

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Regulation der Aktivität des
fms-like-Thyrosinkinaserzeptor-1-Promotors

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Oliver Krysiak

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. G. Schönfelder
2. Prof. Dr. Dr. med. St.-M. Brandt-Herrmann
3. Prof. Dr. G. Breier

Datum der Promotion: 09.12.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Anteil des Promovenden an den vorgelegten Publikationen	1
2. Zusammenfassung	3
Hintergrund	3
Zielsetzungen	3
Methoden	3
Ergebnisse	4
Konklusion	4
3. Einleitung und Fragestellung	5
4. Methoden	6
Zellkultur	6
Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	6
Migrationsversuche (Boyden-Kammer)	7
Reportergen-Analyse	7
Single strand conformation polymorphism (SSCP)	8
Restriktions Fragment Längen Polymorphismus (RFLP)	8
Bioinformatik	8
5. Ergebnisse	8
6. Diskussion	9
7. Literaturverzeichnis	12
8. Danksagung	15
Anhang 1: verwendete Originalarbeiten	16
Anhang 2: Lebenslauf	43
Anhang 3: Erklärung über die Selbständigkeit	45

1. Anteil des Promovenden an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1: Krysiak, O; Bretschneider, A; Zhong, E; Webb, J; Hopp, H; Verloren, S; Fuhr, N; Lanowska, M; Nonnenmacher, A; Vetter, R; Jankowski, J; Paul, M; Schonfelder, G. SOLUBLE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-1 (sFLT-1) MEDIATES DOWNREGULATION OF FLT-1 AND PREVENTS ACTIVATED NEUTROPHILS FROM WOMEN WITH PREECLAMPSIA FROM ADDITIONAL MIGRATION BY VEGF. **Circulation Research. 97, 1253-61 (2005).**

50 Prozent Eigenanteil

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

- Reverse Transkription (RT) PCR Analyse
- Realtime (TaqMan) Polymerase Ketten Reaktion
- Reportergen Analyse mittels Elektroporationen von HL-60
- Untersuchung auf genetische Varianten des FLT1-Promotors mittels Single Strand Conformation Polymorphismus Analyse (SSCP)

Publikation 2: Menendez, D; Krysiak, O; Inga, A; Krysiak, B; Resnick, MA; Schonfelder, G. A SNP IN THE FLT-1 PROMOTER INTEGRATES THE VEGF SYSTEM INTO THE P53 TRANSCRIPTIONAL NETWORK. **Proc Natl Acad Sci U S A. 103, 1406-11 (2006).**

40 Prozent Eigenanteil

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

- Single Strand Conformation Polymorphismus Analyse (SSCP) und Restriktions Fragment Längen Polymorphismus (RFLP)
- Klonierung des FLT1-Promoters und seiner einzelnen genetischen Varianten
- Anteilig Transfektionen / Kotransfektionen von MCF-7 und HMEC-Zellen mit p53 und FLT1-Promoter-Plasmid
- Zellkultur von HCT 116, MCF-7 und HMEC-Zellen
- Anteilig Reportergenanalysen (Luciferase-Assays)
- Reverse Transkription (RT)-PCR

Publikation 3: Menendez, D; Inga, A; Snipe, J; Krysiak, O; Schonfelder, G; Resnick, MA.

A SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN A HALF-BINDING SITE CREATES P53 AND ESTROGEN RECEPTOR CONTROL OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 1. **Molecular Cell Biology.** (2007).

15 Prozent Eigenanteil

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

- Anteilig Klonierung der Reporter-Plasmide mit FLT1-Konstrukt
- Anteilig Zellkultur von HCT116-Zellen und Kotransfektionen mit p53 und Reporterplasmid
- Reverse Transkription Realtime (TaqMan) Polymerase Ketten Reaktion

2. Zusammenfassung

Hintergrund:

Angiogenese ist ein entscheidender Prozess bei vielen physiologischen und pathologischen Vorgängen im menschlichen Organismus. Eine zentrale Rolle in diesen Vorgängen nehmen der Wachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und seine Rezeptoren VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR-1, FLT1 = fms like tyrosine kinase 1) und VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2, flk-1 = fetal liver kinase-1 / kdr = kinase insert domain-containing receptor) ein. Sowohl bei malignen als auch nicht malignen Erkrankungen mit Beteiligung des Blut- und Blutgefäßsystems ist die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren verändert [1].

Es gibt aber auch Hinweise auf eine Bedeutung des VEGF-Systems bei der Pathogenese der Präeklampsie, einer Erkrankung der Schwangeren, die zu erhöhtem Blutdruck, Proteinurie und Ödemen führt, mit dem Risiko für einen durch ein Hirnödem bedingten Krampfanfall, der Eklampsie [2]. VEGF beeinflusst die zelluläre Immunabwehr, es kommt zu einer Interaktion Polymorphkerniger Neutrophiler Granulozyten (PMNs) mit dem Endothel im Rahmen einer generalisierten Entzündungsreaktion und dadurch zu einer maternalen Endotheldysfunktion mit den daraus resultierenden Symptomen [1,3,4].

Mutationen des genetischen Codes im Bereich der Promotorregion des FLT1-Gens könnten zu interindividuellen Aktivitätsunterschieden führen, indem A) Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren verändert werden und B) die Bindung eines Liganden verändert wird [5].

