulating VEGF receptor. *Neuro Endocrinol Lett* 2007 ;28:775-80
- 205 Kim, MS, Kwon, HJ, Lee, YM, et al. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nature Medicine* 2001 ;7:437-43
- 206 McLaughlin, F, La Thangue, NB. Histone deacetylase inhibitors open new doors in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2004 ;68:1139-44
- 207 Mie, LY, Kim, SH, Kim, HS, et al. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by FK228, a specific histone deacetylase inhibitor, via suppression of HIF-1alpha activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 ;300:241-6

- 208 Zhang, Y, Dufau, ML. Silencing of transcription of the human luteinizing hormone receptor gene by histone deacetylase-mSin3A complex. *J Biol Chem* 2002 ;277:33431-8
- 209 Huang, W, Zhao, S, Ammanamanchi, S, et al. Trichostatin A induces transforming growth factor beta type II receptor promoter activity and acetylation of Sp1 by recruitment of PCAF/p300 to a Sp1.NF-Y complex. *J Biol Chem* 2005 ;280:10047-54
- 210 Swingler, TE, Kevorkian, L, Culley, KL, et al. MMP28 gene expression is regulated by Sp1 transcription factor acetylation. *Biochem J* 2010 ;427:391-400
- 211 Gao, J, Chen, T, Liu, J, et al. Loss of NECL1, a novel tumor suppressor, can be restored in glioma by HDAC inhibitor-Trichostatin A through Sp1 binding site. *Glia* 2009 ;57:989-99
- 212 Nunes, MJ, Milagre, I, Schnekenburger, M, et al. Sp proteins play a critical role in histone deacetylase inhibitor-mediated derepression of CYP46A1 gene transcription. *J Neurochem* 2010 ;113:418-31
- 213 Schnur, N, Seuter, S, Katryniok, C, Radmark, O, Steinhilber, D. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A mediates upregulation of 5-lipoxygenase promoter activity by recruitment of Sp1 to distinct GC-boxes. *Biochim Biophys Acta* 2007 ;1771:1271-82
- 214 Cucciolla, V, Borriello, A, Criscuolo, M, et al. Histone deacetylase inhibitors upregulate p57Kip2 level by enhancing its expression through Sp1 transcription factor. *Carcinogenesis* 2008 ;29:560-7
- 215 Choi, HS, Lee, JH, Park, JG, Lee, YI. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, activates the IGFBP-3 promoter by upregulating Sp1 activity in hepatoma cells: alteration of the Sp1/Sp3/HDAC1 multiprotein complex. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 ;296:1005-12
- 216 Quentmeier, H, Eberth, S, Romani, J, et al. DNA methylation regulates expression of VEGF-R2 (KDR) and VEGF-R3 (FLT4). *BMC Cancer* 2012 ;12:19
- 217 Lee, LT, Tan-Un, KC, Pang, RT, Lam, DT, Chow, BK. Regulation of the human secretin gene is controlled by the combined effects of CpG methylation, Sp1/Sp3 ratio, and the E-box element. *Mol Endocrinol* 2004 ;18:1740-55
- 218 Pang, RT, Lee, LT, Ng, SS, Yung, WH, Chow, BK. CpG methylation and transcription factors Sp1 and Sp3 regulate the expression of the human secretin receptor gene. *Mol Endocrinol* 2004 ;18:471-83

8. Abkürzungsverzeichnis

5-Aza dC	5-Aza-Deoxycytidine
A	Adenin
AKT	Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cytosin
cDNA	cyclic DNA
CREB	cAMP response element binding protein
CRSP	cofactor required for Sp1 activation
DBD	dominant-negative DNA-Bindungsdomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EMSA	Electro Mobility Shift Assay
eNOS	endotheliale NO Synthase
ERK1/2	extracellular signal-related kinase 1/2
FCS	Fetal Calf Serum
G	Guanin
GRB	growth factor receptor binding protein
HAT	Histonacetylase
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HDAC	Histondeacetylasen
HIF	Hypoxia-inducible factor
IGF	insulin growth factor
JNK1/2	c-JUN N-terminal kinase- 1/2
LHR	Luteinizing hormone receptor
LYVE-1	Lymphatic Vessel Endothelial Receptor
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NSCLC	Non-Small-Cell Lung Cancer
PBS	Phosphate Buffered

	Saline
PIGF	Placental Growth Factor
RDGF	retina-derived growth factor
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Realtime-Polymerase Chain Reaction
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid
S.E.M.	Standard Error of the Mean
SHC	Src homology containing protein
siRNA	small interfering RNA
Sp	Specificity Protein
T	Thymin
TAF	tumour angiogenesis Factor
TAM	tumorassoziierte Makrophagen
TGF	transforming growth factor
TK	Thymidinkinase
TNF	tumour necrosis factor)
TSA	Trichostatin A
Tyr	Tyrosilrest
<i>vegf</i>	vascular endothelial growth factor (<i>Gen</i>)
VEGF	vascular endothelial growth factor (Protein)
<i>vegfr</i>	vascular endothelial growth factor receptor (<i>Gen</i>)
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VHD	VEGF – Homologie– Domäne
XKLF	Krüppel-like family of transcription factors

