

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

DISSERTATION

Transkriptionelle Regulation des lymphogenen
VEGF - Rezeptor 3 - Gens in Endothelzellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Hirche
aus Kiel

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Höcker
2. Prof. Dr. med. Chr. Röcken
3. Prof. Dr. med. M. Ebert

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Historische Entdeckung der Angiogenese.....	6
1.2	Die VEGF- und VEGF-Rezeptor Familien und ihre biologische Bedeutung	6
1.3	VEGF-Rezeptor 3.....	9
1.3.1	VEGFR-3 in der Embryogenese und Beschränkung auf Lymphendothelien..	9
1.3.2	Biologische und pathogenetische Assoziation mit VEGFR-3	10
1.3.3	Die Rolle von VEGFR-3 für Tumorgenese, Tumorprogression, lymphatische Metastasierung und Prognose solider Tumoren.....	12
1.3.4	Expression von VEGFR-3 während der Hämangiogenese und auf Hämangioendothelien unter pathophysiologischen Bedingungen.....	15
1.4	VEGFR-3 - Transmembranöse Struktur, Aktivierungskaskade und molekulare Charakteristika.....	17
1.5	Fragestellung.....	20
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Zellkultur	21
2.2	Transiente Transfektionen und Stimulation von Reporter-gen-Konstrukten	22
2.2.1	Transfektion mit Effektene®	23
2.3	Gentechnische und molekularbiologische Methoden	23
2.3.1	Elektrophoretische Auftrennung von RNA und DNA	23
2.3.2	Semiquantitative Duplex-RT-PCT (Taqman®)	24
2.3.3	Plasmidpräparation, Ligation und Transformation von <i>E.coli</i> mit Plasmiden	26
2.4	Klonierung von Promotorkonstrukten in Reporter-genvektoren	26
2.4.1	Klonierung des humanen <i>vegfr-3</i> Promotors.....	26
2.4.2	Herstellung von 5'-Deletionskonstrukten	29
2.4.3	Herstellung von Oligonukleotiden und deren Mutanten.....	31

2.4.4	Hybridisierung der Oligonukleotide	31
2.4.5	Subklonierung in heterologes Promotorsystem.....	32
2.5	Electronic Mobility Shift Assay (EMSA)	32
2.5.1	Radioaktive Markierung von hybridisierten Oligonuklotiden	32
2.5.2	Präparation von nukleären Proteinextrakten	33
2.5.3	Identifizierung nukleärer Proteine unter Verwendung radioaktiv markierter DNA-Sonden	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	Expression von <i>vegfr-3</i> in endothelialen und epithelialen Zelllinien.....	35
3.2	Identifizierung der Promotoraktivität und regulatorischer Bereiche.....	37
3.3	Feinanalyse der <i>vegfr-3</i> Promotorsequenz.....	40
3.4	Regulation des <i>vegfr-3</i> Promotors durch Sp1/Sp3	45
3.5	Funktionelle Untersuchungen zur Regulation des <i>vegfr-3</i> Promotors durch Faktoren des Sp-Familie	48
3.6	Untersuchungen zur Proteinbindung mutierter Oligonukleotide im EMSA.....	51
3.7	Supershift-Assays in <i>vegfr-3</i> RNA exprimierenden Zelllinien	52
4	DISKUSSION	53
4.1	Identifikation der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3	53
4.2	Sp-Faktoren in der Tumorgenese.....	55
4.3	Struktur und Bindungsverhalten der Sp-Faktoren	57
4.4	Molekulare Mechanismen der Regulation durch Sp-Faktoren.....	60
4.5	Vergleich der Regulation von VEGFR-3 mit der VEGF/VEGFR-Familie	63
4.5.1	Essentielle regulative Promotorelemente	63
4.5.2	Vergleich der regulierenden Transkriptionsfaktoren.....	67

4.6	Therapeutische Interaktionsmöglichkeiten mit Sp-Faktoren	69
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
6	LITERATURVERZEICHNIS	73
7	ANHANG.....	90
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	90
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	92
7.2	Tabellenverzeichnis.....	92
7.3	Wissenschaftliche Tätigkeit	93
7.3.1	Publikationen.....	93
7.3.2	Vorträge	93
7.3.3	Posterpräsentationen	93
7.4	Selbstständigkeitserklärung.....	94
7.5	Danksagung	95

1 Einleitung

1.1 Historische Entdeckung der Angiogenese

Bevor die Unterschiede zwischen Hämangiogenese und Lymphangiogenese beschrieben wurden, machte Goldmann bereits im Jahr 1907 die Entdeckung, dass Angiogenese im Rahmen von Tumorwachstum eine wichtige Rolle spielt (1). Im Jahre 1968 wurde von Greenblatt *et al.* die Hypothese veröffentlicht, dass Tumore eine zu diesem Zeitpunkt unbestimmte angiogenetische Substanz sezernieren (2). Kurze Zeit später stellten Folkman *et al.* die Theorie auf, dass Tumorwachstum und Metastasierung abhängig von Angiogenese sind und eine Inhibition somit das proliferative Tumorwachstum eingrenzen könnte (3;4). Des Weiteren zeigte im Jahre 1978 Gullino, dass Zellen in präkanzerösem Gewebe angiogene Eigenschaften durch Transformation zu kanzerösen Zellen entwickeln (5).

1.2 Die VEGF- und VEGF-Rezeptor Familien und ihre biologische Bedeutung

Angiogenese als Mechanismus der Bildung neuer Blutgefäße aus endothelialen Vorläuferzellen ist ein wesentlicher Schritt für das Wachstum und die Metastasierung solider Tumoren (6). Als Vertreter der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-Familie wurde VEGF-A als wichtigster stimulierender Faktor für Angiogenese beschrieben, der seine Wirkung durch die Aktivierung des Tyrosinkinase-Rezeptors *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (VEGFR) -2 vermittelt (7). Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass Mechanismen ähnlich denen der Hämangiogenese ebenfalls im Rahmen der Lymphangiogenese nachweisbar sind und zwei weitere Vertreter aus der VEGF-Familie, VEGF-C und VEGF-D, über VEGFR-3 ihren biologische Wirkung im Rahmen von Lymphangiogenese und lymphatischer Metastasierung vermitteln (8-11). Damit wurde VEGFR-3 (Flt4) mit Lokalisation auf dem Gen *5q33-q35* als letzter Vertreter der VEGF-Rezeptor-Familie aus der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren identifiziert und zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu seinen Homologen VEGFR-1 (Flt1) und VEGFR-2 (Flk1/KDR) (12;13). Die Vertreter der VEGFR-Familie sind charakterisiert durch sieben homologe Immunglobulin-artige Domänen und eine gespaltene intrazelluläre Domäne. Während VEGF-A sowohl mit VEGFR-1 und VEGFR-2 interagiert, bindet VEGF-B ausschließlich an VEGFR-1.

VEGF-C und VEGF-D binden VEGFR-2 und VEGFR-3, das virale Homolog VEGF-E bindet und aktiviert nur VEGFR-2 (14-17) (Abb. 1).

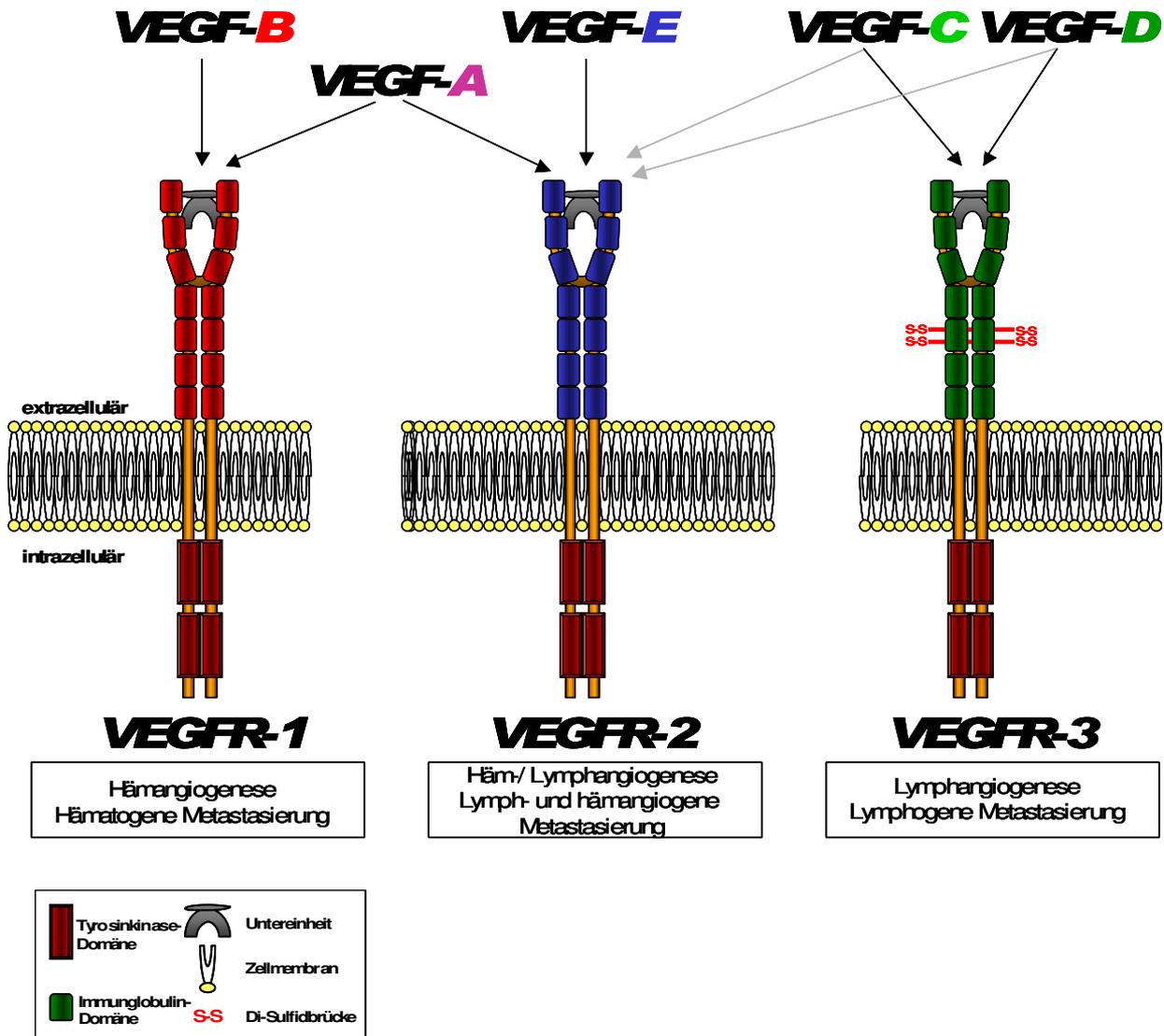


Abb. 1: Die Familie der VEGF-Rezeptoren

Schematische Darstellung des spezifischen Liganden-Bindungsverhaltens und der VEGF-Rezeptoren mit sieben Immunglobulin-artigen Domänen (rot, blau grün), einer Transmembran-Domäne (orange), einer intrazellulären, durch eine Kinase-Insert-Sequenz geteilten Tyrosinkinase-Domäne (braun) und einem zytoplasmatischen Schwanz (orange) am Carboxyterminus. Die fünfte Immunglobulin-artige Domäne von VEGFR-3 wird nach proteolytischer Spaltung durch eine Disulfidbrücke verbunden (95).

Die Mitglieder der VEGF- und der VEGFR- Familie sind an der Aufrechterhaltung wichtiger biologischer Funktionen für Hämangiogenese und Lymphangiogenese beteiligt und besitzen wesentliche Effekte, die mit pathogenetischen Veränderungen assoziiert sind. Jedoch ist die Komplexität der Wechselwirkungen der Mitglieder der VEGF-Rezeptor-Familie mit den Liganden der VEGF-Familie noch nicht definitiv geklärt. Es wurde gezeigt, dass VEGF-A die normale Entwicklung der embryonalen Vaskulogenese und die frühe Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Hämangioblasten reguliert (18;19). Sie sind Voraussetzung für die Entstehung großer arterieller Gefäße und stehen damit im Vordergrund der Hämangiogenese (20). Im Rahmen der Tumorgenese erfolgt die Sekretion erhöhter VEGF-A -Mengen autokrin zum Wachstum des kapillären Blutgefäßnetzwerks. Hypoxische Areale eines Tumors waren in diesem Zusammenhang eine Grundlage für die tumorassoziierte erhöhte VEGF-A Expression (21). In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass im Mittelpunkt der proangiogenen Wirkung von VEGF-A die Stimulation der Endothelzellproliferation und -migration von Blutgefäßendothelien sowie eine Erhöhung der Blutgefäßpermeabilität steht (22-24). Diese Funktion wird hauptsächlich durch Bindung und Aktivierung von VEGFR-2 vermittelt, der überwiegend auf Blutgefäßendothelien exprimiert ist. VEGF-B, das in zwei Isoformen vorliegt, vermittelt das Wachstum von Hämangioendothelien und Vaskulogenese über die Bindung an VEGFR-1 (25). Dieser Effekt wurde vorzugsweise durch eine Potenzierung der Wirkung von VEGF-A gezeigt (26). VEGF-B übte seine Wirkung im Rahmen der Vaskulogenese jedoch im Gegensatz zu VEGF-A ohne eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität aus (26). Die Bindung von VEGF-B mit VEGF-A führte zur Bildung eines Heterodimers mit Veränderung von Rezeptorspezifität und biologischer Funktion (27). Die Expression war beschränkt auf Herzgewebe, Skelettmuskelgewebe und Hämangioendothelzellen (28). Es wurde demonstriert, dass VEGF-C konstitutionell in Geweben des Herzens, der Plazenta, der Skelettmuskulatur, dem Ovar und dem Dünndarm exprimiert wird (17;29;30). Bei pathogenetischen Veränderungen war eine erhöhte Expression in verschiedenen Tumoren nachzuweisen (31). VEGF-D wurde als wachstumsterminierendes Gen vor allem an der Beteiligung von Lymphangiogenese und damit assoziierten pathogenetischen Mechanismen nachgewiesen. Inkomplett prozessierte VEGF-C- und VEGF-D- Moleküle gingen überwiegend eine Bindung ein mit VEGFR-3, während eine komplette Prozessierung beider Liganden zusätzlich auch eine Interaktion mit dem

bevorzugt von Blutgefäßendothelien exprimierten VEGFR-2 ermöglichte und hierdurch zur Auslösung VEGF-A- ähnlicher Effekte durch Initiierung der Hämangiogenese führte (10;32). Die Expression von VEGF-D war involviert in das Wachstum und die lymphatische Metastasierung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) (33) und des duktales Pankreaskarzinoms (34). Ähnlich wie VEGF wurden VEGF-C und -D auf endothelialen Tumorzellen, aber auch von nicht endothelialen Zellen wie Makrophagen und Stromazellen im Rahmen der Tumorgenese exprimiert. VEGF-E wurde als ein VEGFR-2 spezifischer Ligand identifiziert, der in endothelialen Zellen Mitogenese, Chemotaxis und Permeabilität mit ähnlichem Potential wie VEGF-A regulierte (35-37). Im Vergleich zu VEGF-A konnte im Mausmodell unter Stimulation mit VEGF-E das Ausbleiben der Ödembildung und Hämorrhagie und einer inflammatorischen Reaktion gezeigt werden (38-40). Von den Rezeptoren der VEGFR- Familie ist VEGFR-1 in einer Vielzahl von Tumoren exprimiert (41-43) und übt seine biologische Funktion nach Bindung von VEGF-A aus. VEGFR-2 wurde als ein wichtiger Mediator der Angiogenese beschrieben. Seine Expression war während der embryonalen Vaskulogenese bereits am 7. Tag nach Konzeption nachzuweisen (44). Als letzter Vertreter der VEGF-Rezeptor-Familie wurde VEGFR-3 beschrieben und als Schlüsselgen der Lymphangiogenese identifiziert (8-11). Im Zuge weiterführender Untersuchungen zur biologischen Einordnung und Funktion von VEGFR-3 wurde zunehmend seine Bedeutung für die Aufrechterhaltung physiologischer lymphatischer Prozesse während der Embryogenese und Homöostase beschrieben.