Zielsetzungen:

Der erste Teilabschnitt der Promotionsarbeit soll sich mit den Veränderungen im VEGF-System bei der Präeklampsie und deren Einfluss auf die Aktivität der PMNs der Schwangeren beschäftigen. Der zweite und dritte Abschnitt befassen sich mit der Identifizierung und funktionellen Charakterisierung von genetischen Polymorphismen in der FLT1-Promotorregion.

Methoden:

Die Bestimmung der FLT1-Expression von PMNs unter verschiedenen Bedingungen erfolgte mittels Durchflußzytometrie. Die mRNA-Expression der VEGF-Rezeptoren wurde durch RT-Realtime-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) gemessen. Veränderungen der Migration der PMNs wurden in der Boyden-Kammer untersucht.

Die Promotorsequenz des FLT1-Gens wurde mittels single-strand conformation polymorphism (SSCP)-Analyse auf mögliche Polymorphismen untersucht, auffällige Proben wurden durch automatische Sequenzierung charakterisiert. Es wurde die Promotoraktivität mit Hilfe eines Promotor-Luciferase-Konstrukts untersucht. Hierzu wurden verschiedene Zelllinien transfiziert und die Luciferaseaktivität nach verschiedenen Inkubationsbedingungen gemessen. Zur Untersuchung des

Einfluss von Transkriptionsfaktoren wurden entsprechende Plasmide kotransfiziert. Die Verteilung der gefundenen Polymorphismen in verschiedenen Patientenkollektiven wurde mittels Restriktions-Fragment-Length-Polymorphism (RFLP) untersucht [6-8].

Ergebnisse:

Die Analyse mütterlicher Neutrophiler Granulozyten zeigt eine Beziehung zwischen der Expression von FLT1 und dem Schwangerschaftsalter. Neutrophile von präeklampsischen Frauen weisen eine geringere Expression von FLT1 und der löslichen Form des Rezeptors sFLT1 auf. Im Gegensatz hierzu sind bei diesen Patienten die Serumspiegel von sFLT1 erhöht. Die FLT1-Promotoraktivität bei präeklampsischen Schwangeren ist vermindert. Die Migrationsrate von Neutrophilen, die aus dem Blut präeklampsischer Patientinnen isoliert wurden, war im Vergleich zu normotensiven Schwangeren erhöht, jedoch nicht mehr durch VEGF regulierbar.

SSCP-Analysen ergaben einen Basenaustausch (Single Nucleotide Polymorphism = SNP) von C nach T in der Promotorregion des FLT1-Gens auf Position 519 der veröffentlichten Sequenz (Genebank accession no. D64016 = Wildtyp/WT). Die Untersuchung einer größeren Probenzahl ergab eine Frequenz des Genotypen mit einer Häufigkeit von ca. 6% heterozygoter Erbträger. Funktionell wurde die polymorphe Sequenz als Bindungsstelle für den Tumorsuppressor p53 identifiziert. Untersuchungen mittels Reporterassays zeigen nur im Promotor mit der T-Variante eine p53 abhängige-Antwort. Ebenso zeigen Zelllinien, die heterozygot für den SNP (WT/SNP) sind, eine Steigerung der Promotoraktivität durch p53.

Konklusion:

Die drei Teile dieser Arbeit ergeben zusammenfassend näheren Aufschluss über die Regulationsmechanismen des VEGF-Systems im Allgemeinen und des FLT1-Rezeptors im Speziellen. Im ersten Teil konnte gezeigt werden, dass es, durch zirkulierendes sFLT1, bei präeklampsischen Schwangeren zu Veränderungen in der FLT1-Expression auf PMNs und daraus folgend zu veränderter Migration dieser Zellen kommt. Die gesteigerte Interaktion der Granulozyten mit dem Endothel ohne Kontrolle durch das VEGF-System ist Teil der komplexen Pathomechanismen im Rahmen einer Präeklampsie.

Im zweiten und dritten Teil konnten wir erstmals eine Verbindung zwischen dem VEGF-System und dem Tumorsuppressor p53 herstellen. Der von uns gefundene SNP bedingt eine Abhängigkeit der FLT1-Expression von p53 während der Tumorsuppressor keinen Einfluss auf die Aktivität des Wildtyp-Promotors hat. Durch Kotransfektion induzierte p53-Aktivität, steigert die Promotorantwort von FLT1. Zelllinien, die heterozygot für den SNP sind, zeigen ein anderes FLT1-Expressionsmuster als Zelllinien, die homozygot für den Wildtyp sind.

Viele maligne Erkrankungen gehen mit einer veränderten Expression von FLT1 und daraus resultierend mit einer abnormen Angiogenese einher. Daher ist dieser Polymorphismus im

multifaktoriellen Prozess der Tumorentstehung und des Tumorprogress möglicherweise einer der entscheidenden Faktoren.

3. Einleitung und Fragestellung

VEGF und seine Rezeptoren sind an vielen Prozessen des Blutes und Blutgefäßsystems beteiligt. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei Angiogenese und Vaskulogenese, bei der Aktivierung von Zellen des Monozyten-Makrophagensystems, sowie in der Tumorgenese und Metastasierung.

VEGF bindet und aktiviert v.a. zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren: VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1, FLT1 = Fms-like tyrosine kinase receptor 1) und VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2, FLK1/KDR = fetal liver kinase 1 / kinase insert domain protein receptor). Die meisten Effekte von VEGF werden durch FLK1 vermittelt. FLT1-Aktivierung spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung des Gefäßlumens in der Vaskulogenese und ist im Rahmen maligner Wachstumsprozesse mit Progress und Metastasierung assoziiert. Zellen des Monozyten-Makrophagensystems, welche FLT1 exprimieren, steigern ihre chemotaktische Aktivität nach Bindung von VEGF an den FLT1-Rezeptor. Von FLT1 existiert eine lösliche Variante (sFLT1 = soluble FLT1), die im Blut zirkuliert und die Konzentration von ungebundenem VEGF vermindern und somit seine Bindung an die membranständigen Rezeptoren FLT1 und KDR vermindern kann [1,3,4,9].