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Rezeptorbindungsspezifität der VEGF-Liganden und schematische Darstellung der VEGF-Rezeptoren.	14
Abbildung 2:	Basalexpression des <i>vegfr-3</i> – Gens in endothelialen und epithelialen Zelllinien und Eingrenzung des funktionell relevanten Promoterbereichs .	41
Abbildung 3:	Basensequenz des <i>vegfr-3</i> Promoterelements und der Mutanten, Eingrenzung des minimalen Promoterbereichs und Darstellung der Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an den <i>vegfr-3</i> – Promoter	43
Abbildung 4:	Funktionelle Relevanz der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 für die Aktivierung des <i>vegfr-3</i> - Promoters	45
Abbildung 5:	Funktionelle Feinanalyse von Sp1 und Sp3 durch Überexpressionsexperimente in SL-2	47
Abbildung 6:	Einfluss von Promoteracetylierung auf die <i>vegfr-3</i> – Expression	49
Abbildung 7:	Einfluss von Promotermethylierung auf die <i>vegfr-3</i> – Expression.	51
Abbildung 8:	Einfluss von epigenetischer Modifikation auf die Bindung und Trans- aktivierung von Sp1 und Sp3	54
Tabelle 1:	Zelllinien	27
Tabelle 2:	Primer- und Sondensequenzen für quantitative RT-PCR	30
Tabelle 3:	Reportergenkonstrukte für transiente Transfektionen	32
Tabelle 4:	Oligonukleotidsequenzen für EMSA (Sonde/Kompetition) und Subklonierung in das heterologe Promotersystem pT81-Luc	33
Tabelle 5:	Basensequenzen der zur Mycoplasmentestung eingesetzten Primer . .	36
Tabelle 6:	In EMSA-Studien eingesetzte Antikörper	38

10. Anhang

10.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Johannes Hertel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Untersuchungen molekularer Mechanismen zur transkriptionellen und epigenetischen Regulation des humanen vegfr-3 - Gens am Zellmodell“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

10.2 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Johannes Hertel hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-3 by zinc finger proteins Sp1 and Sp3.

Hertel J*, Hirche C*, Wissmann C, Ebert M, Höcker M

*geteilte Erstautorenschaft

Eingereicht zur Publikation

Anteil: 40%

Beitrag im Einzelnen: Versuchsplanung und -durchführung, insb. Zellkultur, Planung und Veranlassung der Sequenzmutationen, Klonierung des Minimalkonstrukts im Promotersystem pT81, Quantitative Real-Time RT-PCR, Transfektionsstudien, Stimulationsansätze mit TSA und 5-Aza dC, EMSA, Erstellung des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

10.3 Lebenslauf

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

10.4 Publikationsliste

Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-3 by zinc finger proteins Sp1 and Sp3.

Hertel J*, Hirche C*, Wissmann C, Ebert M, Höcker M

*geteilte Erstautorenschaft

Eingereicht zur Publikation

Regulation of vascular endothelial growth factor D by orphan receptors hepatocyte nuclear factor-4 alpha and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors 1 and 2.

Schäfer G, Wissmann C, Hertel J, Lunyak V, Höcker M.

Cancer Research. 2008

Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma.

Jüttner S, Wissmann C, Jöns T, Vieth M, Hertel J, Gretschel S, Schlag PM, Kemmner W, Höcker M.

Journal of Clinical Oncology. 2006

10.5 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Höcker, Leiter des Labors für Angiogenese und Tumormetastasierung, herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die gute fachliche und persönliche Unterstützung danken. Die motivierenden Gespräche sowie die produktive und konstruktive Betreuung haben mir entscheidend bei Erstellung dieser Arbeit geholfen.

Herrn Prof. Dr. med. Wiedenmann danke ich dafür, dass ich im Labor für Angiogenese und Tumormetastasierung der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Campus Virchow – Klinikum der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin meine Dissertation durchführen konnte.

Herrn Dr. rer. nat. Christoph Wissmann danke ich für die Einweisung in die Methodik und kontinuierliche Betreuung während der Laborarbeiten.

Den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Herrn Dr. med. Christoph Hirche, Frau Dr. rer. nat. Nadine Rohwer und Frau Dr. rer. nat. Wenke Jonas danke ich für die angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor, insbesondere danke ich den ersten beiden für die Durchsicht dieser Arbeit und die konstruktiven Hinweise, welche maßgeblich zu ihrer Fertigstellung beigetragen haben.

Ich danke meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinen Freunden für die Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen.

Schließlich danke ich meiner Freundin Kathrin, die mich mit unendlicher Geduld und großem Verständnis jederzeit motiviert und unterstützt hat.