1.3 VEGF-Rezeptor 3

1.3.1 VEGFR-3 in der Embryogenese und Beschränkung auf Lymphendothelien

Die Bedeutung von VEGFR-3 für die Aufrechterhaltung der Organfunktionen ist bereits während der frühen Embryogenese nachzuweisen, in der die Expression von VEGFR-3 auf endothelialen Zellen der embryonalen Kardinalvene und Angioblasten von mesenchymalem Gewebe in der Maus vom Tag 8½ postkoital nachzuweisen ist (45). Im weiteren Verlauf der Embryogenese wird die Expression jedoch auf venöse Endothelzellen und lymphatische Vorläufer-Endothelien beschränkt und war während der Embryogenese nicht auf arteriellen Endothelzellen aufzuzeigen (45). Am Ende der

Entwicklung ist die Expression begrenzt auf endotheliale Gefäßnetze frei von Erythrozyten, die die Grundlage für die lymphspezifische Expression von VEGFR-3 bilden. Damit ist die Expression auf venösen Endothelien mit Ausnahme von speziellen hochdifferenzierten Venolen der Leber nicht mehr nachweisbar (45). Die evolutionsbiologische Nähe beider Gefäßsysteme spiegelt sich in dem typischen Expressionsmuster von VEGFR-3 im Verlauf der Embryogenese wieder. Während Ihrer Entstehung aus vaskulären venösen Endothelzellen werden lymphatische Zellen zusätzlich über das Gen *Prox-1* programmiert (46). Eine Studie im Mausmodell zeigte, dass die Aktivierung von VEGFR-3 zur Expression von LYVE-1 in Endothelzellen führt und den Endothelzellen damit den lymphatischen Phänotyp überträgt (47). Der Einfluss der VEGFR-3 Expression während der Embryogenese wurde deutlich in Untersuchungen, in denen transgene Mäuse mit einer homozygoten Mutation für VEGFR-3 noch vor der Geburt aufgrund schwerer kardiovaskulärer Missbildungen sterben (48). Auf Grundlage der Erkenntnisse aus der Embryogenese der Maus wurde zunächst davon ausgegangen, dass die VEGFR-3 Expression in humanem adulten Gewebe spezifisch für lymphatische Gefäße ist (45). Mit Ausnahme von hochdifferenzierten endothelialen Venolen mit hohem Anteil zirkulierender Lymphozyten war eine Expression auf Hämangioendothelien nicht nachzuweisen (45). Hier war VEGFR-3 in der Lage, unabhängig von anderen Wachstumsfaktoren lymphangiogene Proliferation herbeizuführen (49). Neben seiner Rolle für die Embryogenese wurden VEGFR-3 und seine Liganden VEGF-C/VEGF-D mit Wachstum und Überleben von lymphatischen Gefäßen in adultem humanen Gewebe assoziiert (8). VEGFR-3 trägt damit entscheidend bei zur Proliferation und Entwicklung von lymphatischen Endothelzellen (8;49;50). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde das VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 System ursächlich mit pathogenetischen Veränderungen in Verbindung gebracht, die das Lymphgefäßsystem und die Lymphangiogenese betreffen. Die anschließenden Untersuchungen haben dadurch eine weitere biologische Einordnung von VEGFR-3 und seiner Bedeutung für das lymphatische System erbracht.

1.3.2 Biologische und pathogenetische Assoziation mit VEGFR-3

Die Erkenntnisse über VEGFR-3 als lymphoproliferativer Wachstumsfaktor und seine pathogenetischen Rolle basieren auf einer Anzahl verschiedener Mausmodelle, die

indirekt die Bedeutung von VEGFR-3 für die physiologische Funktion des Lymphgefäßsystems hervorheben. Dies zeigt sich am Beispiel der *Chy* Maus, bei der es durch heterozygot inaktivierende Mutation innerhalb der Kinase-Domäne von VEGFR-3 zum phänotypischem Charakter mit chronischer Ansammlung von chylösem Aszites und Lymphödemen der unteren Extremität kam (51). Dieser Mechanismus zeigte sich beim Menschen klinisch im Phänotyp des primären kongenitalen Lymphödems (*Milroy's disease*) mit Beteiligung des *vegfr-3* Gens an der Ausbildung der Krankheit (52;53). Transgene Mäuse mit Expression eines löslichen VEGFR-3 Antikörpers mit Kopplung an die IgG-Fc Domäne des Rezeptors bildeten durch Inhibition der Funktion der VEGFR-3 Liganden ein Lymphödem aus (49). Mäuse mit einer Mutation für VEGFR-3 zeigten phänotypisch eine verdickte Dermis mit verbreitertem subkutanen Fettgewebe und entwickeln Lymphödem im Vergleich zum Wildtyp (54). Die Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen in Nagern ließen sich auch auf Ergebnisse weiterer Studien übertragen, die VEGFR-3 und seine pathophysiologische Bedeutung für die Wundheilung untersuchten. Vor diesem Hintergrund zeigten Ji *et al.* VEGFR-3 im Mausmodell als Marker der Lymphangiogenese auf endothelialen Zellen drei Tage nach Trauma in der Subkutis und damit früher in der zeitlichen Abfolge als in der Dermis (55). Es wurde nachgewiesen, dass die Lymphangiogenese im zeitlichen Fenster der Wundheilung der Hämangiogenese im Granulationsgewebe folgt (56). Im Schweinehaut-Modell wurde demonstriert, dass VEGFR-3-positive Lymphgefäße zeitlich parallel mit Hämangioendothelien nachweisbar sind, jedoch im weiteren Verlauf eine frühere Regression zeigen. Die Expression von VEGFR-3 war als integraler Bestandteil der Lymphangiogenese einer regulären Wundheilung unabdingbar, während sich Veränderungen in dieser zeitlichen Folge und im Expressionsmuster in chronischen Wunden nachweisen ließen und damit pathogenetisch mit der Entstehung assoziiert wurden (57). Neben der Rolle von VEGFR-3 für die Wundheilung wurde durch einzelne Studien eine vermehrte Expression des Rezeptors in Geweben verschiedener Erkrankungen beschrieben, deren biologische Bedeutung jedoch zum Teil noch ungeklärt ist. So ließ sich bei der Lymphangiomatose des Kindes- und Jugendalters immunhistochemisch eine stark erhöhte Expression von VEGFR-3 in gutartig proliferiertem lymphatischen Gewebe nachweisen, die klinisch wie auch histologisch unter Interferon- α 2b Therapie regredient war (58). Außerdem zeigten die Submukosa

und Lamina propria von Darmgewebe bei Kolitis ulzerosa und Morbus Crohn eine deutliche Vermehrung von Lymphkapillaren im Dünndarm und Dickdarm mit VEGFR-3 Expression, die an der Pathogenese beteiligt sind (59). Des Weiteren wurde im Mausmodell demonstriert, dass die Signalkaskade von VEGFR-3 an der Transplantatabstoßung durch dendritische Zellen der Kornea beteiligt war. Während aktivierte Makrophagen und dendritische Zellen VEGFR-3 exprimierten, verhinderte eine Blockade von VEGFR-3 die Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV nach Coombs and Gell) mit einer signifikant verlängerten Überlebenszeit des Transplantats (60).

1.3.3 Die Rolle von VEGFR-3 für Tumorgenese, Tumorprogression, lymphatische Metastasierung und Prognose solider Tumoren

In Folge initialer Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung von VEGFR-3 und seiner pathogenetischen Rolle bei gutartigen Erkrankungen des Lymphgefäßsystems und der Wundheilung wurde zunehmend klar, dass VEGFR-3 auch wesentliche Effekte für die Pathogenese und Progression von bösartigen Entartungen des lymphatischen Systems besitzt. Diese ersten Ergebnisse haben VEGFR-3 in den Mittelpunkt von Studien für das bessere Verständnis der Tumorbilogie und Tumorgenese gerückt. Die Beteiligung von VEGFR-3 an tumorassoziierter Lymphangiogenese und lymphatischer Metastasierung unterstreicht die klinische Bedeutung von VEGFR-3. In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte diese Assoziation bestätigt werden und eine Korrelation mit der Prognose und Progression solider Tumoren herausgearbeitet werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Grad der Expression von VEGFR-3 mit der Progression der Tumorerkrankung und dem Fortschreiten lymphonodaler Metastasierung korreliert ist (61). Die bis heute verfügbaren Ergebnisse basieren auf funktionellen tierexperimentellen Studien, in denen unter Verwendung von VEGFR-3 Antikörpern das lymphendotheliale Wachstum in Tumormodellen der Maus beeinflusst werden konnte und so Rückschlüsse auf seine biologische Funktion gezogen wurden. Es wurde demonstriert, dass die Applikation eines löslichen VEGFR-3 Proteins als potenter Inhibitor der Lymphangiogenese fungiert (54). Außerdem zeigte ein spezifischer VEGFR-3 Antikörper die Möglichkeit, *Fibroblast Growth Factor* (FGF)-2 induzierte Lymphangiogenese in einem orthotopischen Magenkarzinom-Modell in

Mäusen zu inhibieren (62) und dadurch die Tumorgroße und das Ausmaß lymphatischer Metastasierung zu reduzieren (63). Der Tyrosinkinase-Inhibitor Cediranib für VEGFR-2/VEGFR-3 zeigte im Mäuseohr-Modell eine Reduktion der Tumorstadiumsgeschwindigkeit. Außerdem wurde durch Anwendung von Cediranib die Neubildung lymphatischer Metastasen durch Tumorzellabsiedlung sowie die Lymphzellhyperplasie im Tumorrand des Primärtumors inhibiert (64). Diese Ergebnisse waren konsistent mit den Untersuchungen unter Verwendung eines monoklonalen VEGFR-3 Antikörpers im Mausmodell (65). Transgene Mäuse mit einer Expression des Kaposi-Sarkom assoziierten *k-cyclin* Gens zeigten unter der Kontrolle des VEGFR-3 Promotors eine Beeinträchtigung der lymphatischen Funktion einschließlich dermalen Lymphödems und chylösen Pleuraerguss als Ursache eines vorzeitigen Tods (66). Durch diese funktionellen Untersuchungen wurde eine biologische Einordnung des Nachweises einer erhöhten Expression von VEGFR-3 in verschiedenen Tumoren ermöglicht.

Eine erhöhte Expression von VEGFR-3 konnte nachgewiesen werden im Magenkarzinom (63), kolorektalen Adenokarzinom (67), Prostata-Karzinom (68;69), kleinzelligen Bronchialkarzinom (70), nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (71) und Karposi-Sarkom (72 66). Für einige der oben beschriebenen soliden Tumoren konnte neben der vermehrten Expression eine Korrelation mit der Progression der Tumorerkrankung und der Prognose demonstriert werden. Im Magenkarzinom wurde VEGFR-3 zusammen mit VEGF-D als unabhängiger prognostischer Marker identifiziert und mit einer schlechten Prognose assoziiert (73). Außerdem zeigte die Untersuchung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms eine Korrelation der VEGFR-3 Expression auf Tumor- und Endothelzellen mit dem Grad der Metastasierung. Der immunhistochemische Nachweis von VEGF-C als auch von VEGFR-3 führte zu einer signifikant niedrigeren Überlebensrate im Patientenkollektiv und zeigte die ungünstigste Überlebensrate für Patienten mit parallelem Nachweis von VEGF-C und VEGFR-3 (71). Die Expression von VEGFR-3 im Prostata-Karzinom korrelierte mit dem *Gleason Score*, dem präoperativen PSA-Level, dem Grad der lymphogenen Metastasierung als auch mit der Progression der Tumorerkrankung und war in normalem Prostatagewebe sowie Gewebe der benignen Prostatahyperplasie kaum nachweisbar (74). Eine Abnahme der Expression konnte dagegen bei Zellen des Mamma-Karzinoms gezeigt werden, ohne dass dieses im Vergleich zu anderen soliden Tumoren unterschiedliche Verhalten

bisher biologisch eingeordnet werden konnte (75). Im Detail zeigte sich hier eine signifikante Abnahme der Expression der langen Isoform (275 Basen) von VEGFR-3 im Vergleich zu Normalgewebe. Lymphknoten-positive Tumoren zeigten keinen Nachweis der langen Isoform. Dagegen war keine Veränderung in der Expression der kurzen Isoform (232 Basen) von VEGFR-3 nachzuweisen (75). Neben der Bedeutung für das Wachstum solider Tumoren wurde die pathogenetische Bedeutung von VEGFR-3 für die Ausbildung und den Progress lymphatischer Metastasierung gezeigt. Auch diese Ergebnisse stützen sich auf funktionelle tierexperimentelle Studien aus Mäusen.

Die Aktivierung von VEGFR-3 in lymphatischen Zellen ist Teil der parakrinen Stimulation lymphatischer Metastasierung (69). In immunkompetenten Ratten war die Expression einer Mutante von VEGF-C für VEGFR-3 ausreichend, um sowohl peritumorale Lymphangiogenese als auch lymphatische Metastasierung zu vermitteln, wohingegen die Neutralisierung der VEGFR-3 Liganden VEGF-C und VEGF-D die Metastasierung und die peritumorale Lymphgefäßneubildung hemmen (76). Für das Magenkarzinom konnte in einem orthotopischen Mausmodell gezeigt werden, dass die systemische Gabe von anti-VEGFR-3 Antikörpern zu einer Hemmung der lymphatischen Metastasierung und Verringerung der Dichte der Lymphgefäße führte (63). Außerdem wurde im Mausmodell gezeigt, dass die Injektion von Adenoviren mit Kodierung für VEGFR-3-Immunglobulin in eine Bronchialkarzinom-Zelllinie und die subkutane Implantation der Tumorzellen die Metastasierung in regionale Lymphknoten hemmen konnten (70). Durch Applikation löslicher VEGFR-3-Immunglobuline konnte im Mausmodell bewiesen werden, dass Lymphangiogenese zeitnah inhibierbar ist, jedoch die Inhibition schrittweise über etwa drei Wochen nach Tumorimplantation an Wirkung verliert und danach wirkungslos ist (77). Diese funktionellen Untersuchungen im Tiermodell haben für nachfolgenden Expressionsanalysen eine nähere biologische Einordnung ermöglicht und den Effekt von VEGFR-3 für tumorassoziierte Lymphangiogenese bestätigt. Im Magenkarzinom wurde demonstriert, dass eine parakrine Schleife durch tumorspezifische VEGF-C Sekretion zur Aktivierung von VEGFR-3 und zur Neolymphangiogenese mit Infiltration der Lymphgefäße durch Tumorzellen führt (78). Der Nachweis von VEGFR-3 positivem, lymphatischem Gewebes korreliert signifikant mit der lymphatischen Metastasierung im Prostatakarzinom (68;69). Auf histopathologischer Ebene führte die Aktivierungsschleife über VEGFR-3 zu morphologisch pathogenetischen Veränderungen. Peritumorale

lymphatische Randgefäße mit einem Abstand $>100\mu\text{m}$ vom Tumorzentrum des Tumors reichten aus, um das Lymphgefäßsystem der Metastasierung des Primärtumors zugänglich zu machen (79). Intratumorale Lymphgefäße führten durch das Fehlen typischer Klappen zur Fehlfunktion und zum Kollaps mit nachfolgender Zerstörung der Gefäße (79). Es wurde gezeigt, dass lymphatische Metastasierung ihren Ursprung in einer im Tumorgewebe veränderten Gefäßpermeabilität zu haben scheint (78;80;81). Darüber hinaus wurden intratumoröse Shunts zwischen Lymph- und Blutgefäßen diskutiert, die ebenfalls die Metastasierung begünstigten (82). Des Weiteren konnte eine Dissemination durch retrograde Ausbreitung der Tumorzellen in bereits verschlossenen Lymphgefäßen gezeigt werden (82).