Viele Veröffentlichungen und auch die Arbeiten von Frau Dr. Anja Bretschneider aus unserer Arbeitsgruppe (AG Prof. Dr. Schönfelder) weisen darauf hin, dass das VEGF-System beim Krankheitsbild der Präeklampsie durch Beeinflussung der FLT1-Expression auf neutrophilen Granulozyten und durch Veränderung der Neutrophilenmigration eine entscheidende Rolle spielt [1,9]. Präeklampsie ist eine Erkrankung, die in 5-10% aller Schwangerschaften auftritt. Sie ist charakterisiert durch erhöhten Blutdruck und Proteinurie. In vielen Fällen treten auch Ödeme sowie Gerinnungsstörungen auf. Die Ätiologie der Erkrankung ist bisher nicht vollständig geklärt, es scheint jedoch immer eine placentare Minderversorgung vorzuliegen, die zur Ausschüttung von Zytokinen führt [10,11]. Dies bewirkt eine Aktivierung von Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (=PMNs), die durch Ausschüttung von Sauerstoffradikalen eine Schädigung des Gefäßsystems verursachen [12-16]. Wie schon erwähnt, scheint das VEGF-System in die Pathogenese der Präeklampsie eingebunden zu sein. Besonders interessant für uns war der FLT1-Rezeptor sowie die lösliche Variante sFLT1: Beide Rezeptoren werden im Blut von Schwangeren exprimiert, nicht jedoch bei nichtschwangeren Frauen oder bei Männern [17]. Eine erhöhte sFLT1-Expression der präeklampsischen Plazenta vermindert die Menge des freien VEGFs im Blut [1].

Da das VEGF-System Einfluss auf die Aktivität von Entzündungszellen nimmt und PMNs an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion beteiligt sind, beschäftigte sich bereits Frau Dr. Anja Bretschneider aus unserer Arbeitsgruppe mit dem Einfluss von VEGF und seinem Rezeptor FLT1 auf die Neutrophilen Granulozyten bei präeklampsischen Frauen. Es zeigte sich, dass auf PMNs FLT1 exprimiert wird und diese Expression bei schwangeren Patientinnen mit einer Präeklampsie

vermindert ist. Diese verminderte Expression auf der Zelloberfläche der PMNs spiegelte sich in ihrem Migrationsverhalten wider: Neutrophile Granulozyten von präeklampsischen Patientinnen waren nicht in der Lage, ihre Migrationsrate in der Boyden-Kammer nach Stimulation mit VEGF165 zu steigern, während Zellen von gesunden Schwangeren einen Anstieg der Migration abhängig von der VEGF-Konzentration zeigten [6]. Diese Ergebnisse führten zu den folgenden Fragestellungen:

- (1) Führen Veränderungen der FLT1-Promotoraktivität zu den beobachteten Veränderungen der FLT1-Expression bei präeklampsischen Patientinnen?
- (2) Gibt es genetische Variationen im FLT1-Promotorbereich, die die Aktivitätsunterschiede erklären können?
- (3) Wird die FLT1-Expression auf PMNs sowie deren Aktivität durch sFLT1 in vitro und in vivo beeinflusst?
- (4) Haben diese Polymorphismen Einfluss auf die Aktivität des FLT1-Promotors?
- (5) Können Aktivitätsunterschiede zwischen Wildtyp-Promotor und polymorphem Promotor durch veränderte Bindung von Transkriptionsfaktoren erklärt werden?
- (6) Welche regulatorischen Sequenzen sind für die Aktivität des FLT1-Promotors bei Vorliegen des Polymorphismus von Bedeutung?
- (7) Wie ist die FLT1-Promotoraktivität bei Vorliegen des Polymorphismus reguliert?

4. Methoden

Zellkultur:

Zur Bestimmung des Einflusses von VEGF auf die FLT1-Expression der PMNs, wurden isolierte mütterliche Zellen für 24 Stunden mit 0,6nM rekombinantem VEGF165 (Biochrome AG) oder Aqua bidest (als Negativkontrolle) stimuliert. Um den Einfluss von sFLT1 zu untersuchen, wurden Zellen 2 Stunden vor der o.g. Stimulation mit 1000pg/ml sFLT1 vorinkubiert. Die Bestimmung der FLT1-Expression erfolgte nach 24 Stunden wie in den Quellen beschrieben mittels Durchflußzytometrie [6].

Reverse Transkription-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR):

PMNs wurden sofort nach Blutabnahme mittels Gradientenzentrifugation (Polymorphprep; AXIS-SHIELD PoC AS) isoliert. Human Microvascular Endothelial Cells (HMEC-1) dienten als Positivkontrolle für die Expression von KDR und FLT1.

Um den Einfluss des gefundenen Polymorphismus auf die mRNA-Expression von FLT1 zu untersuchen, wurde diese aus HCT116-Zellen, die heterozygot für den Polymorphismus im Promotorbereich von FLT1 sind, isoliert. Nach Erststrangsynthese wurde die FLT1-mRNA-Expression mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Als Referenz wurde das Housekeeping-Gen beta-Actin parallel untersucht.