1.3.4 Expression von VEGFR-3 während der Hämangiogenese und auf Hämangioendothelien unter pathophysiologischen Bedingungen

Zunächst wurde die VEGFR-3 Expression als spezifisch für lymphatische Gefäße beschrieben und VEGFR-3 als lymphatischer Marker identifiziert (45). Im Zuge der Untersuchungen für die biologische Bedeutung von VEGFR-3 für Lymphangiogenese stellte sich heraus, dass die VEGFR-3 Expression auch auf einzelnen Blutgefäßendothelien unter physiologischen Bedingungen nachzuweisen ist und auf Blutkapillaren vom gefensterten Typ im Knochenmark, in der Milz, in den hepatischen Sinusoiden, in den Nierenglomeruli sowie in endokrinen Drüsen darzustellen war (83). Durch die pathogenetische Einordnung von VEGFR-3 für das Tumorwachstum und die Metastasierung (84) wurde zunehmend klar, dass VEGFR-3 entgegen ursprünglichem Konsens auch im Rahmen von Hämangiogenese unter pathophysiologischen Bedingungen nachzuweisen ist (57;85;86). Vor diesem Hintergrund wurde in einer tierexperimentellen Untersuchung gezeigt, dass die Blockade von VEGFR-3 durch Antikörper zu Mikro-Hämorrhagien aufgrund Ruptur des Endothelzellverbands der Venolen und anschließendem Kollaps der proximal gelegenen Gefäße führt (87). Damit wurde erstmals eine wichtige funktionelle Bedeutung von VEGFR-3 für Hämangiogenese demonstriert. Fenestrierte Kapillaren der Pankreasinseln, der Schilddrüse, des adrenergen Kortex, der Hypophyse, der Villi des Dünndarms und des epididymalen Fettgewebes zeigten als VEGF-abhängige Gewebe verhältnismäßig hohe Level an VEGFR-3 und VEGFR-2 in adulten Gewebe. Im Gegenzug zu nicht-

fenestrierten Kapillaren mit geringer VEGFR-3 und VEGFR-2 Expression benötigten diese zum Überleben das ständige Signal eines Liganden aus der VEGF-Familie (86). Im Rahmen pathogenetischer Prozesse zeigten Hämangioendothelien ohne primäre Expression außerdem den Nachweis von VEGFR-3. Es wurde demonstriert, dass die relativ niedrige Expression von VEGFR-3 auf lymphatischen Gefäßen in chronischen Wunden der unteren Extremität einhergeht mit einer Hochregulation der Expression von VEGFR-3 auch in hämatovaskulären Endothelzellen, die bisher unter physiologischen Bedingungen nicht nachweisbar war (57). Diese ersten Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass es unter pathophysiologischen Bedingungen zu einer nachweisbaren Expression von VEGFR-3 auf Hämangioendothelien kommt. Damit scheint eine noch nicht endgültig geklärte Verbindung zwischen Lymphangiogenese und Hämangiogenese sowie den Mitgliedern beider Familien zu existieren. Diese Annahme wird bestätigt durch Studien, die der Signalkaskade von VEGF-A/ VEGFR-2 auch eine grundlegende Bedeutung für Lymphangiogenese zugeschrieben haben (88-90).

Die für lymphatische Gefäße nahezu spezifische Expression von VEGFR-3 weicht auch unter tumorassoziierten Zellbedingungen von der Regel ab. Es wurde gezeigt, dass VEGFR-3 während tumorassoziierter Angiogenese die endotheliale Zellintegrität unterhält (87). Vor diesem Hintergrund konnte eine VEGFR-3 Expression auf hämatoendothelialen Zellen in Tumorgewebe verschiedenen Ursprungs nachgewiesen werden, während sich in den gleichen individuellen Gewebeschnitten VEGFR-3 negative Endothelzellen in größerer Entfernung zu den Tumorzellen darstellen ließen. VEGFR-3 konnte auf hämatovaskulären Endothelzellen des intraduktalen Mamma-Karzinoms identifiziert werden (81), nicht jedoch auf lymphatischen Gefäßen (75). Darüber hinaus wurde die VEGFR-3 Expression auf Endothelzellen von proliferierenden Blutgefäßen im Gliom und in Granulationsgewebe dargestellt (56). Für das maligne Melanom wurde ein charakteristisches Expressionsmuster für VEGFR-3 beschrieben, das auf kausale Zusammenhänge von VEGFR-3 für die Tumorgenese hindeutete. Während die Expression von VEGFR-3 in benignen melanozytären Läsionen spezifisch auf lymphatische Zellen beschränkt ist, konnte der Rezeptor beim malignen Melanom in der überwiegenden Zahl der Fälle sowohl auf lymphatischen als auch auf hämatovaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden. Damit wurde ein Muster in der Expression zwischen benignen und malignen melanozytären Läsionen gefunden (85). Die Expression von VEGFR-3 auf vaskulären Endothelien im malignen Melanom

korrelierte mit der histologischen Tiefe der Invasion nach Clark. Während beim nicht-invasiven Melanom (Clark I) und bei den meisten gering-invasiven Tumoren (Clark II) keine VEGFR-3 Expression nachzuweisen war, ließ sich VEGFR-3 in der Mehrzahl aller Tumoren mit Infiltration des Stratum papillare (Clark III) oder des Stratum reticulare (Clark IV) zeigen (85). Es konnte damit eine signifikante VEGFR-3 Expression auf Hämangioendothelien demonstriert werden, die auf einen kausalen Zusammenhang für die Tumorgenese schließen ließ und die Annahme bestätigte, dass der Rezeptor parakrin durch Sekretion von Botenstoffen stimuliert wird (85). Diese Ergebnisse wurden verdeutlicht durch den Nachweis der Koexpression von VEGFR-3 in Kombination mit seinen Liganden VEGF-C und/oder VEGF-D in tumorassoziierten Hämangioendothelien, die somit auf eine autokrine Schleife der Zellstimulation von Angiogenese hinweisen (91-93)

1.4 VEGFR-3 - Transmembranöse Struktur, Aktivierungskaskade und molekulare Charakteristika

VEGFR-3 steht aufgrund seiner entscheidenden Bedeutung für physiologische Prozesse der Lymphangiogenese und aufgrund seiner Rolle bei der Tumorgenese und lymphonodaler Metastasierung im Mittelpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen. Gerade die fortschreitenden Kenntnisse über VEGFR-3 und seine Bedeutung für Hämangiogenese, Tumorgenese und eine noch nicht endgültig geklärte Verbindung zwischen Lymphangiogenese und Hämangiogenese haben jedoch kontroverse Ergebnisse geliefert. Diese machen ein fundiertes molekulares Verständnis der funktionellen und strukturellen Charakteristika von VEGFR-3 unabdingbar. Ein besseres Verständnis der molekularen Schritte der VEGFR-3 Regulation ist außerdem essentiell für die Entwicklung neuer effektiver Therapiestrategien.

Die spezifische Umsetzung der biologischen Signale durch VEGFR-3 wird beeinflusst durch seine rezeptorspezifische transmembranöse Struktur und folgt dem Schema der Tyrosinkinase-Rezeptoren, zu deren Familie neben VEGFR-3 auch VEGFR-1 und VEGFR-2 gehören. Das humane Genom von VEGFR-3 enthält 31 Exons mit einer Gesamtmenge von 44 Kilobasenpaare (kb), von denen die Exons 30a und 30b alternativem *Splicing* unterliegen (94). Die Exons kodieren für sieben homologe Immunglobulin (Ig)-artige Domänen, eine transmembranöse Region und die

Tyrosinkinase-Domäne (94) (Abb. 1). Charakteristisch für VEGFR-3 im Vergleich zu VEGFR-1 und VEGFR-2 ist die Verbindung der fünften Ig-Domäne durch eine Disulfidbrücke nach proteolytischer Spaltung (95) (Abb. 1). Durch transkriptionelle alternative Prozessierung des VEGFR-3 Transkripts existieren zwei Isoformen, die durch das Fehlen oder Vorhandensein der Phosphotyrosin-Bindungsdomäne (PTB) gekennzeichnet sind und unterschiedliche Zellsignale vermitteln (96). Für die biologische Wirksamkeit von VEGF-C und VEGF-D im Gegensatz zu VEGF ist eine proteolytische Prozessierung von Vorläuferformen beider Peptide von entscheidender Bedeutung. Inkomplett prozessierte VEGF-C/-D-Moleküle binden VEGFR-3, während das komplett prozessierte Molekül zusätzlich mit dem VEGFR-2-Rezeptor interagiert, der bevorzugt auf Blutgefäßendothelien exprimiert wird. Die Bindung eines Liganden nach dem Schema für Tyrosinkinase-Rezeptoren führt zur Heterodimerisation und sequentieller Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase-Aktivität. Die Kinase-Aktivität wird durch Transphosphorylierung der Bestandteile des Dimers reguliert und führt zur Bildung von Bindungsstellen für Liganden mit charakteristischen Bindungsdomänen von zytoplasmatischen Proteinen wie dem SRC Homolog (SH)-2 oder Phosphotyrosin-Bindungsdomänen (PTB). Diese überführen das Signal über ein komplexes Netzwerk von Interaktionen in den Nukleus. Die Spezifität der Bindung ist durch die Sequenz des Phosphotyrosin-Rests bestimmt (96-98). Die Aktivierung von VEGFR-3 führt zur Stimulation der extrazellulären Signal-bezogenen Kinasen (Erk)-1 und -2, die Proteinkinase C (PKC) abhängig sind und Zellproliferation vermitteln. Der Erhalt der Zellintegrität wird dagegen über den Weg der Proteinkinase B/Akt-Phosphorylierung reguliert (8). Die Phosphorylierung von VEGFR-3 durch Stimulation mit H₂O₂ führt zur Aktivierung des Rezeptors über einen alternativen Signalweg (99). Abgesehen von der transmembranösen Struktur und der zellulären Aktivierungskaskade sind jedoch im Vergleich zu dem weitgefasst beschriebenen VEGF-A/VEGFR-2 System nur wenige funktionelle und strukturelle Charakteristika der molekularen Regulation beschrieben worden. Iljin *et al.* konnten nach Klonierung des *vegfr-3* Promotors ein 1,6kb großes Promotorkonstrukt identifizieren, dass mit den beiden konservierten Bereiche *homology region* (HR) 1 und 2 eine identische Gensequenz von bis zu 70% zwischen Maus und Mensch zeigte (94). Während HR 1 potentielle Bindungsstellen für *Myocyte Enhancer Factor 2* (MEF-2) und verschiedene Mitglieder der Ets-Familie besitzt, enthielt HR 2 mögliche Bindungssequenzen für Vertreter der Sp-Faktoren und Faktoren ohne TATA-

Box im Genom (94). In tierexperimentellen Voruntersuchungen konnten Ijijin *et al.* bereits zeigen, dass die Deletionsanalyse ausgehend von einem 3 kb Konstrukt die höchste Promotoraktivität im Bereich -819 aufwies (100).

1.5 Fragestellung

Während für VEGFR-1 (101) und VEGFR-2 (185) bereits wichtige regulatorische Transkriptionsfaktoren und Promotorbereiche identifiziert worden sind, fehlen für VEGFR-3 trotz seiner großen Bedeutung für die Regulation des lymphatischen Systems diese wichtigen Kenntnisse. Die Bedeutung regulatorischer Kenntnisse wird deutlich durch die Untersuchungen von Moller *et al.*, in denen dem Expressionsmuster der Rezeptoren aus der VEGFR-Familie eine größere Bedeutung bei der Regulation der lymph- und hämangiogenen Aktivität zugewiesen wurde als dem der Liganden (102;103). Die Charakterisierung der transkriptionellen Regulation des humanen *vegfr-3* Gens zur Identifizierung der molekularen, strukturellen und funktionellen Mechanismen von VEGFR-3 ist damit bedeutungsvoll für ein besseres Verständnis von Gen und Rezeptor. Die vorliegende Arbeit soll eine bessere physiologische und pathobiologische Einordnung des Gens ermöglichen und sich an folgenden Fragen orientieren:

1. Welche strukturellen Charakteristika besitzt der *vegfr-3* Promotor?
2. Welcher Sequenzbereich des *vegfr-3* Promotors ist essentiell für die molekulare Regulation?
3. Welche Transkriptionsfaktoren binden am *vegfr-3* Promotor und sind an der Regulation von *vegfr-3* beteiligt?
4. Welche funktionelle Rolle besitzen die identifizierten Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Genexpression von *vegfr-3*?
5. Wie lassen sich die identifizierten strukturellen und funktionellen, molekularen Charakteristika von *vegfr-3* im Vergleich zu den anderen Vertretern der VEGF-/VEGFR-Familie interpretieren?

2 Material und Methoden

Alle verwendeten Grundchemikalien, Lösungsmittel, Puffersubstanzen sowie Detergenzien wurden von den Firmen Difco (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen und sollen in der folgenden Darstellung nicht einzeln aufgeführt werden. Primer und Oligonukleotide wurden von TIB Molbiol (Berlin) synthetisiert und durch ein Nukleotid Removal Kit (Quiagen, Hilden) aufgereinigt. Alle Sequenzierungen von DNA wurden von AGOWA (Berlin) durchgeführt.

2.1 Zellkultur

Die humane endotheliale Zelllinie HMEC-1 sowie die humane pulmonale endotheliale Zelllinie HPMEC wurden in MCDB-131 Medium (Invitrogen, Karlsruhe) bei 37°C und 5% CO₂ unter Zusatz von 15% FKS (Fötale Kälberserum, Biochrom KG, Berlin), 2mM Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom KG, Berlin), 100 µg/ml rhEGF (*human recombinant Epidermal Growth Factor*) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) und 1mg/ml Hydrocortison (Sigma, Deisenhofen) angezüchtet und kultiviert. Die Zelllinie HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) wurde in Medium 199 Earle (Biochrom KG, Berlin) unter Zusatz von 20% myoklonem FKS, 2mM Glutamin 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1% retinalem Wachstumsfaktor kultiviert. Die humanen epithelialen Zelllinien U937, LS174T, HT29, AGS, KATO-III, MKN-28, MKN-45 sowie die hybride endotheliale Zelllinie Ea.Hy926 wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Invitrogen, Karlsruhe) bei 37°C und 5% CO₂ unter Zusatz von 10% FKS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin angezüchtet. Die humane epitheliale Rektumkarzinomzelllinie SW480 wurde in RPMI 1640 Medium (PAA, Pasching, Österreich) bei 37°C und 5% CO₂ unter Zusatz von 10% FKS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Kultivierung von *Drosophila melanogaster* SL-2 Zellen erfolgte in Schneider's Drosophila Medium (Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% Hitze-inaktiviertem insektenzellgeeignetem FKS (Invitrogen, Karlsruhe), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 25°C und atmosphärischem CO₂ (Übersicht Tab. 1).

Tab. 1: Zelllinien

Name	Beschreibung	Quelle/Referenz
HMEC-1	humane mikrovaskuläre endotheliale Zelllinie	Ades et al., 1992
HPMEC	humane Endothelzelllinie, mikrovaskulärer pulmonaler Ursprung	Krump-Konvalinkova et al., 2001
HUVEC	humane Endothelzelllinie, makrovaskulärer embryonaler Ursprung von humanen Nabelschnüren	Präparation Charité, Campus Virchow-Klinikum, Berlin
AGS	humanes Magenadenokarzinom, gut differenziert	Barranco et al., 1983
KATO-III	humanes Siegelringzellkarzinom des Magens, Isolation aus Pleuraerguss	Motoyama et al., 1986 Yokozaki, 2000
MKN-28	humanes Magenadenokarzinom, moderat differenziert, Isolation aus Lymphknotenmetastase	Motoyama et al., 1986 Yokozaki, 2000
MKN-45	humanes Magenadenokarzinom, schlecht differenziert, Isolation aus Lebermetastase	Motoyama et al., 1986 Yokozaki, 2000
Ea.Hy926	humane hybride Zelllinie aus der Fusion von HUVEC mit der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549	Edgell et al., 1983
Schneider SL-2	Drosophila melanogaster Zelllinie	Schneider, 1972

2.2 Transiente Transfektionen und Stimulation von Reporter-Gen-Konstrukten

Transiente Transfektionen von Zellen wurden unter Verwendung des Transfektions-Kits Effectene[®] (Quiagen, Hilden, siehe 2.2.1) durchgeführt. Dazu wurden je nach Zelllinie 50.000 - 250.000 Zellen pro 16mm-Schale im 24-Loch-Format ausgesät und am folgenden Tag mit Reporter-Gen-Konstrukten transfiziert, die für das Luziferasegen *Firefly* des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* kodieren. Die im Enzymtest nachgewiesene Enzymaktivität ist direkt proportional zur Intensität des transkribierten Luziferasegens und diese ist direktes Maß der Menge an Expression des klonierten Promotorfragments. Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz wurde in jeder Transfektion als Positivkonstrukt das Plasmid pRL-TK (Promega, Mannheim) co-transfiziert, das die Expression des Luziferasegens aus *Renilla reniformis* zeigt. Die Menge der eingesetzten DNA variierte je nach verwendeter Zelllinie und Transfektionsmethode. Um die Verwendung gleicher Mengen Plasmid-DNA bei der Transfektion zu gewährleisten, wurde der Transfektionsansatz gegebenenfalls mit den Leervektoren für die Verwendung einer einheitlichen Menge DNA aufgefüllt. Nach 24-stündiger Transfektion wurde das Medium über Nacht durch serumfreies UltraCulture[®]-Medium ersetzt, um eine Synchronisation des Zellwachstums in einer entsprechenden Zellzyklusphase und eine Genexpression nur durch endogene Faktoren sicherzustellen. Die Zellenernte und Messung der Luziferase-Enzymaktivität erfolgte mit Hilfe des Dual-

Luziferase[®]-Reporter Assay Systems (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit einem Monolight-Luminometer (Lumat LB 9507, EG Berthold, Bad Wildbach). Alle dreifach wiederholt in Triplikaten durchgeführten Transfektionsassays wurden mit der durch Renillaexpression erhaltenen Transfektionseffizienz normalisiert und anschließend Mittelwerte mit Standardabweichung (S.E.M.) und Signifikanzen mittels Student's t-Test berechnet. Die Luziferase-Aktivitäten wurden als x-fache Anstiege in Bezug auf die entsprechende Kontrolle berechnet. Abweichende Versuchsbedingungen jenseits der hier aufgeführten sind in den einzelnen Experimenten beschrieben.

2.2.1 Transfektion mit Effectene[®]

Die Methode Effectene[®] (Quiagen, Hilden) beruht auf einer Lipid-DNA-Komplex-Bildung, mit der die verwendeten Zelllinien transfiziert wurden. Die eingesetzte DNA-Menge wurde mit 400 ng Reporter-genkonstrukt und 50 ng pRL-TK pro 16mm-Schale im 24-well Format titriert und der Transfektionsansatz mit 8 µl Enhancer-Reagenz sowie 5 µl Effectene pro µg DNA vorbereitet. Nach Zugabe des Transfektionsansatzes auf die Zellen betrug die Dauer der Transfektion 24 h.

2.3 Gentechnische und molekularbiologische Methoden

Alle gentechnischen und molekularbiologischen Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, wie in Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

2.3.1 Elektrophoretische Auftrennung von RNA und DNA

Die amplifizierten Nukleinsäuren wurden je nach Größe der erwarteten, zu trennenden Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt, wobei Nukleinsäuren >100bp in 1-2% (w/v) Agarosegelen mit TAE-Puffer (1xTAE-Puffer: 40mM Tris; 20mM NaOAc; 2mM Na₂EDTA bei pH 8,3) bei 100V aufgetrennt wurden.

Tab. 2: Plasmide für transiente Transfektionen

Name	Beschreibung	Quelle/Referenz
pRL-TK	Renilla-Kontrollplasmid	Promega, Mannheim
pGL3 Leervektor	promotorfreier Luziferase-Reportergenvektor	Promega, Mannheim
pT81-Luc Leervektor	Luziferase-Reportergenvektor mit viralem Thymidinkinase-Promotor	Nordeen, 1988
<i>vegfr-3</i> (-1876/+59)	in pGL3, 5´- Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-859/+59)	in pGL3, 5´- Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-594/+59)	in pGL3, 5´- Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-490/+59)	in pGL3, 5´- Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-319/+59)	in pGL3, 5´- Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-198/+59)	in pGL3, 5´- Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-171/+59)	in pGL3, 5´- Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-113/+59)	in pGL3, 5´- Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-98/+59)	in pGL3, 5´- Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-42/+59)	in pGL3, 5´- Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-5/+59)	in pGL3, 5´- Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-101/-32)	in pT81-Luc	diese Arbeit
<i>vegfr-3</i> (-101/-66)	in pT81-Luc	diese Arbeit
pPac Ubx	Expressionsvektor für <i>D. melanogaster</i>	Courey & Tjian, 1988
pPac-Sp1	Sp1-cDNA in pPac	Courey & Tjian, 1988
pPac-Sp3	Sp3-cDNA in pPac	Hagen <i>et al.</i> , 1994
pPac-Sp1-DBD	DN ² Sp1 in pPac (nur DBD, keine AD)	Hagen <i>et al.</i> , 1995
pPac-Sp3-DBD	DN Sp3 in pPac (nur DBD, keine AD)	Hagen <i>et al.</i> , 1994

¹ Sämtlich aufgeführte Plasmide enthalten das β -Lactamase-Gen für Ampicillin-Resistenz

² DN steht für dominant-negativ

Nukleinsäuren mit einer Größe <100bp wurden in 12% (w/v) Polyacrylamid-Gelen mit TBE-Puffer (1x TBE-Puffer: 100mM Tris; 100mM Borsäure; 2mM EDTA bei pH 8,3) vertikal bei 200V dargestellt. Die Nukleinsäuren wurden jeweils mit dem Ladepuffer zusammen für DNA-Proben (50% (v/v) Glycerol; 1% (w/v) SDS; 0,1 M EDTA; 0,5% (w/v) Bromphenolblau) bzw. RNA-Proben (50% (v/v) Formamid; 13% (w/v) Formaldehyd; 2% Glycerol (v/v), 2x MOPS-Puffer; 0,5% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die anschließende Visualisierung zur Detektion mittels UV-Licht erfolgte durch Inkubation der Gele in Ethidiumbromid-Lösung (4 μ g/ml). Zur Größenidentifikation wurden industriell genormte Größenstandarts (*ladder*) der Maße 50bp, 100bp und 1kp (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

2.3.2 Semiquantitative Duplex-RT-PCT (Taqman[®])

Zur semiquantitativen Erfassung der Expression des *vegfr-3*-Gens wurden die humanen

Zelllinien HMEC-1, HPMEC, HUVEC, Ea.Hy 926, U937, LS174T, HT29, AGS, KATO-III, MKN-28 und MKN-45 in 3,5 cm-Schalen für 24 h kultiviert und für weitere 24 h unter serumfreien Bedingungen in UltraCulture[®]-Medium nachbehandelt. Die Gesamt-RNA wurde nach 48 h mit TRIZOL[®] Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) zur Bestimmung der Transkription des untersuchten Gens nach Angaben des Herstellers isoliert und in 50µl DNase freies H₂O aufgenommen. Von der isolierten RNA wurden 50 ng absolute RNA zur cDNA Synthese durch reverse Transkription (RT) eingesetzt, die mit 0,5 mM dNTPs, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 40 U RNase Out, 2 µl RT-Puffer (10x), 0,5 µg Oligo-dT Primern und 50 U Super Script II des Reverse Transcription Systems[®] (Promega, Mannheim) in 20 µl Ansatz erfolgte. Die Reaktion wurde vor Zugabe der Super Script II 2 min bei 42°C und nach Zugabe für weitere 50 min bei 42°C inkubiert und anschließend für 15 min bei 70°C abgestoppt. Jeweils 2 µl der cDNA wurden zur Quantifizierung mittels Primer für *vegfr-3* in Real Time PCR unter Verwendung des TaqMan-Universal[®] oder SYBR-Green[®] PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nach Angaben des Herstellers mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System eingesetzt (Tab.3). Die parallele Amplifikation des konstitutiv exprimierten Gens für *β-Aktin* mittels spezifischer Primer diente der Kontrolle gleicher Mengen genomischen Ausgangsmaterials und damit einer vergleichenden quantifizierenden Abschätzung der Expression mit der ΔC_T – Methode unter Normalisierung der C_T – Werte auf *β-Aktin* und Ermitteln der relativen Expression gegenüber normalem Gewebe (104). Eine anschließende Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte erlaubte eine Visualisierung und semiquantitative Bewertung des Erfolgs der Amplifikation.

Tab. 3: Primersequenzen für quantitative Duplex-RT-PCT (Taqman[®])

Name	Forward-Primer (5' / 3')	Reverse- Primer (3' / 5')	Probe (5'-Fam à 3'-Tamra)
<i>vegfr-3</i>	gctgagacccgtggtcct	ctatgcctgctctctatctgctcaa	acgacctacaaaggctctgtggacaacca
<i>β-actin</i>	tgcattgttacaggaagtcctt	gggagaggactgggcat	ccatcctaaaagccaccccacttctctcta

2.3.3 Plasmidpräparation, Ligation und Transformation von *E.coli* mit Plasmiden

Die Präparation von Plasmid-DNA zur Transfektion erfolgte mit dem JETstar® Plasmid Maxiprep Kit (Genomed, Oeyenhausen) nach Angaben des Herstellers und Aufnahme der DNA in Molecular Grade Water® (Eppendorf, Hamburg). Die Ligation erfolgte mit T4 DNA Ligase gemäß den Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe). Die Transformation wurde mit kompetenten XL1-Blue-*E.coli*-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA, USA) unter Verwendung von 0,5% Mercaptoethanol in Ampicillin-freiem Medium mit Konstrukten durchgeführt, die ein Resistenzgen für Ampicillin enthielten. Die transformierten *E.coli* Zellen wurden auf Luria-Bertani(LB)-Agar-Platten (1% NaCl; 1% Bactotrypton; 0,5% Hefeextrakt; 1,5% (w/v) Agar-Agar bei pH 7,0 mit 100µg/ml Ampicillin (Boehringer, Mannheim) ausgestrichen und kultiviert. Die Kulturen wurden 24h bei 37°C im Kulturschrank aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Ernte einzelner prominenter Kolonien zur weiteren Anzucht positiv selektionierter Klone in flüssigem LB-Ampicillin-Nährmedium (ohne Agar-Agar). Nach weiterer Kultur über 24h bei 37°C erfolgte die Präparation der transformierten Plasmid-DNA mittels Jetquick® Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, Oeyenhausen) nach Angaben des Herstellers. Zur Kontrolle der selektionierten Klone wurde das gewonnene Plasmid nach Präparation durch Restriktionsenzymverdau aufgereinigt und mittels Elektrophorese aufgetrennt sowie mit Größenstandarts ausgewertet. Darüber hinaus erfolgt zur Verifizierung des Klons eine Sequenzierung.

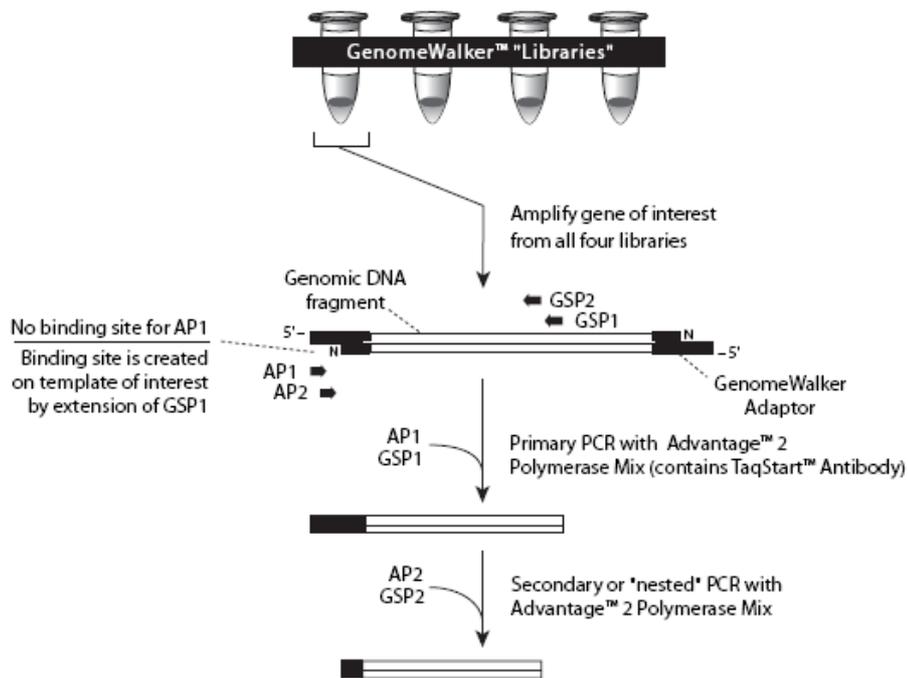
2.4 Klonierung von Promotorkonstrukten in Reporter-genvektoren

2.4.1 Klonierung des humanen *vegfr-3* Promotors

Zur Eingrenzung essentieller Promotorbereiche des VEGFR-3 Rezeptors wurde zunächst ein möglichst großer Ausschnitt aus dem Promotorbereich isoliert. Hierzu wurden zunächst zwei spezifische Primer mit entsprechender Bindungssequenz für das erste Exon des humanen *vegfr-3* Gens entworfen, um anschließend mit Hilfe des Genome Walking® Kits (Clontech, Palo Alto, USA) aufwärts (*upstream walking*) in 5'-Richtung den Promotor zu amplifizieren. Jedes Kit enthielt vier „Bibliotheken“ aus nicht klonierten, speziell präparierten DNA-Fragmenten, entsprechend als *Genome Walker*

Libraries in Abb. 2A bezeichnet. Die nach Sequenzanalyse entworfenen, spezifischen Primer *vegfr-3* GSP1 (*Gene-Specific Primer*) und *vegfr-3* GSP2 wurden zusammen mit den unspezifischen Primern des Kits AP1 (*Adaptor Primer*) und AP2 in zwei aufeinanderfolgenden Schritten amplifiziert. Im ersten, äußeren Schritt (*primary PCR*) wurden alle vier „Bibliotheken“ mit *vegfr-3* GSP1 und AP1 mittels Advantage Genomic PCR[®] Kits (Clontech, Palo Alto, USA) amplifiziert (Abb. 2A). Nach Verwendung von vier verschiedenen Restriktionsenzymen für jede „Bibliothek“ und Ergänzung mittels Adapter-Sequenzen, diente das erste Amplifikat als Vorlage für die zweite, innere (*secondary* oder *nested*) PCR zur Amplifikation mit den Primern *vegfr-3* GSP2 und AP2. Die hieraus resultierenden amplifizierten Fragmente mit Hilfe des Gel Extraction Kits QIAEX II[®] (Quiagen, Hilden) wurden nach Angaben des Herstellers aus einem Agarosegel eluiert und nach Aufnahme in H₂O amplifiziert wurde (Abb.2A). Der amplifizierte Bereich wurde mit der publizierten Sequenz 94 verglichen, und auf Grundlage des übereinstimmenden Bereichs wurden nach erfolgreicher Isolierung des *vegfr-3* Promotors die Primer *vegfr-3*(-858) und *vegfr-3*(+59) entworfen, die zusätzlich eingefügte Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bgl*III und *Nco*I enthielten (Abb. 2B). Nach Amplifikation des ca. 0,9kb großen Konstrukts war somit eine Subklonierung in den pGL3-Leervektor möglich (Abb. 2B). Das generierte Konstrukt mit dem Promotorbereich von -858 bis +59 bildete damit als *vegfr-3*(-858/+59) die Grundlage für die 5'-Deletionsanalyse und weitere Klonierungen (Abb.3).

A



B

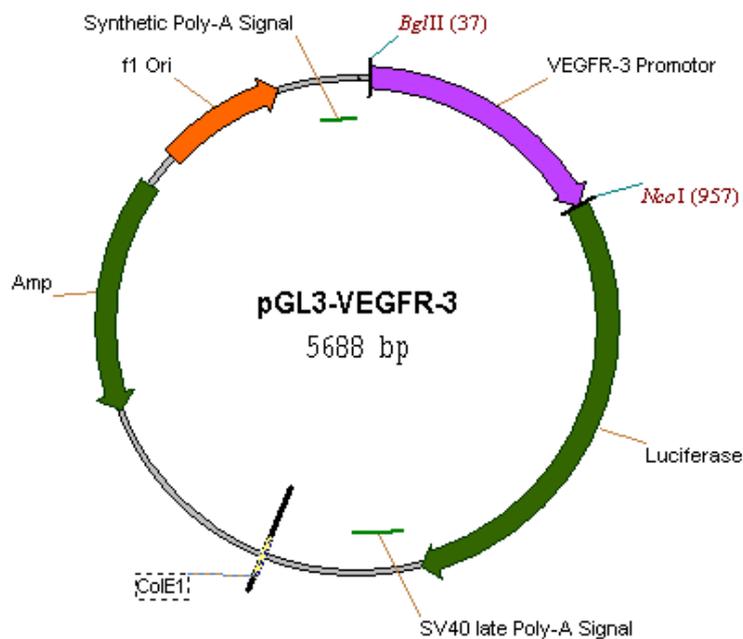


Abb. 2: Klonierung des Promotors - der pGL3 Leervektor

(A) Amplifikation des ca. 0,9kb großen DNA-Fragments zur Klonierung in den pGL3 Leervektor als Grundlage der 5' -Deletionsanalyse mit Hilfe des Genome Walking® Kits (Abbildung und Methode: Clontech, Palo Alto, USA) (B) Der pGL3 Leervektor mit potentiellen Schnittstellen für Restriktionsenzyme sowie dem Klonierungsbereich für die Reporter-genkonstrukte (lila) des VEGFR-3 Promotors.