Die Erstrangsynthese erfolgte wie in den angefügten Veröffentlichungen beschrieben [6,7].

Zur Kontrolle der cDNA-Qualität und -Menge wurde eine RT-PCR mit beta-Actin durchgeführt. Zur Bestimmung der FLT1- und sFLT1-Spiegel in Proben präeklaptischer und normotensiver Patientinnen wurden spezifische Primer für FLT1, sFLT1 sowie entsprechende taqMan-Sonden eingesetzt. Die quantitative PCR wurde auf einem entsprechenden PCR-Gerät (Applied Biosystems 7700 System, PerkinElmer) durchgeführt.

Migrationsversuche (Boyden-Kammer):

Zur Untersuchung der FLT1-abhängigen Migration isolierter mütterlicher PMNs wurden diese in einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in 12-Well-Platten mit einem Membraneinsatz mit einer Porengröße von $3\mu\text{m}$ (Zellkultureinsätze, NUNC) ausgesät. Die Zellen wurden in den oberen Teil der Kammer pipettiert, die Reagenzien, deren chemotaktische Wirkung analysiert werden sollte, in den unteren Teil. Untersucht wurden folgende Substanzen: VEGF165 0,3nM und 0,6nM sowie Aqua bidest. (Negativkontrolle). Der Einfluss von sFLT1 wurde wie oben beschrieben durch 2-stündige Vorinkubation mit 1000pg/ml sFLT1 untersucht. Ein weiteres Experiment sollte den Einfluss einer 2-stündigen Vorinkubation mit Serum normotensiver oder präeklaptischer Mütter auf die FLT1-abhängige Migration der isolierten Zellen klären. Die Zellzahl in der unteren Kammer wurde nach 24 Stunden gemessen.

Reportergen-Analyse:

Um zu untersuchen, ob es sich bei der vermehrten Expression von FLT1 in PMNs nach VEGF-Stimulation um einen Promotor vermittelten Effekt handelt, untersuchten wir die FLT1-Promotoraktivität in HL-60 Zellen: Wir erstellten Oligonukleotide, die die Promotorsequenz von FLT1 [gi1088437, ID64016.1] erkennen. Mittels PCR wurde diese Sequenz amplifiziert und durch spezifische Restriktionsschnittstellen (MluI und HindIII) der verwendeten Primer in den Luziferase-Vektor pGL3basic (Promega) kloniert (pGL3-FLT1-C). Die Sequenz der erhaltenen Plasmide wurde mittels automatischer Sequenzierung überprüft. Für den polymorphen FLT1-Promotor wurde nach demselben Verfahren ein Reporter-Plasmid erstellt (pGL3-FLT1-T).

Für die Reportergenassays wurden MCF-7-Zellen, die p53 exprimieren, verwendet: Es wurden Transfektionen mit pGL3-FLT1-T bzw. pGL3-FLT1-C-Plasmid durchgeführt, sowie Kotransfektionen mit WT-p53 bzw. einer trunkierten p53-Variante (Q331stop). pSV-beta-Galactosidase -Vektor (Promega) wurde zur Normierung der Ergebnisse kotransfiziert.

Zur Untersuchung des Einflusses von VEGF und sFLT1 auf die FLT1-Promotoraktivität wurden HL-60 Zellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen-DSMZ) bei einer Konzentration von $0,5 \times 10^5$ Zellen/ml in RPMI 1640 (10 % FCS) ausgesät und 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Transfektion wurden die Zellen geerntet, in serumfreiem RPMI 1640 resuspendiert und nach Zugabe des pGL3-FLT1-C Reporter-Plasmids mittels Elektroporation transfiziert. Die Zellen

wurden für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Eine Stimulation erfolgte durch Zusatz von 0,6nM rekombinantem VEGF165 oder Aqua bidest. (Negativkontrolle). Der Einfluss von sFLT1 wurde abermals durch Vorinkubation für 2 Stunden mit sFLT1 (1000pg/ml) untersucht. Nach 24 Stunden erfolgte die Messung der Aktivität für Luciferase und beta-Galaktosidase wie in den angefügten Veröffentlichungen beschrieben [7].

Single strand conformation polymorphism (SSCP):

DNA aller Patientinnen und Patienten wurde nach Standardtechniken isoliert. Fragmente der Promotorregion von FLT1 wurden mittels genomischer PCR amplifiziert. SSCP-Analysen wurden durchgeführt wie in den angefügten Veröffentlichungen beschrieben [6,7].

Proben von Patienten mit verändertem Laufmuster im SSCP-Gel wurden mittels automatischer Sequenzierung analysiert (ABI Prism 377, Perkin-Elmer). Hierbei wurden jeweils beide DNA-Stränge mit Vorwärts- bzw. Rückwärts- Primer einzeln untersucht.

Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP):

Zur Bestimmung der Häufigkeitsverteilung des identifizierten Polymorphismus untersuchten wir Patientenproben sowie ausgewählte Zelllinien mittels RFLP.

Für die RFLP wurde genomische DNA mittels für den polymorphen Bereich spezifischer Primer amplifiziert und anschließend mit Hilfe eines für den gesuchten Polymorphismus spezifischen Restriktionsenzym verdaut. Für den identifizierten Polymorphismus 519C/T wurde hierbei das Enzym NspI (New England Biolabs) oder das Isoenzym XceI (Fermentas) verwendet.

Bioinformatik:

Zur Identifizierung bereits bekannter Polymorphismen im FLT1-Promotor durchsuchten wir die Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (dbSNP), die Human Gene Mutation Database sowie die Human Genic Bi-Allelic Sequences.