2.4.2 Herstellung von 5'-Deletionskonstrukten

Auf Grundlage des amplifizierten Promotorkonstrukts *vegfr-3*(-858/+59) erfolgte die 5'-Deletionsanalyse mit transienten Transfektionen zur Untersuchung der basalen Transkriptionsregulation. Schrittweise wurde hierzu der untersuchte Promotorbereich nach jeder Subklonierung und Überprüfung des Konstrukts mittels Transfektion vom jeweiligen 5'-Ende beginnend verkürzt. Jeder Verkürzung folgte dann eine Überprüfung mittels Transfektion aller bis zu diesem Zeitpunkt generierten Konstrukte. Als Sequenzmatrix (*template*) diente hierzu das Konstrukt *vegfr-3* (-858/+59) für die weiteren Deletionsschritte sowie für die Sequenzverlängerung zur Generierung von *vegfr-3* (-1876/+59), da sich durch Amplifikation mit entsprechenden Primern unter den beschriebenen Bedingungen kein größeres Amplifikat als *vegfr-3* (-858/+59) generieren ließ (Promotorbereich: Abb.3). Jeder Deletionsschritt erfolgte unter Verwendung des *template* in PCR mit 30 Zyklen (94 °C 30s, 59 °-63 ° über 1-3min je nach Fragmentgröße) und den Primern *vegfr-3*(+59) mit Schnittstelle für das Restriktionsenzym *NcoI* sowie eines synthetisierten Primers aus dem 5'-Bereich mit Schnittstelle für *BclII* (Tab. 4). Nach elektrophoretischer Auftrennung, Überprüfung der erwarteten Fragmentgröße, Eluierung aus dem Agarosegel und Restriktionsenzymverdau wurden die isolierten Fragmente schrittweise in den pGL3 Leervektor kloniert und wie beschrieben in transienten Transfektionsexperimenten untersucht.

Tab. 4: Primersequenzen für die Generierung der 5'- Deletionskonstrukte (5' ⇒ 3')

Name	Sequenz
R3 (-1876)	tacgctcgaggctgcggtgagcagataatcatgt
R3 (-858)	agtcagatctgtaagaggtgccaagtcagaaag
R3 (-554)	gtcagatcttctcccgggtcaagcgattc
R3 (-490)	agtcagatctcacaaccaagctcggcgattatt
R3 (-319)	agtcagatctaagagcgcgtgccgcathtt
R3 (-198)	agtcagatctgaccctgtggtgaggagcg
R3 (-171)	agtcagatctggagcggcctgaatcc
R3 (-113)	agtcagatctccaggccagccggcgc
R3 (-94)	cccgctccggcccccgccccgcccc
R3 (-42)	agtcagatctgcgaggacactttcagcc
R3 (-5)	agtcagatctgtcgaccacgcgcagc
R3 (+59)	agtaccatggagccacagtcgcaggcacag

-1876 GGTACCGAGCTCTTAACGGGTGCTAGCCCGGGCTGAGAGAGGGCTGGGGTGGAGCAGATA -1860
 -1859 TCATG TCA CTG CAC TCC AGC CTG GGT GAC AAA GTG AGA CCC TGT CTA AAACAACAACAAC -1800
 -1799 AAC AAA AAA AAA ACA AGT ATA TTC TGG GCG GGG CAC AG TGG CTC ATG CCTATAATCCAG -1740
 -1739 CAC TT TG GGA GGC TGA GGT TGG CAG ATC AGG AAG TCA GGAGITTTGAGACCAGCCTGGTCA -1680
 -1679 ACA TGG TTA AAC CCC CAT CTC TAC TAA AAA TAC AAA AAT TAG CCG GGC ATG GTGCCGGGT -1620
 -1619 GCC TGG AAT CAC AGC TAC TCA GGA GGC TGA GGC GGG AGA ATTGCTTGACCCCAAGGAGGCA -1560
 -1559 GAG GITTG CAT TGCAG TCCA GTG AGAT CGT CCGA CTG CACT CCA GCCT GGG CAAC AAAAGA -1500
 -1499 GAGAC TTT GA GA AAA AA AA A AA AAAG TAC ATT C TGA AAAA AAA AG CA AAA CATA TAT TTT -1440
 -1439 GAT GAT AAA ATG ATAAA CAA AAG CAG GGA AATG ATAA TGCC AGG GT AGT GGGC ATCT TCT -1380
 -1379 GGGG TTG GTG AGGG GTTT GTG ATGGG AAGT GAGGGG ATGTG GGGATG TCATT CTAC ATCC -1320
 -1319 CTTG GCC TG GAG AAT GG AA ACAC AGG TATT TG TTG CTTT AAA AT T CAGG TTTA TAA TATG -1260
 -1259 CTG AT AT ATT AT GTA CTTT CCA TA AG TGT GT TA CA TC TCATA ATCT TTC AAG CT AA AAA -1200
 -1199 AA ATCAAT ATATGA TT GAT AA ATA CC TA ACTT CA TG TATC GCCT GGT TACC TAG TT TC CC -1140
 -1139 CA ACCT TAT TTG TT AA ATT ATC TAC ACT ATC CG CA CTG ATTT GTG ATT CCA GCCT AAT AA -1080
 -1079 TAT AGCCACT TCTT ACCTG GAT TGG A GAG AG CT GGTA GTGG TTA TT GA AAA TCT AC TCTT -1020
 -1019 GCT TTTT GCGG AG GATG AAAG GGCT TTGG CCGG CG GG GGT GGGGG ATGGA AAATGTGAA -960
 -959 TGA AAC GAAA AGCA GGGAA GGAG GTTG AGAC AGTC ATGGTC ATGGG CT TCATT ATT AAAC -900
 -899 AGGAA AAT TCTA GAGA CAA ACT GAAA AGAGA ACG GAAG TCCT CTG TAAG AGG GTTG CCAA -840
 -839 GTCAG AAAGCA AAAGC AAAGT GTCGC TT TAT TAAA AAGG TGG GGG CCGG TOCT GAT TGAG -780
 -779 CTGA GAA CAA AACA TCTGG GGG AGT TCTAAA GCTAGG AGGCCAGG CCTGC AGGGAGGGGG -720
 -719 TGGT CATC CCGG GTGTCC CGCTC ACGGG TCGGG CTT CCGT CGACAC TGTCGG TCGA CAC -660
 -659 TG TCCA GGT AA ACACT GCT GAA CCGG TT TTGT T TTT GCT TTT TT TTT TTTT TTT TTG GC T -600
 -599 CCC AGAC TGGAGT GCAG TGGCG CGAT CTCGG CTCACT GCA ACCTC CTC TC CCGG GTTCA -540
 -539 AGCG ATT CTCCTG CCTCAGCC CCCCCG AGAAGC TGGGAT TACAG GCGCGC ACAAC CA AGC -480
 -479 TCGG CGTA TTA TT TT ATT TA TT TGC TTG TTT ATT TT TGA GAC TGGG TCT CCC TAT G TT AC -420
 -419 GCC GGCT GGTGC CACT ATT TTCAA AGATGT AAC AT ACTA TTTT TACA AG GATT GCT T T CT -360
 -359 TGTTT AGT CTAGATT TTACC GATG GAAA GAAA GGA CCGA AAAG AGCG CGT GCC GCA T TTT -300
 -299 GCT CCCC TTTGC CCAC CAGG CTC CATCA CCTC CCGA GCG CATCG CGA GACC GTCTGGGTT -240
 -239 ACCCC CGTCCCCG CGCCCCG AGCCGCC AGGAGGGG GCCCCGAC CCTGTGGT GCGGAGCG -180
 -179 CGCAC TGCT CGGGTGC ACCGGACGCC CGCGCGGGCTG GGACGGACGGGGGAGGGGGG -120
 -119 CGCGGGGAG CGGCCTG AAT**CCCG GGCCCGCT CCGGCC CCGCCC GCCC GCCCCGCC** -60
 -59 CAGGCCAG CCGGC GCCCGGC GGACACTT TCAGCCCC GAGCCCGG GCGCTCG GGTC GGA +/-0
 +1 CCCACGGCAGCGGCCGGAGATGCAGCGGGCGCCCGCTGTGCCTGCGACTGTGGCTC +59

Abb. 3: Ausschnitt aus der Gensequenz der 5'-flankierenden Region

Dargestellt ist die Promotorsequenz von -1876 bis +59 des humanen *vegfr-3* Gens, die im Rahmen dieser Arbeit kloniert wurde und als Reportergenkonstrukt die Grundlage der 5'-Deletionsanalyse bildete. Hervorgehoben (fett) dargestellt ist der im Folgenden beschriebene Sequenzbereich des Minimalelements *vegfr-3*(-101/-66).

2.4.3 Herstellung von Oligonukleotiden und deren Mutanten

Der als minimaler proximaler Promotor identifizierte Sequenzbereich von -101 bis -66 wurde zusätzlich mit den drei jeweils entsprechenden Nukleotiden für die Restriktionsenzyme *XhoI* und *HindIII* und drei weiteren Nukleotiden für einen suffizienten Restriktionsenzymverdau als 5'/ 3' - und als 3'/ 5' - Einzelstrang synthetisiert. Anschließend erfolgten die Hybridisierung und der Restriktionsenzymverdau. Die so erhaltenen doppelsträngigen Oligonukleotide wurden entweder zur Subklonierung in das heterologe Promotersystem pT81 verwendet oder für Bindungsstudien radioaktiv markiert (Tab. 5). Die Oligonukleotide zur radioaktiven Markierung für Bindungsstudien enthielten keine zusätzlich eingefügten Nukleotide für Restriktionsenzyme. Mutanten der synthetisierten Oligonukleotide enthielten kritisch ausgewählte kurzstreckige repetitive Nukleotidmuster, um die Funktionalität aufzuheben (Tab. 5).

Tab. 5: Synthetische doppelsträngige Oligonukleotide für EMSA (Sonde/Kompetition) und/oder Subklonierungen in pT81

Name	Sequenz (5' – 3')
A (-101/-32)	<div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> GC-Box I GC-Box II GC-Box III </div> tcccgggcccgcctccggc cccgccccgccccgccccag gccagccggcgcccgcgaggacattc
B (-101/-66)	tcccgggcccgcctccggcccccgccccgcccgc
C (-65/-32)	ccgccccaggccagccggcgcccgcgaggacact
D (-104/-85)	gaatcccgggcccgcctccg
E (-84/-63)	gccccgccccgccccgcccgc
B _{M1} (-101/-66) Mut 1	tcccg ttt cgc tatcgccccgccccgcccgc
B _{M2} (-101/-66) Mut 2	tcccgggcccgcctccggc tttcgctt cgctt cgct
B _{M3} (-101/-66) Mut 3	tcccg ttt cgc tatcggc tttcgctt cgctt cgct

2.4.4 Hybridisierung der Oligonukleotide

Nach Sequenzauswahl wurden die Oligonukleotide in der jeweiligen 3'/ 5' - und in der 5'/ 3' - Form synthetisiert und vor dem Einsatz als radioaktiv markierte Sonde oder für Subklonierungen in das heterologe Promotorsystem pT81 hybridisiert. Dazu wurden jeweils 5 µg der zueinander komplementären Oligonukleotide in 50 µl H₂O

aufgenommen und für 5 min bei 95°C erhitzt. Mit diesem Schritt sollten alle bestehenden Bindungen der Basen untereinander gelöst werden, um eine unbeeinträchtigte Anlagerung (*Annealing*) der beiden Stränge zu ermöglichen. Dieser Schritt erfolgte durch langsame Abkühlung (60 min) der DNA-Verdünnung bis auf Raumtemperatur (20°C). Die erfolgreiche Hybridisierung wurde bestätigt, indem die Wanderung der doppelsträngigen Oligonukleotide sowie beider Oligonukleotide als Einzelstrang auf einem nativen TBE-Gel im elektrischen Feld untersucht wurde. Durch die größere molekulare Masse doppelsträngiger Oligonukleotide zeigen diese ein verzögertes Wanderungsverhalten gegenüber einzelsträngigen Oligonukleotiden und können auf diese Weise in Hinblick auf ein erfolgreiches Annealing hin untersucht werden, indem jeweils ein Einzelstrang als Referenz im elektrischen Feld dient.

2.4.5 Subklonierung in heterologes Promotorsystem

Im weiteren Verlauf wurde die Funktionalität des identifizierten essentiellen Promotorbereichs in Hinblick auf eine mögliche Enhancer-Funktion überprüft. Hierzu wurden die synthetisierten Oligonukleotide in des heterologe Promotorsystem des viralen Vektors pT81-Luc (105) subkloniert. Der Vektor des *Herpes simplex* Virus enthielt den viralen Thymidinkinase-Promotor und keine mammalischen Enhancer-Elemente. Auf diese Weise ließ sich eine unmittelbare Enhancer-Funktion der synthetisierten Oligonukleotide und Ihrer Mutanten ermitteln. Um den Erfolg der jeweiligen Subklonierung zu überprüfen, wurde jedes klonierte Promotorkonstrukt durch Restriktionsenzymverdau erneut aufgereinigt und sequenziert.

2.5 Electronic Mobility Shift Assay (EMSA)

2.5.1 Radioaktive Markierung von hybridisierten Oligonukleotiden

Zur Detektion und Identifikation von nukleären Transkriptionsfaktoren an definierten DNA-Sonden wurden EMSA-Studien mit spezifischen Oligonukleotiden und Antikörpern durchgeführt. Um die Bindung zwischen den doppelsträngigen Oligonukleotiden und den nukleären Proteinen detektieren zu können, wurden die Hybride mittels einer enzymatischen Reaktion radioaktiv markiert (*labelling*). Dabei erfolgte unter Katalyse

des Enzyms T4-Kinase (Invitrogen, Karlsruhe) eine Austauschreaktion, bei der die endständigen 5'-Phosphatgruppen durch radioaktives [³²P]-ATP (Amersham Bioscience, Braunschweig) ersetzt wurden. In den Ansatz wurden jeweils 150-200 ng doppelsträngige DNA, 5 µl [³²P]-ATP (9,25 MBq/25 µl), 0,5 µl T4-Kinase sowie 5 µl T4 Kinase-Puffer (5x) bei einem Gesamtansatz von 25 µl gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Vermeidung von unerwünschten Bindungen durch überschüssige Nukleotide wurde der Ansatz anschließend mit dem Nucleotide Removal Kit[®] (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers für radioaktive Proben aufgereinigt.

2.5.2 Präparation von nukleären Proteinextrakten

Die Kernextrakte wurden aus Zellkulturen gewonnen, die in 10 cm-Schalen mit jeweils 10⁶ Zellen unter Verwendung serumhaltigen Mediums angezchtet wurden. Nach 24-stündiger Kultur erfolgte ein Wechsel des Mediums unter Verwendung von serumfreiem UltraCulture[®]- Medium für weitere 24 h, um die Zellen in einer Wachstumsphase zu synchronisieren. Nach Ablösen der Zellen aus den Kulturschalen mit 1% Trypsin/EDTA (Biochrom KG, Berlin) und Aufnahme in 5 ml kaltes PBS (Invitrogen, Karlsruhe: 2,7 mM KCl; 1,47 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄) wurden die Zellen 10 min bei 1000 g (4 °C) zentrifugiert und das Pellet in 300 µl Puffer A (10 mM Tris pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 M MgCl₂; 10% (v/v) Glycerol; 10 mM K₂HPO₄; 1 mM Na₃VO₄; 10 mM NaF; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF) aufgenommen. Nach Zugabe von 0,125% (v/v) Nonidat P-40 (Boehringer, Mannheim) wurden die Zellen etwa 5min auf Eis inkubiert, um die Dissemblierung der Zytoplasmamembran zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz erneut zentrifugiert und die im Pellet befindliche Zellkernfraktion durch Resuspension des Pellets in 40 µl Puffer C (20 mM Tris-Puffer pH 7,9; 0,42 M NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 10% (v/v) Glycerol; 10 mM K₂HPO₄; 1 mM Na₃VO₄; 10 mM NaF; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF) aufgetrennt. Die restliche Zellbestandteile und Kernmembranreste wurden bei 12000 g für 10 min (4 °C) von den Kernproteinen abgetrennt und die im Überstand befindlichen Kernproteine zur Bestimmung des Proteingehalts aufgenommen. Dies erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung des Protein Assay Kit[®] von (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Die Kernextrakte wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.5.3 Identifizierung nukleärer Proteine unter Verwendung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Nach Auswahl eines entsprechenden Oligonukleotids (Tab. 5) und [³²P]-radioaktiver Markierung wurde die Sonde mit einer ermittelten Aktivität von 50000 cpm [*counts per minute*] mit 5 µg Proteinextrakt, 1 µg poly(dI-dC), 10 µg BSA und 5 mM DTT in Shift-Puffer für Zink-Finger-Proteine (20 mM HEPES-Puffer pH 8,4; 60 mM KCl; 10% (v/v) Glycerol; 1 mM ZnCl₂) in einem Gesamtansatz von 20 µl 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Durchführung von Kompetitionsstudien wurde der Ansatz vor Zugabe der markierten DNA-Sonde mit 200fachem molarem Überschuss an spezifischen Oligonukleotiden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für Supershift-Experimente erfolgte vor Zugabe der markierten DNA-Sonde eine Inkubation des Ansatzes mit 1 µl (2 µg) der spezifischen Antikörper bei Raumtemperatur (Tab.6). Der Ansatz wurde zu Detektion auf 8% native 0,5 xTBE-Polyacrylamid-Gele (0,5 xTBE-Puffer: 50 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA) aufgetragen, an die zuvor über mindestens 1h eine elektrische Spannung von 100 V zum „Vorlauf“ angelegt waren. Die Auftrennung erfolgte bei 200 V über 2-2,5 h, um eine eindeutige Trennung der Proteinbanden sicherzustellen. Das Gel wurde unter Vakuum bei 85°C über 2 h getrocknet und bei -80°C unter Verwendung einer Verstärkerfolie (Kodak BioMax Intensifying Screen[®], Amersham Bioscience, Braunschweig) auf radiosensitiven Filmen (Kodak BioMax MR[®], Amersham Bioscience, Braunschweig) für 24-36 h exponiert und anschließend im Automaten entwickelt.

Tab. 6: Antikörper für EMSA-Studien, 200 µg IgG (Immunglobulin G) in 0,1 ml PBS

Name	Quelle
Sp1 (PEP-2)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Sp3 (D-20)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Sp4 (V-20)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Ap20 (C-18)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Egr-1 (C-19)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
C-myc	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

3 Ergebnisse

3.1 Expression von *vegfr-3* in endothelialen und epithelialen Zelllinien

In einer Auswahl endothelialer und epithelialer Zelllinien wurde die Expression des *vegfr-3* Gens untersucht, um eine geeignete Zelllinie für die anschließende Analyse regulatorischer Promotorbereiche identifizieren zu können und dabei Unterschiede der basalen Expression zwischen endothelialen und epithelialen Zelllinien zu erfassen. Die humanen Endothelzelllinien HMEC-1, HPMEC, HUVEC, Ea-Hy296 sowie die humanen Epithelzelllinien AGS, KATO-III, MKN-28 und MKN-45 wurden hinsichtlich der basalen Expression des *vegfr-3* Gens unter Einsatz von spezifischen Primern in einer Real-Time-PCR (Taqman[®]) untersucht. Als Maß hierfür wurde die mRNA-Menge an *vegfr-3* quantitativ bestimmt (Abb. 4A). Die größte Menge an *vegfr-3* mRNA-Transkript aller untersuchten Zelllinien ließ sich in HMEC-1 Zellen nachweisen und war wesentlich höher als in HUVEC- Zellen und in HPMEC- Zellen. In der endothelialen Zelllinie Ea-Hy296 sowie in sämtlichen untersuchten epithelialen Zelllinien ließ sich keine signifikante Menge an mRNA-Transkript des *vegfr-3* Gens als relativer Anteil von HMEC-1 nachweisen. Zur Ergänzung dieser Untersuchungen wurden alle in der Real-Time-PCR untersuchten Zelllinien mit dem später ermittelten Minimalelement *vegfr-3*(-101/-32) transfiziert und in Hinblick auf ihre Luziferase-Aktivität jeweils gegenüber dem pT81-Leervektor als Maß für die Transaktivierbarkeit der basalen Expression untersucht (Abb. 4B). In diesem Transfektionsassay konnte gezeigt werden, dass HMEC-1 Zellen den größten signifikanten Anstieg der relativen Luziferase-Aktivität (ca. 15-fach) besitzen und die Zelllinie mit der größten basalen Expression das höchste Potential an Transaktivierbarkeit zeigte. Ebenfalls signifikant hohe relative Luziferase-Aktivität war nachzuweisen bei den endothelialen Zelllinien HUVEC, HPMEC und Ea.Hy296. Darüber hinaus zeigten im Reporterassay auch die epithelialen Zelllinien AGS und MKN-28 eine, wenn auch geringere signifikante Luziferase-Aktivität nach Berechnung mittels Student's t-Test. Aufgrund der Voruntersuchungen fiel die Auswahl für weiterführende Analysen auf die Zelllinie HMEC-1 mit der höchsten Menge an basaler Genexpression sowie größten relativen Luziferase-Aktivität als Maß für die potentielle Genaktivität.

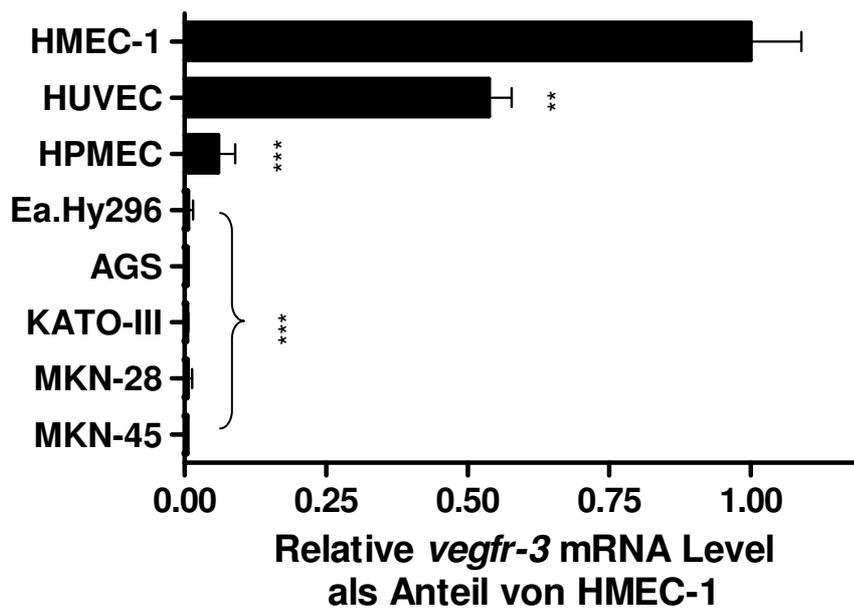
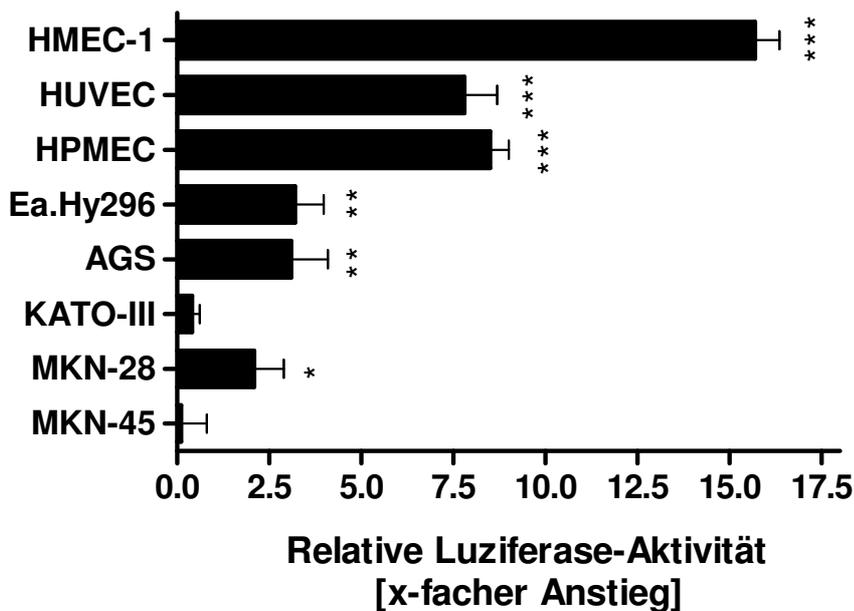
A**B**

Abb. 4: Basale Expression und Transaktivierung des *vegfr-3* Gens in humanen endothelialen und epithelialen Zelllinien

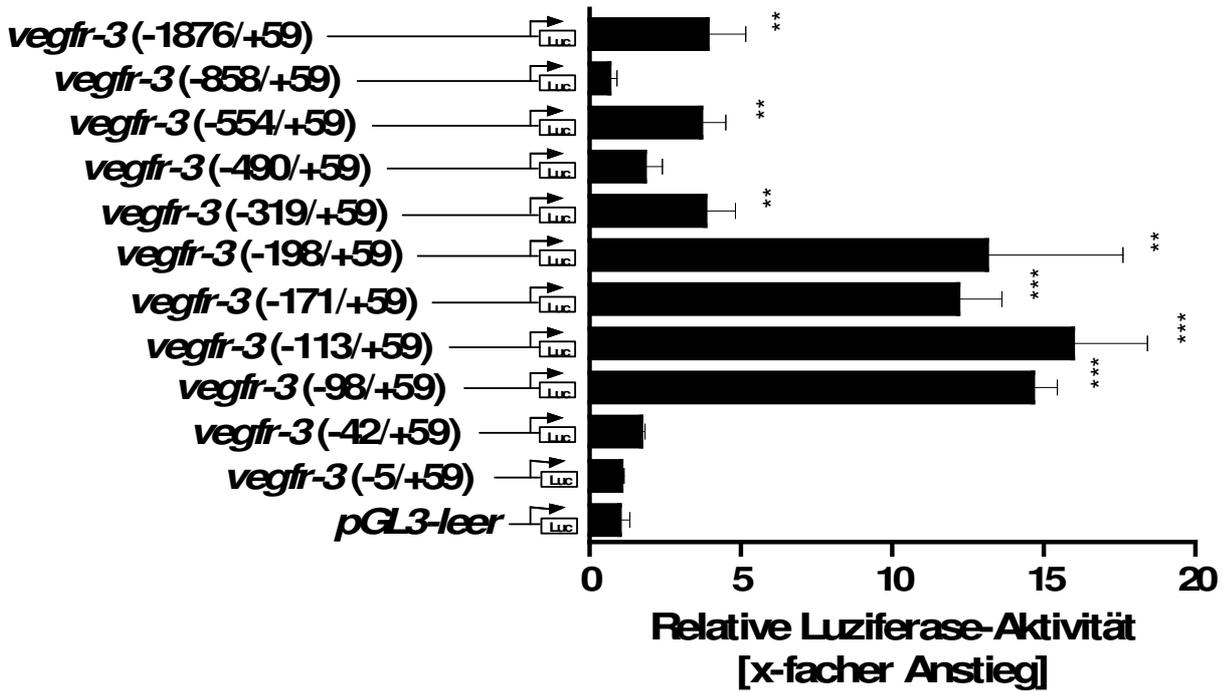
(A) Unter Einsatz von spezifischen Primern wurde die Gesamtmenge an *vegfr-3* mRNA-Transkript in den Zelllinien ermittelt und durch gleichzeitige Amplifikation mit spezifischen Primern für das konstitutiv exprimierte β -Aktin Gen quantitativ ausgewertet. Die Menge an *vegfr-3* RNA Transkript ist als relativer Anteil der HMEC-1 Zellen dargestellt und wurde mit diesem mittels Student's t-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede verglichen (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). (B) Das nachfolgend ermittelte Minimalkonstrukt *vegfr-3(-101/-32)* wurde mit einer Auswahl von humanen endothelialen und epithelialen Zelllinien mit gleichen Mengen DNA (400ng) transfiziert. Alle in Triplikaten durchgeführten Transfektionsassays wurden mit der durch Renilla-Expression erhaltenen Transfektionseffizienz normalisiert und anschließend Mittelwerte mit Standardabweichung (S.E.M.) und Signifikanzen mittels Student's t-Test berechnet (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). Die Luziferase-Aktivität wurden als x-fache Anstiege in Bezug auf den Leervektor pT81 für jede Zelllinie berechnet.

3.2 Identifizierung der Promotoraktivität und regulatorischer Bereiche

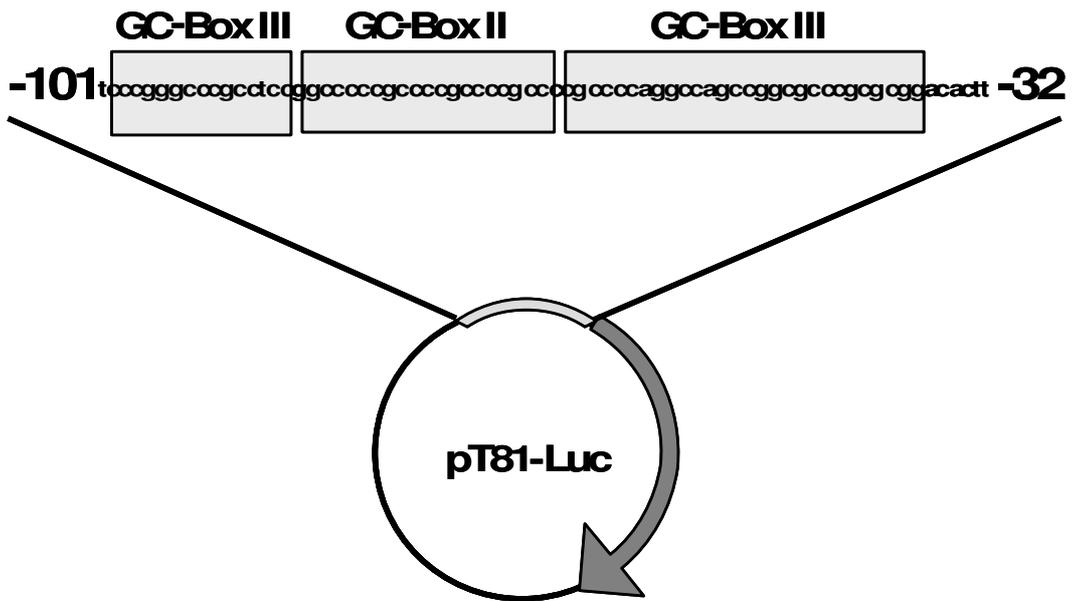
Zur Untersuchung der 5'-flankierenden Promotorregion wurde nach Isolierung des humanen *vegfr-3* Promotors ein ca. 0,9 kb großes amplifiziertes DNA-Konstrukt ausgewählt und vor das Luziferase-Reportergen in den pGL3-Leervektor kloniert. Das auf diesem Weg erhaltene Reportergenkonstrukt *vegfr-3(-858/+59)* leitete sich von der Bezeichnung des Konstrukts mit Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt ab, der 858 Basenpaare *upstream* und 59 Basenpaare *downstream* vom Transkriptionsstartpunkt zu liegen kam, und wurde in HMEC-1 Zellen transient transfiziert. Im Vergleich zu Reportergenkonstrukten für *vegfr-A* und *vegfr-D* 106 war ein entsprechendes *vegfr-3* Promotorkonstrukt noch nicht publiziert worden. Das Promotorkonstrukt wurde hinsichtlich seiner Luziferase-Aktivität mit dem Leervektor pGL3 verglichen und zeigte einen deutlichen Anstieg in der Transaktivierung des Reportergens als Maß für die *vegfr-3*-Aktivität (Abb. 5A). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde *vegfr-3(-858/+59)* als Ausgangskonstrukt für die 5'-Deletionsanalyse verwendet, um den für die transkriptionelle Regulation verantwortlichen Promotorbereich einzugrenzen. Nach Auswahl geeigneter Promotorbereiche für potentielle Primer wurde mittels PCR-Amplifikation schrittweise eine Reihe von 5'-Deletionskonstrukten hergestellt und anschließend in den pGL3-Leervektor subkloniert (Abb. 5A). Im Rahmen der 5'-Deletionsanalyse wurde schrittweise jedes generierte 5'-Deletionskonstrukt nach erfolgter Subklonierung in der Serie aller bis dato untersuchten Konstrukte transient transfiziert und in Hinblick auf seine Luziferase-Aktivität mit dem Leervektor pGL3 und den anderen Konstrukten verglichen (Abb. 5A). Diese sukzessive Analyse ermöglichte eine genaue Beurteilung der Promotoraktivität jedes neu generierten Konstruktes. Das Konstrukt *vegfr-3(-1875/+59)* wurde durch Sequenzverlängerung ausgehend von *vegfr-3(-858/+59)* wie beschrieben generiert, in pGL3 subkloniert und in transienten Transfektionen in Hinblick auf seine Expression eingesetzt. Eine Verkürzung des *vegfr-3* Promotors von -1876 auf -858 führte zu einer Abnahme der Luziferase-Aktivität auf das Niveau des Leervektors, während eine weitere Verkürzung von -858 auf -554 zu einem erneuten Anstieg auf das Ursprungsniveau führte. Eine anschließende schrittweise Verkürzung des Promotors von -554 bis -98 bewirkte eine transkriptionelle Aktivität auf Höhe des Ausgangsniveau von *vegfr-3(-1876/+59)* und höher, während durch erneute Deletion von 56 Basenpaaren [*vegfr-3(-42/+59)*] die Promotoraktivität vollständig aufgehoben wurde. Dieser entscheidende Deletionsschritt