5. Ergebnisse

Es konnte bereits gezeigt werden, dass FLT1 auf PMNs von schwangeren Patientinnen exprimiert wird und diese Expression einen typischen Verlauf während der Schwangerschaft aufweist. Bei präeklampsischen Patientinnen sind Expression von FLT1 sowie VEGF induzierte Migration vermindert [6].

Eine mögliche Ursache dieser veränderten Expression und Migration ist der hohe Serumspiegel von sFLT1. Im ELISA konnten wir zeigen, dass präeklampsische Patientinnen verglichen mit normotensiven Patientinnen einen signifikant höheren sFLT1-Serumspiegel aufweisen.

Wurden PMNs von normotensiven Patientinnen mit sFLT1 vorinkubiert, ergaben Messungen im Durchflusszytometer ein vermindertes Ansprechen der FLT1-Expression auf VEGF-Stimulation verglichen mit einer nicht vorbehandelten Kontrolle. Transfektionsversuche mit HL-60-Zellen zeigten ebenfalls eine Steigerung der Promotoraktivität nach VEGF-Stimulation sowie eine Blockierbarkeit dieses Effekts durch sFLT1.

Verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe, zeigten die Zellen der präeklampsischen Patientinnen eine erhöhte Migrationsaktivität in der Boyden-Kammer. Zellen normotensiver Patientinnen migrierten weniger, waren jedoch dosisabhängig durch VEGF stimulierbar. Entsprechend den Ergebnissen der Durchflusszytometrie war der Effekt von VEGF auf die Migration durch Vorinkubation mit sFLT1 blockierbar. Ebenso war der VEGF-Effekt auf die Migration vermindert, wenn Zellen, die von normotensiven Patientinnen isoliert wurden, mit Serum präeklampsischer Patientinnen vorinkubiert wurden. Durch das Serum präeklampsischer Schwangerer wurde jedoch nur die VEGF-bedingte Migration verhindert, die allgemeine Migrationsaktivität wurde durch das Serum der präeklampsischen Patientinnen erhöht.

Um eine mögliche genetische Ursache der bisherigen Ergebnisse zu untersuchen, führten wir SSCP-Analysen der Promotorregion von FLT1 durch. Dabei zeigte sich ein auffälliges Laufmuster in ca. 6% der Patientenproben. Die Sequenzierung dieser Proben ergab einen Basenpaaraustausch von C nach T in der Position 519 der veröffentlichten Sequenz (677 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart). Untersuchungen mittels RFLP ergaben, dass die Zelllinie HCT-116 heterozygot für den SNP ist. Datenbankanalysen zeigten, dass durch den SNP eine Konsensussequenz für den Tumorsuppressor p53 entstanden ist.

Transfektionen ergaben eine 8-fach höhere Promotoraktivität bei Transfektion des polymorphen Promotors. Kotransfektion der Plasmide mit p53-WT-Plasmiden ergaben eine weitere Steigerung der Promotoraktivität im pGL3-FLT1-T um den Faktor 4, wohingegen bei pGL3-FLT1-C keine Steigerung der Aktivität zu beobachten war.

6. Diskussion

Unsere Ergebnisse, wie auch schon die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, weisen auf eine entscheidende Rolle des VEGF-Systems bei der Präeklampsie hin. So soll die Ausschüttung von sFLT1 die Wirkung von VEGF und PlGF derart vermindern, dass es zu einer Beeinträchtigung des maternalen Gefäßsystems kommt, das zur Erhaltung seiner normalen Funktion VEGF benötigt [18,19]. Bei Schwangeren kommt es durch die Plazenta zu einer vermehrten Ausschüttung von VEGF und PlGF, diese werden jedoch teilweise durch sFLT1 gebunden. Es ist bekannt, dass während der Schwangerschaft die Serumkonzentrationen von VEGF, PlGF und sFLT1 zunächst ansteigen, ein Maximum zwischen der 29. und 32. Schwangerschaftswoche (SSW) erreichen und dann zur Geburt hin wieder abfallen [18]. Diesen Verlauf sahen wir auch für die Expression von FLT1 auf PMNs. Bei

präeklampsischen Frauen war die FLT1-Expression auf PMNs niedriger als in der normotensiven Gruppe, was durch die erhöhte Serumkonzentration von sFLT1 bei präeklampsischen Patientinnen zu erklären ist. Diese Konzentrationserhöhung des sFLT1 führt zu einer Verminderung der Konzentration von freiem VEGF im Serum. Von Zellen des endothelialen Systems ist bekannt, dass die FLT1-Expression durch VEGF-Stimulation induziert wird [20]. Wir beobachteten ebenfalls diesen Effekt, wenn wir die PMNs von normotensiven Müttern mit VEGF stimulierten. Wird das freie VEGF bei präeklampsischen Patientinnen durch sFLT1 vermehrt gebunden, kann dies erklären, weshalb PMNs von präeklampsischen Patientinnen nicht in der Lage sind, FLT1 nach VEGF-Stimulation vermehrt zu exprimieren. Wir konnten zeigen, dass sFLT1 eine Heraufregulierung der FLT1-Expression verhindert und die FLT1-Promotoraktivität hemmt.