fürte zur Identifizierung eines in 5'-Richtung (*upstream*) gelegenen, essentiellen Minimalpromotorbereichs für die basale Regulation mit der Sequenz der Nukleotide von -98 bis -42, in dem entscheidende regulatorische Elemente für die gesamte Promotoraktivität lokalisiert waren. Um die Funktionalität und damit die Relevanz des ermittelten Minimalpromotorbereichs zu untersuchen, sollte geklärt werden, ob der Minimalpromotorbereich des *vegfr-3* Gens isoliert ohne Einfluss externer regulatorischer Gensequenzen als Enhancer-Element wirken konnte. Für diese Untersuchung wurde ein entsprechend doppelsträngiges Oligonukleotid synthetisiert und hybridisiert und in das heterologe Promotorsystem des Vektors pT81-Luc subkloniert, das neben dem gesamten entscheidenden regulatorischen Promotorbereich noch zusätzlich Sequenzverlängerungen im 5'-und 3'-flankierenden Bereich umfasste [*vegfr-3(-101/-32)*] (Abb. 5B). Die Sequenzverlängerungen waren notwendig, um keine potentielle Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren im unmittelbaren 5'- und 3'-Randbereich der ermittelten Promotersequenz durch molekularbiologische Methoden (z.B. Restriktionsenzymverdau, etc.) zu verlieren. Das heterologe Promotorsystem des Vektors pT81-Luc enthielt den viralen Thymidinkinase-Promotor aus *Herpes simplex* ohne basale Enhancer-Eigenschaften und ermöglichte dadurch die funktionelle Untersuchung autochtoner essentieller Promotorsequenzen des Targetgens *vegfr-3*. Nach Klonierung in das heterologe Promotorsystem wurde in Transfektionsexperimenten mit HMEC-1 die Aktivität von *vegfr-3(-101/-32)* untersucht und ein signifikanter, 11-14 facher Anstieg gegenüber dem Leervektor pT81 nach gemessener Luziferase-Aktivität nachgewiesen (Abb. 5C). Auf diese Weise konnte diesem Minimalbereich eine wesentliche Enhancer-Funktion durch Transaktivierung zugewiesen werden und für weiterführende Untersuchung als Grundlage für die Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des *vegfr-3* Promotors dienen.

A



B



C

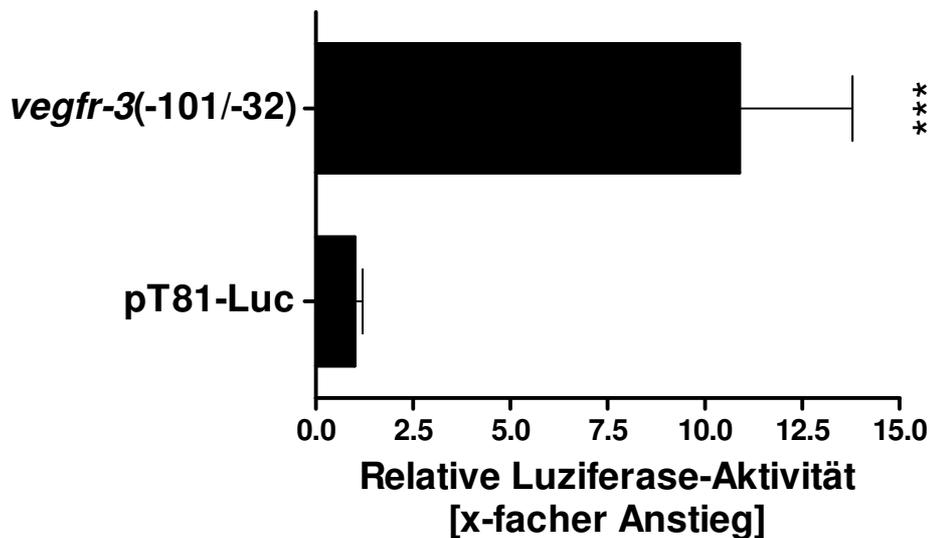


Abb. 5: Funktionelle Bereiche des *vegfr-3* Promotors

(A) In transienten Transfektionsexperimenten wurden HMEC-1 Zellen mit gleichen Mengen DNA (400ng) in einer Serie mit 5'-Deletionskonstrukten des *vegfr-3* Promotors transfiziert und als x-facher Anstieg der Luziferase-Aktivität gegenüber dem pGL3-Leervektor dargestellt. Die für jedes Reporter-genkonstrukt ermittelte Luziferase-Aktivität wurde mit der Aktivität des jeweils kürzeren 5'-Deletionskonstrukts verglichen und mittels Student's t-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede bezogen auf pGL3 ausgewertet (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). (B) Im Rahmen der 5'-Deletionsanalyse wurde *vegfr-3(-101/-32)* als erweitertes Minimalelement ermittelt und als synthetisches Oligonukleotid in das heterologe Promotorsystem pT81-Luc subkloniert. Die Sequenzanalyse ergab einen GC-Gehalt von 89% sowie der Abgleich der Datenbank TRANSFAC[®] Consensus-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der Zink-Finger-Familie im Bereich der GC-Boxen I-III. (C) Die Subklonierung des Minimalelements sowie transiente Transfektion von *vegfr-3(-101/-32)* in HMEC-1 Zellen zeigte einen signifikanten Anstieg der Luziferase-Aktivität mittels Student's t-Test gegenüber dem Leervektor pT81 (***) ($P < 0,001$), dessen Luziferase-Aktivität in der Darstellung gleich 1 gesetzt wurde

3.3 Feinanalyse der *vegfr-3* Promotorsequenz

In den nachfolgenden Untersuchungen wurde das DNA-Bindungsverhalten der für die Transkriptionsregulation entscheidenden Proteine für das Minimalelement ermittelt. Nach Analyse der Sequenz und Ermittlung eines GC-Gehalts des Minimalelements von 89% wurden EMSA-Studien durchgeführt, in denen nukleäre Proteinextrakte von HMEC-1 Zellen mit radioaktiv markierten Sonden inkubiert wurden, die nach sorgfältiger Sequenzanalyse synthetisiert worden waren. Die ersten Bindungsstudien wurden mit Sonde A [*vegfr-3(-101/-32)*] durchgeführt, die dem in der 5'-Deletionsanalyse identifizierten Minimalelement des *vegfr-3* Promotors entsprach. Außerdem wurden die zwei zusammenhängenden Sonden B [*vegfr-3(-101/-66)*] und C [*vegfr-3(-65/-32)*]

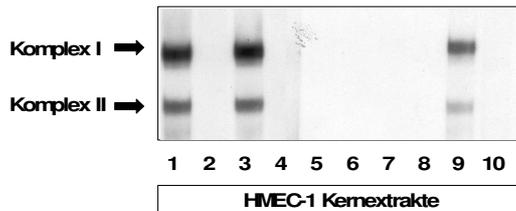
konstruiert, die aus einer Halbierung des Promotorminimalelementes entstanden sowie drei weitere Sonden D [*vegfr-3*(-104/-85)], E [*vegfr-3*(-84/-63)] und F [*vegfr-3*(-62/-32)], die aus einer Drittelung von Sonde A resultierten. Diese Unterteilung der Gesamtsequenz sollte eine möglichst genaue weitere Eingrenzung kritischer Bindungsbereiche des *vegfr-3* Promotors ermöglichen. Bei der Konstruktion der Sonden wurden bei der Unterteilung der Teilsonden Bindungsstellen aus der Datenbank berücksichtigt, so dass es sich nicht um mathematische, sondern um funktionelle Teilungen bzw. Drittelungen handelte. In der folgenden Darstellung wurde auf eine nähere Betrachtung von Sonde F [*vegfr-3*(-62/-32)] verzichtet, da diese im Sequenzbereich von Sonde C [*vegfr-3*(-65/-32)] lag und in den durchgeführten Untersuchungen das gleiche Bindungsverhalten zeigte. In zwei aufeinanderfolgenden Schritten wurden alle Teilsonden zunächst in ihrem Bindungsverhalten untersucht. Anschließend wurden in einem zweiten Schritte alle vorhandenen Teilsonden der Gesamtsequenz durch das Gesamtfragment Sonde A in Verdrängungs-Assays untersucht und die Verdrängungsmuster ermittelt. Die Inkubation der Gesamtsonde A zeigte die Bildung von zwei DNA-Protein-Komplexen (Abb. 6A, Bahn 1), die sich im 200-fach molaren Überschuss mit dem Verdrängungs-Oligonukleotid aufheben ließen und somit als spezifisch zu bewerten waren (Abb. 6A, Bahn 2). Durch Halbierung der Gesamtsonde blieb die Ausbildung der zwei Protein-Komplexe nur bei Inkubation der 5'-Hälfte als Sonde B (Abb. 6A, Bahn 3) erhalten, während Sonde C als 3'-Hälfte keine Proteinbindung zeigte (Abb. 6A, Bahn 5). Dieses Bindungsverhalten ließ sich unter Einsatz der Teilsonden aus der Drittelung untersuchen. Während bei Inkubation von Teilsonde D keine Proteinbindung nachzuweisen war (Abb. 6A, Bahn 7), wurde die Ausbildung der Banden bei Teilsonde E nur abgeschwächt detektiert (Abb. 6A, Bahn 9). Die Verwendung von Sonde F führte zu keiner Bindung von Kernextrakten. Es wurde gezeigt, dass ein Teil der radioaktiv markierten Sonden ein spezifisches DNA-Kernproteinmuster ausbildete, ein anderer Teil der Sonden jedoch mit den extrahierten Proteinen keine Bindung einging. Im anschließenden Teil sollte nun das Verdrängungsverhalten aller Sonden dargestellt werden um zu überprüfen, ob Sonden ohne Kernproteinbindung auch kein Verdrängungspotential besitzen, um durch diesen Umkehrschritt das Bindungspotential einer Sonde endgültig zu verifizieren oder auszuschließen. Hierzu wurde das Gesamtelement als korrespondierende Sonde A [*vegfr-3*(-101/-32)] radioaktiv markiert und unter Verwendung aller Oligonukleotide

inkubiert und nach elektrophoretischer Auftrennung detektiert. Während Sonde A [*vegfr-3(-101/-32)*] erwartungsgemäß zu Verdrängung beider Komplexe führte (Abb. 6B, Bahn 2), führte auch die Inkubation mit Sonde B [*vegfr-3(-101/-66)*] als 5'-Hälfte von Sonde A zur kompletten Verdrängung (Abb. 6B, Bahn 3). Die Sonden C [*vegfr-3(-65/-32)*] (Abb. 6B, Bahn 7) und D [*vegfr-3(-104/-85)*] (Abb. 6B, Bahn 8) zeigten kein Verdrängungspotential. Die Sonde E [*vegfr-3(-84/-63)*] (Abb. 6B, Bahn 9) dagegen zeigte nur eine Verdrängung des oberen Komplexes, während der untere Komplex trotz Verdrängungs-Oligonukleotid im elektrischen Feld lief und somit detektiert werden konnte. Die weiterführenden Untersuchungen sollten nun die Sonden B [*vegfr-3(-101/-66)*] und E [*vegfr-3(-84/-63)*] weiter charakterisieren. Hierzu wurden Mutanten mit kurzen repetitiven Nukleotid-Alterationen beider Oligonukleotide synthetisiert (Tab. 5) und nach Inkubation mit Sonde A [*vegfr-3(-101/-32)*] in Hinblick auf Ihr Verdrängungsmuster detektiert. Die Mutanten der Sonde B [*vegfr-3(-101/-66)*] enthielten entweder Mutationen im 5'-Bereich (Mut1), im 3'-Bereich (Mut2) oder in beiden Bereichen (Mut3) der Sequenz. Während Mut1 (Abb. 6B, Bahn 4) und Mut2 (Abb. 6B, Bahn 5) beide zur Verdrängung des oberen Komplexes führten, war unter Verwendung von Mut3 als Oligonukleotid keine Verdrängung möglich (Abb. 6B, Bahn 6). Die eingebrachte Mutation in das Oligonukleotid und Inkubation mit Sonde E [*vegfr-3(-84/-63)*] Mut1 führte zu keiner Verdrängung eines der beiden Proteinkomplexe (Abb. 6B, Bahn 10). Es wurde gezeigt, dass Sonde A [*vegfr-3(-101/-32)*] und Sonde B [*vegfr-3(-101/-66)*] in Bindung der nukleären Proteine und im Verdrängungspotential ein gleiches Verhalten zeigten, während Sonde E [*vegfr-3(-84/-63)*] nur eine Teilaktivität besaß. Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollte nun anschließend die Funktionalität und das Transaktivierungspotential der Sequenzbereiche vertiefend untersucht werden, die sich in als anzunehmend identisch darstellen ließen. Da sich Sonde E [*vegfr-3(-84/-63)*] als struktureller Teil von Sonde B [*vegfr-3(-101/-66)*] auch in der Bindung als teilaktiv zeigte, wurden in den nachfolgenden Untersuchungen vorzugsweise Sonde A [*vegfr-3(-101/-32)*] und Sonde B [*vegfr-3(-101/-66)*] verglichen. Hierzu wurden die im EMSA eingesetzten Sonden als Oligonukleotide in das heterologe Promotorsystem pT81 subkloniert. In den Transfektionsuntersuchungen der Reportergenkonstrukte konnte gezeigt werden dass es in Hinblick auf die Enhancer-Funktion keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Minimalelement *vegfr-3(-101/-32)* und dem Teilelement *vegfr-3(-101/-66)* gab

(Abb. 5C), jedoch einen entsprechenden signifikantern Unterschied beider Konstrukte gegenüber dem Leervektor (***) ($P < 0,001$). Dieser Schritt ließ eine weitere Eingrenzung des Minimalbereichs auf die Sequenz zwischen -101 und -66 zu, weil es sowohl in Bezug auf die Kernproteinbindung als auch in Bezug auf die funktionelle Aktivität keinen Unterschied zwischen beiden Gensequenzen von *vegfr-3* gab. Alle weiteren Untersuchungen zur Identifikation bindender Transkriptionsfaktoren wurden mit dem neuen Minimalelement *vegfr-3(-101/-66)* durchgeführt. Zusätzlich wurden Oligonukleotide in das Promotorsystem pT81 subkloniert, bei denen einzelne oder alle GC-Boxen durch Basenaustausch selektiv mutiert waren. Diese Reporterengenkonstrukte wurden in HMEC-1 Zellen transient transfiziert und hinsichtlich signifikanter Aktivitätsabnahmen in Bezug auf das Gesamtelement mit dem Student's t-Test ausgewertet. Die funktionellen Untersuchungen bestätigten, dass ein Verlust von GC-Box III zu keinem signifikanten Verlust der Aktivität des *vegfr-3* Promotors führt, was in Korrelation zu den Bindungsstudien stand. Der Mutation der distalen GC-Box (GC-Box I) folgte ein Verlust der Aktivität auf die Hälfte, während eine Mutation der proximalen GC-Box (GC-Box II) zu einem Aktivitätsverlust auf etwa ein Drittel der Ausgangsaktivität führte. Eine gleichzeitige Mutation der GC-Boxen I und II zeigte einen nahezu kompletten Verlust der Promotoraktivität im heterologen Promotorsystem pT81 bezogen auf den Leervektor.