Es ist bekannt, dass VEGF die Chemotaxis von Monozyten nach Bindung an den FLT1-Rezeptor steigert [3,4]. Auch wir beobachten in den PMNs eine Steigerung der Chemotaxis nach VEGF-Stimulation. Da die Zellen nur FLT1 exprimieren, nicht aber KDR kann das VEGF-Signal nur durch FLT1 vermittelt zu den beobachteten Effekten führen. So erklärt sich auch, dass bei Zellen präeklampsischer Patientinnen mit herunterregulierter FLT1-Expression keine VEGF-abhängige Chemotaxis beobachtet wird, obwohl die Zellen der Patientinnen hoch aktiv sind. Vermindert man die freie VEGF-Konzentration im Versuchsansatz durch Zugabe von sFLT1 oder Serum von präeklampsischen Frauen mit hohen sFLT1-Serumspiegeln, so nimmt die Chemotaxis der PMNs verglichen mit Zellen normotensiver Patientinnen ab, da nur freies, ungebundenes VEGF eine Steigerung der Migration bewirken kann.

Unsere Ergebnisse weisen also darauf hin, dass die Regulation der Migration durch VEGF bei PMNs von präeklampsischen Patientinnen gestört ist: Die Zellen migrieren vermehrt, reagieren jedoch nicht mehr auf VEGF. Um den Einfluss dieser Effekte auf die Entstehung einer Präeklampsie zu verstehen, muss man sich klar machen, dass eine Schwangerschaft mit Veränderungen des Immunsystems einhergeht. Ein Grund ist die Unterdrückung einer Abstoßung des Feten [21]. Bei präeklampsischen Patientinnen ist die Entzündungsreaktion, die mit der Schwangerschaft einhergeht, ausgeprägter als bei gesunden Frauen [22]. Der Grund hierfür ist unbekannt. Vermutlich kommt es durch Hypoxie in der Plazenta zu einer vermehrten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie IL-6, TNF- α und eben sFLT1 [16]. Neben den anderen Faktoren beeinflussen die erhöhten sFLT1-Serumspiegel die Funktion der PMNs. Die allgemein gesteigerte Aktivität der zellulären Abwehr und der fehlende VEGF-Einfluss auf die Neutrophilen Granulozyten verstärken die Entzündungsreaktion des mütterlichen Immunsystems [22]. Erhöhte PMN-Aktivität und -Interaktion mit dem Endothel führen zu vermehrter Infiltration mütterlicher Gefäße und zu der beobachteten Endotheldysfunktion [23].

Da die fehlende VEGF-Regulation der Migration und die beobachteten Unterschiede in der Expression von FLT1 auf PMNs auch genetische Ursachen haben könnten, untersuchten wir die Promotorregion von FLT1. Wir fanden einen SNP in Position 519 der veröffentlichten Promotorsequenz in ca. 6% der untersuchten Individuen, eine Korrelation mit dem Krankheitsbild der Präeklampsie besteht dabei

jedoch nicht. Aus dem Vorliegen des SNP resultiert eine neue Bindungsstelle für den Tumorsuppressor p53. Untersuchungen der Promotoraktivität zeigen, dass der Promotor mit dem T-Allel eine deutlich erhöhte Aktivität aufweist. Überexprimiert man in mit dem T-Allel transfizierten Zellen p53, so erhöht sich die Promotoraktivität nochmals. Die Aktivität des WildtypPromotors bleibt unverändert. Auch die endogene Expression von FLT1 in heterozygoten Zelllinien war durch p53 aktivierbar. Untersuchungen von Zellen mit unterschiedlichem p53-Status zeigten nach Transfektion eines Promotorkonstrukts mit C- bzw. T-Allel entsprechend unterschiedliche Promotoraktivität. Auch hier war der Promotor mit dem T-Allel deutlich aktiver.

Die von uns gefundene p53-Bindungsstelle enthält viele Veränderungen verglichen mit der bekannten Bindungssequenz, so dass eine so deutliche Wirkung eher überraschend war. Die Lösung für die deutliche Aktivitätssteigerung des T-Allels war eine synergistische Wirkung zwischen der p53-Bindungsstelle und einem Östrogen-responsive Element (ERE).

Der von uns gefundene Polymorphismus verbindet somit drei verschiedene Systeme, das Östrogen-, das p53- sowie das VEGF-System. Alle drei Systeme sind mit ihren Wirkungen an der Pathogenese maligner Erkrankungen beteiligt [24-30]. Interindividuelle Unterschiede können somit gleichzeitig auf verschiedene Systeme Einfluss nehmen und z.B. die Entstehung maligner Tumore bewirken.

Für viele Tumoren wurde eine vermehrte Expression von FLT1 nachgewiesen, und dieser Rezeptorstatus scheint mit pathologischer Angiogenese, Tumorprogress und –metastasierung einherzugehen [31,32]. Dass p53 und Östrogen bei einem bestimmten Anteil der Patienten eine veränderte Wirkung auf FLT1 haben und damit die Angiogenese verändert ist, kann für eine Therapie maligner Erkrankungen bei dieser Patientengruppe von entscheidender Bedeutung sein.

Diese Publikationspromotion zeigt die Rolle des VEGF-Systems im Allgemeinen und die des FLT1-Rezeptors im Speziellen bei der Entstehung von malignen und nicht malignen Erkrankungen auf: Wir konnten den Einfluss von sFLT1 auf die VEGF-abhängige Migration, auf die FLT1-Promotoraktivität sowie auf die FLT1-Rezeptorexpression auf PMNs zeigen. Diese Veränderungen in der Funktion des VEGF-Systems sind mit dem klinischen Bild der Präeklampsie verknüpft. Bei der Untersuchung der Promotorregion des FLT1-Rezeptors fanden wir einen Polymorphismus, der die Funktion des Promotors stark veränderte. Die Aktivierbarkeit des FLT1-Promotors durch p53 verbindet zwei für die Tumorentstehung entscheidende Systeme: Den Tumorsuppressor p53 mit dem für die Angiogenese entscheidenden VEGF-System. Des Weiteren konnte eine synergistische Wirkung von p53 und einem im Promotor lokalisierten Östrogen-responsive Element nachgewiesen werden. Diese Wirkung war jedoch nur zu beobachten, wenn der Polymorphismus vorlag, durch den eine zusätzliche P53-Bindungssequenz eingefügt wird. Die entstehende Verknüpfung des VEGF-Systems, des Östrogensystems und des P53-Systems kann bei der Entstehung und dem Progress von malignen Tumoren eine Rolle spielen.

7. Literaturverzeichnis

1. Luttun, A ; Autiero, M ; Tjwa, M ; Carmeliet, P. Genetic dissection of tumor angiogenesis: are PlGF and VEGFR-1 novel anti-cancer targets? *Biochim Biophys Acta.* 1654, 79-94 (2004).
2. Brenchley, PE ; Ralph, SA ; Summers, A. VEGF polymorphisms and renal pathologies. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 32,17-23(2002)
3. Barleon, B ; Sozzani, S ; Zhou, D ; Weich, HA ; Mantovani, A ; Marme, D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor FLT1. *Blood.* 87, 3336-43 (1996).
4. Clauss, M ; Weich, H ; Breier, G ; Knies, U ; Rockl, W ; Waltenberger, J ; Risau, W. The vascular endothelial growth factor receptor FLT1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem.* , (1996).
5. Hudson, TJ. Wanted: regulatory SNPs. *Nat Genet.* 33, 439-40 (2003).
6. Krysiak, O ; Bretschneider, A ; Zhong, E ; Webb, J ; Hopp, H ; Verlohren, S ; Fuhr, N ; Lanowska, M ; Nonnenmacher, A ; Vetter, R ; Jankowski, J ; Paul, M ; Schonfelder, G. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFLT-1) mediates downregulation of FLT-1 and prevents activated neutrophils from women with preeclampsia from additional migration by VEGF. *Circ Res.* 97, 1253-61 (2005).
7. Menendez, D ; Krysiak, O ; Inga, A ; Krysiak, B ; Resnick, MA ; Schonfelder, G. A SNP in the flt-1 Promotor integrates the VEGF system into the p53 transcriptional network. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 1406-11 (2006).
8. Menendez, D ; Inga, A ; Snipe, J ; Krysiak, O ; Schonfelder, G ; Resnick, MA. A single-nucleotide polymorphism in a half-binding site creates p53 and estrogen receptor control of vascular endothelial growth factor receptor 1. *Mol Cell Biol.* , (2007).
9. Maynard, SE ; Min, JY ; Merchan, J ; Lim, KH ; Li, J ; Mondal, S ; Libermann, TA ; Morgan, JP ; Sellke, FW ; Stillman, IE ; Epstein, FH ; Sukhatme, VP ; Karumanchi, SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFLT1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 111, 649-58 (2003).
10. Dekker, GA ; Sibai, BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol.* 179, 1359-75 (1998).
11. Conrad, KP ; Miles, TM ; Benyo, DF. Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 40, 102-11 (1998).
12. Greer, IA ; Haddad, NG ; Dawes, J ; Johnstone, FD ; Calder, AA. Neutrophil activation in pregnancy-induced hypertension. *Br J Obstet Gynaecol.* 96, 978-82 (1989).
13. Clark, P ; Boswell, F ; Greer, IA. The neutrophil and preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol.* 16, 57-64 (1998).

14. Greer, IA ; Dawes, J ; Johnston, TA ; Calder, AA. Neutrophil activation is confined to the maternal circulation in pregnancy-induced hypertension. *Obstet Gynecol.* 78, 28-32 (1991).
15. Mellembakken, JR ; Hogasen, K ; Mollnes, TE ; Hack, CE ; Abyholm, T ; Videm, V. Increased systemic activation of neutrophils but not complement in preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 97, 371-4 (2001).
16. Lee, VM ; Quinn, PA ; Jennings, SC ; Ng, LL. Neutrophil activation and production of reactive oxygen species in pre-eclampsia. *J Hypertens.* 21, 395-402 (2003).
17. Banks, RE; Forbes, MA; Searles, J; Pappin, D; Canas, B; Rahman, D; Kaufmann, S; Walters, CE; Jackson, A; Eves, P; Linton, G; Keen, J; Walker, JJ; Selby, PJ. Evidence for the existence of a novel pregnancy-associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1. *Mol Hum Reprod.* 4,377–386 (1998).
18. Levine, RJ ; Karumanchi, SA. Circulating angiogenic factors in preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol.* 48, 372-86 (2005).
19. Lutun, A ; Carmeliet, P. Soluble VEGF receptor Flt1: the elusive preeclampsia factor discovered?. *J Clin Invest.* 111, 600-2 (2003).
20. Barleon, B ; Siemeister, G ; Martiny-Baron, G ; Weindel, K ; Herzog, C ; Marme, D. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT1) and a soluble variant of FLT1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Res.* 57, 5421-5 (1997).
21. Luppi, P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. *Vaccine.* 21, 3352-7 (2003).
22. Redman, CW ; Sargent, IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 308, 1592-4 (2005).
23. Leik, CE ; Walsh, SW. Neutrophils infiltrate resistance-sized vessels of subcutaneous fat in women with preeclampsia. *Hypertension.* 44, 72-7 (2004).
24. Bond, GL ; Hu, W ; Bond, EE ; Robins, H ; Lutzker, SG ; Arva, NC ; Bargonetti, J ; Bartel, F ; Taubert, H ; Wuerl, P ; Onel, K ; Yip, L ; Hwang, SJ ; Strong, LC ; Lozano, G ; Levine, AJ. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 Promotor attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell.* 119, 591-602 (2004).
25. Carmeliet, P. 2005. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69(Suppl. 3):4–10.
26. Benevolo, M ; Vocaturo, A ; Novelli, F ; Mariani, L ; Vocaturo, G ; Cianciulli, AM ; Marandino, F ; Perrone-Donnorso, R ; Giannarelli, D ; Natali, PG ; Mottolese, M. Prognostic value of HER2 and progesterone receptor expression in endometrial carcinoma with positive peritoneal washing. *Anticancer Res.* 27, 2839-44 (2007).
27. Masood, R ; Cai, J ; Zheng, T ; Smith, DL ; Hinton, DR ; Gill, PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood.* 98, 1904-13 (2001).

28. La Rosa, S ; Uccella, S ; Finzi, G ; Albarello, L ; Sessa, F ; Capella, C. Localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in digestive endocrine tumors: correlation with microvessel density and clinicopathologic features. *Hum Pathol.* 34, (2003).
29. Bates, RC ; Goldsmith, JD ; Bachelder, RE ; Brown, C ; Shibuya, M ; Oettgen, P ; Mercurio, AM. FLT1-dependent survival characterizes the epithelial-mesenchymal transition of colonic organoids. *Curr Biol.* 13, 1721-7 (2003).
30. Fan, F ; Wey, JS ; McCarty, MF ; Belcheva, A ; Liu, W ; Bauer, TW ; Somcio, RJ ; Wu, Y ; Hooper, A ; Hicklin, DJ ; Ellis, LM. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene.* 24, 2647-53 (2005).
31. Hiratsuka, S ; Nakamura, K ; Iwai, S ; Murakami, M ; Itoh, T ; Kijima, H ; Shipley, JM ; Senior, RM ; Shibuya, M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell.* 2, 289-300 (2002).
32. Hiratsuka, S ; Maru, Y ; Okada, A ; Seiki, M ; Noda, T ; Shibuya, M. Involvement of FLT1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res.* 61, 1207-13 (2001)

8. Danksagung

Meiner Frau und meiner Familie möchte ich für die Unterstützung und die Motivation danken, die mich während meiner Ausbildung immer wieder aufgebaut und vorwärts getrieben hat.

Herrn Professor Dr. Schönfelder danke ich für die Möglichkeit, diese Promotion unter seiner Betreuung anfertigen zu können und für das hervorragende, freundschaftliche Verhältnis, dass sich aus unserer Zusammenarbeit ergeben hat.

Frau Barbara Mitko danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor und die anregenden fachlichen, politischen und privaten Diskussionen.

Frau Doris Webb danke ich für die Unterstützung die ich durch sie immer wieder erfahren durfte. Herrn Jessie Webb danke ich für die Zusammenarbeit bei den Arbeiten am Durchflusszytometer und die netten Hilfestellungen bei Problemen mit der Technik. Herrn Ergün Özmen danke ich für die freundliche Unterstützung und die kompetente Bearbeitung von großen und kleinen Verwaltungsangelegenheiten.

Herrn Professor Dr. Hopp und Herrn Dr. Fuhr danke ich für den schier unendlichen Zustrom an Blutproben aus dem Kreißaal ohne die meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau Dr. Jacqueline Schönfelder sei für die Einarbeitung in die SSCP-Technik sowie für die Sequenzanalysen gedankt. Ihr positiver Einfluss auf unsere Arbeitsgruppe war eine große Hilfe.

Frau Antje Vieweger danke ich für die zuverlässige, schnelle und hilfreiche Durchsicht dieser Arbeit.

Krysiak, O; Bretschneider, A; Zhong, E; Webb, J; Hopp, H; Verlohren, S; Fuhr, N; Lanowska, M; Nonnenmacher, A; Vetter, R; Jankowski, J; Paul, M; Schonfelder, G. SOLUBLE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-1 (sFLT-1) MEDIATES DOWNREGULATION OF FLT-1 AND PREVENTS ACTIVATED NEUTROPHILS FROM WOMEN WITH PREECLAMPSIA FROM ADDITIONAL MIGRATION BY VEGF. **Circulation Research.** **97**, **1253-61 (2005).**

Menendez, D; Krysiak, O; Inga, A; Krysiak, B; Resnick, MA; Schonfelder, G.

A SNP IN THE FLT-1 PROMOTER INTEGRATES THE VEGF SYSTEM INTO THE P53 TRANSCRIPTIONAL NETWORK. **Proc Natl Acad Sci U S A. 103, 1406-11 (2006).**

Menendez, D; Inga, A; Snipe, J; Krysiak, O; Schonfelder, G; Resnick, MA.

A SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN A HALF-BINDING SITE CREATES P53 AND ESTROGEN RECEPTOR CONTROL OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 1. **Molecular Cell Biology. (2007).**

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

Oliver Krysiak

Erklärung

„Ich, Oliver Krysiak, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: , Regulation der Aktivität des fms-like-Thyrosinkinase-Rezeptor-1-Promotors' selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

5. Januar 2009
Datum

Unterschrift