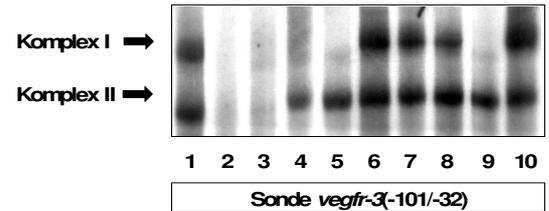
A

Sonde <i>vegfr-3</i> (-101/-32)	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Sonde <i>vegfr-3</i> (-101/-66)	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Sonde <i>vegfr-3</i> (-65/-32)	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Sonde <i>vegfr-3</i> (-104/-85)	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Sonde <i>vegfr-3</i> (-84/-63)	-	-	-	-	-	-	-	+	+
100x <i>vegfr-3</i> (-101/-32)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
100x <i>vegfr-3</i> (-101/-66)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
100x <i>vegfr-3</i> (-65/-32)	-	-	-	-	-	+	-	-	-
100x <i>vegfr-3</i> (-104/-85)	-	-	-	-	-	-	-	+	-
100x <i>vegfr-3</i> (-84/-63)	-	-	-	-	-	-	-	-	+



B

100x <i>vegfr-3</i> (-101/-32)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
100x <i>vegfr-3</i> (-101/-66)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
100x <i>vegfr-3</i> (-101/-66) Mut 1	-	-	-	+	-	-	-	-	-
100x <i>vegfr-3</i> (-101/-66) Mut 2	-	-	-	-	+	-	-	-	-
100x <i>vegfr-3</i> (-101/-66) Mut 3	-	-	-	-	-	-	+	-	-
100x <i>vegfr-3</i> (-65/-32)	-	-	-	-	-	-	-	+	-
100x <i>vegfr-3</i> (-104/-85)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
100x <i>vegfr-3</i> (-84/-63)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
100x <i>vegfr-3</i> (-84/-63) Mut 1	-	-	-	-	-	-	-	-	+



C

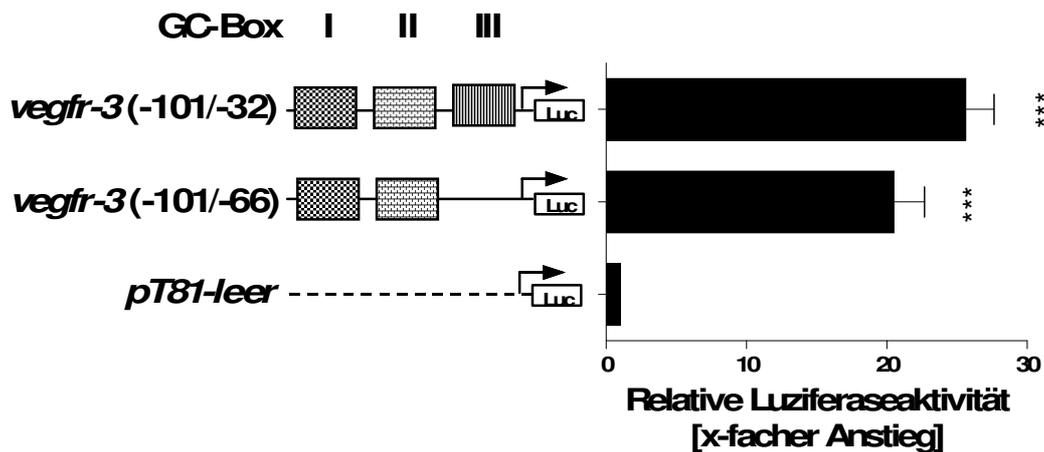


Abb. 6: Bindung von zwei Proteinkomplexen an das *vegfr-3* Promotorminimalelement und an Teilelemente sowie funktionelle Untersuchung des Minimalelements

EMSA-Bindungsstudien wurden mit ³²P-markierten doppelsträngigen DNA-Sonden durchgeführt, die dem Minimalelement und seinen Teilelementen entsprachen. **(A)** Gesamtsonde (Bahn 1) und Teilsonden (Bahnen 3, 5, 7 und 9) wurden mit nukleären Proteinenextrakten von HMEC-1 Zellen inkubiert und auf einem nativen TBE-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Zur Verifizierung eines spezifischen Bandenmusters wurde jede Sonde mit einem 200-fach molaren Überschuss des entsprechenden Verdrängungs-Oligonukleotids inkubiert und neben die jeweilige Sonde aufgetragen (Bahnen 2, 4, 6, 8, 10). **(B)** Alle vorhandenen Teilsonden wurden als Verdrängungs-Oligonukleotid gegen die Gesamtsonde *vegfr-3*(-101/-32) eingesetzt und die Proteinbindung im Gel aufgetrennt. Zusätzlich wurden in dieser Kompetitionsstudie die zielgerichtet mutierten Oligonukleotide von *vegfr-3*(101/-66) zur Verdrängung der Gesamtsonde eingesetzt, um den Aktivitätsverlust der Mutanten neben dem Bindungs- auch im Verdrängungsmuster zu bestätigen. **(C)** HMEC-1 Zellen wurden transient mit dem Gesamtelement *vegfr-3*(-101/-32) sowie dem 5'-Teilelement *vegfr-3*(-101/-66) im heterologen Promotorsystem pT81 transfiziert und die Luziferase-Aktivität ermittelt. Unter Verwendung des Student's t-Test konnte ein signifikanter Unterschied beider Konstrukte gegenüber dem Leervektor ermittelt werden (***) P<0,001), jedoch nicht zwischen beiden Konstrukten untereinander.

3.4 Regulation des *vegfr-3* Promotors durch Sp1/Sp3

Nachdem in Bindungsstudien und funktionellen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass der kritische Promotorbereich für die basale Regulation der *vegfr-3* Expression die Sequenz *vegfr-3*(-101/-66) war, sollten im Rahmen folgender Bindungsstudien die an die Sequenz bindenden Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Durch den Abgleich mit der Datenbank TRANSFAC[®] wurde eine Reihe potentiell bindender Transkriptionsfaktoren ermittelt und hinsichtlich biologischer Relevanz ausgewertet. Dabei fiel die Auswahl auf die Transkriptionsfaktoren Sp1, Ap2 α , Egr-1 und c-Myc. Anschließend wurden doppelsträngige Oligonukleotide synthetisiert und hybridisiert, die den Consensus-Bindungssequenzen für die ausgewählten Transkriptionsfaktoren entsprachen. Die Consensus-Oligonukleotide wurden in 100-fach molarem Überschuss in EMSA-Kompetitionsstudien mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde *vegfr-3*(-101/-66) inkubiert und zur Verdrängung eingesetzt. Als Kontrolle für die Spezifität der Bindung der Consensus-Oligonukleotide diente jeweils ein in der Sequenz mutiertes Oligonukleotid, wodurch die Verdrängung verhindert wurde. Bezogen auf die Kontrolle (Abb. 7A, Bahn 1) konnte eine vollständige Verdrängung der Komplexe I und II durch Einsatz des Sp1-Consensus-Oligonukleotids erreicht werden (Abb. 7A, Bahn 3), welche unter Verwendung eines entsprechend mutierten Sp1-Oligonukleotids ausblieb. Ebenfalls als spezifisch zu bewerten war die Verdrängung beider Proteinkomplexe durch das Ap2 α -Consensus-Oligonukleotid (Abb. 7A, Bahn 5) und gleichzeitig ausbleibende Verdrängung bei entsprechend mutiertem Ap2 α -Oligonukleotid (Abb. 7A, Bahn 6). Eine Verdrängung des *vegfr-3* Promotorelements aus der Bindung durch Egr-1 bzw. c-myc-Consensus-Oligonukleotide konnte nur geringfügig (Abb. 7A, Bahn 7) bzw. überhaupt nicht nachgewiesen werden (Abb. 7A, Bahn 9). Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden Supershift-Assays mit spezifischen Antikörpern gegen Sp1, Ap2 α , Egr-1 und c-myc durchgeführt. Im Rahmen dieser Supershift-Analysen konnten die Ergebnisse aus den Kompetitionsassays insofern bestätigt werden, als dass ein eindeutiger Supershift von Komplex I durch Zugabe des Sp1-Antikörpers (Abb. 7B, Bahn 3) im Vergleich zur Referenz (Abb. 7A, Bahn 1) detektiert werden konnte. Unter Verwendung von Antikörpern gegen Ap2 α , Egr-1 und C-myc konnte jedoch kein Supershift beobachtet werden (Abb. 7A, Bahnen 7, 8 und 9). In Anbetracht des eindeutigen Nachweises von

Sp1 als Transkriptionsfaktor lag der Schluss nahe, die *vegfr-3* Promotorsequenz hinsichtlich weiterer Vertreter aus der Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren zu untersuchen. Diese umfasst einige strukturell und funktional sehr nahe verwandte Zink-Finger-Proteine (107;108), die in der Lage sind, mit unterschiedlich hoher Affinität an die gleichen DNA-Sequenz zu binden. Zu diesen Vertretern zählen neben Sp1 auch Sp3 und Sp4. Zur Identifizierung der Sp-Faktoren wurden in Supershift-Analysen zusätzlich Antikörper gegen Sp3 und Sp4 eingesetzt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde gezeigt, dass neben Sp1 (Komplex I) auch ein Sp3-Supershift (Komplex II) an der Promotorsequenz herbeizuführen war (Abb. 7B, Bahn 4) und der gleichzeitige Einsatz von Antikörpern gegen Sp1 und Sp3 zum nahezu vollständigen Shift beider Komplexe führte (Abb. 7B, Bahn 5). Die Zugabe des Sp1-Antikörpers führte zur Interaktion mit nahezu allen Proteinen von Komplex I, wodurch dieser als DNA-Protein-Antikörper-Superkomplex durch ein höheres Molekulargewicht bei der Gel-Auftrennung als höhere Bande lief (*Shift*). Dagegen ging der Sp3-Antikörper eine Bindung mit dem Sp3-Protein als Antigen genau an dem Teil des Antigens ein, an dem ursprünglich die radioaktiv markierte DNA-Sonde interagiert, wobei der Komplex II durch fehlende DNA-Bindung nicht mehr detektiert werden konnte. Der gegen das Sp4-Antigen gerichtete Antikörper zeigte im Vergleich zur Referenz keinen Supershift (Abb. 7B, Bahn 6). Die mit dem Ap2 α -Oligonukleotid beobachtete Konkurrenz der Komplexe I und II (Abb. 7A, Bahn 5) konnte durch weitere Verdrängungs- und Supershiftstudien als Kreuzinteraktion mit dem Consensus-Bindungsmotiv der Sp-Familie erklärt werden. Sowohl Sp1-Consensus-Oligonukleotid als auch Ap2 α -Consensus-Oligonukleotid waren als radioaktiv markierte Sonden in der Lage, zwei gleiche Proteinkomplexe im EMSA zu bilden. Jedoch war die Intensität der Proteinbindung durch die Sp1-Sonde wesentlich höher (Abb. 7C, Bahn 1-4) als die der Ap2 α -Sonde (Abb. 7C, Bahn 5-8). Während eine Verdrängung mit 100-fach molarem Überschuss mit Ap2 α -Consensus-Oligonukleotid zu einer inkompletten Verdrängung der durch die Sp1-Sonde gebildeten Komplexe führte (Bahn 3), resultierte die Verdrängung der durch Ap2 α -Sonde gebildeten Komplexe unter Einsatz von Sp1-Consensus-Oligonukleotid vollständig (Abb. 7C, Bahn 8). Die Annahme, dass an beiden Sonden Sp-Faktoren zu finden wären, ließ sich unter Verwendung von Sp1-Antikörpern sowohl an der Sp1-Sonde (Abb. 7C, Bahn 2) als auch an der Ap2 α -Sonde (Abb. 7C, Bahn 6) nachweisen. Jedoch konnte weder an der Sp1-Sonde noch an der Ap2 α -Sonde ein Supershift mit

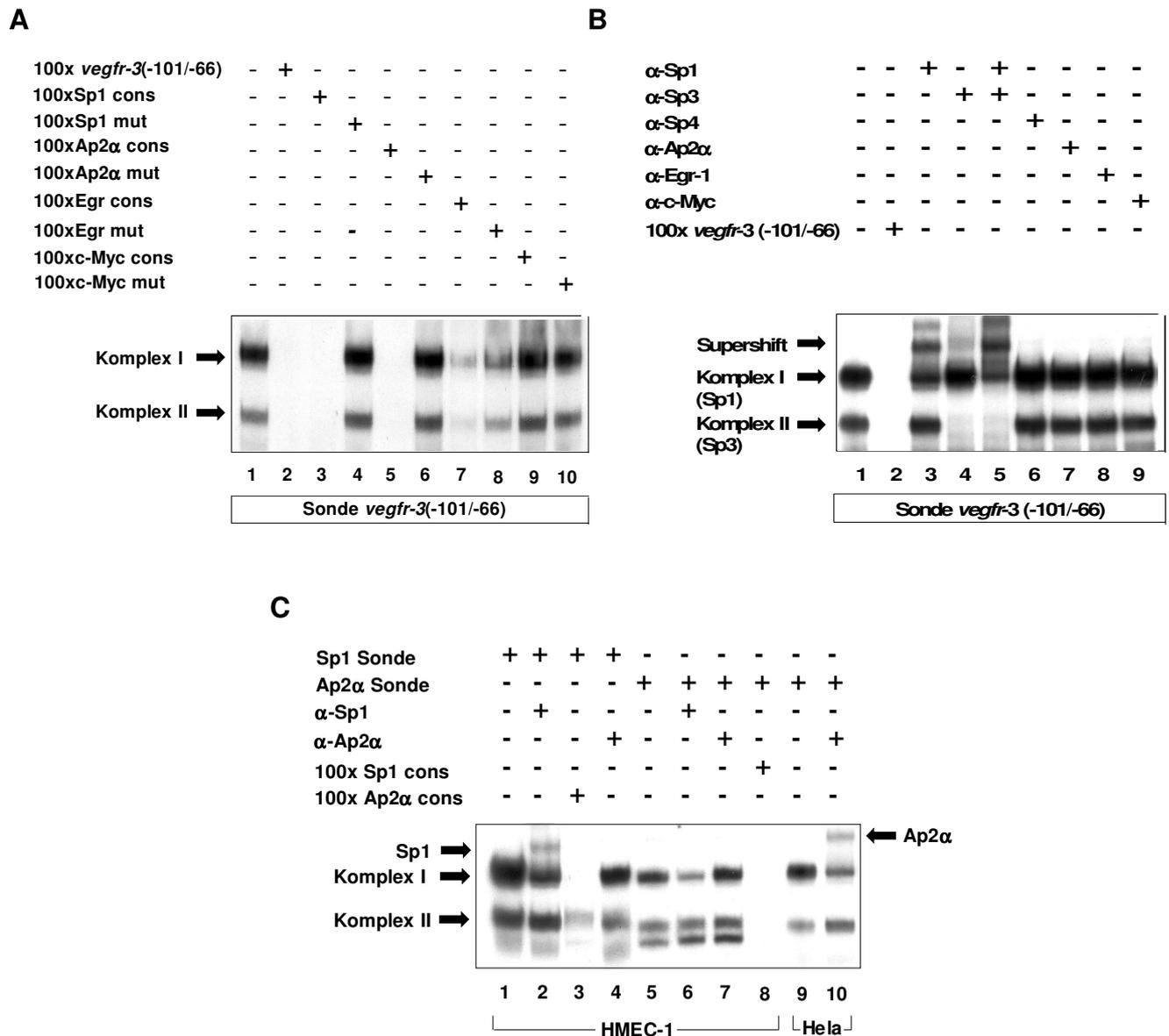


Abb. 7: Sp1 und Sp3 binden an das Promotorelement *vegfr-3(-101/-66)*

(A) Verdrängungsstudien mit nukleären Proteinen von HMEC-1 Zellen wurden mit 32 P-markierter Sonde *vegfr-3(-101/-66)* sowie Consensus- und Mutanten-Oligonukleotiden für die ermittelten potentiellen Transkriptionsfaktoren mit 100-fachen molaren Überschuss inkubiert und auf einem nativen TBE-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. (B) Zur Identifizierung der an *vegfr-3(-101/-66)* bindenden Transkriptionsfaktoren wurden Kernproteine von HMEC-1 Zellen mit der radioaktiv markierten Sonde und spezifischen Antikörpern entsprechend der Kompetitionsstudien in einem EMSA eingesetzt. (C) Zur Untersuchung einer anzunehmenden Kreuz-Interaktion zwischen der Sp1 und der Ap2α -Consensus-Sequenz wurden 32 P-markierte Sonden mit Bindungssequenzen für Sp1 (Bahnen 1-4) und für Ap2α (Bahnen 5-8) verwendet sowie mit 100-fach molarem Überschuss an Ap2α-Consensus-Oligonukleotid und Sp1-Consensus-Oligonukleotid oder Antikörpern gegen Sp1 und Ap2α inkubiert. Um den Nachweis der Funktionalität des verwendeten Ap2α-Antikörpers zu erbringen, wurden Kernproteine von Ap2α-positiven HeLa-Zellen im Supershift mit dem Antikörper untersucht.

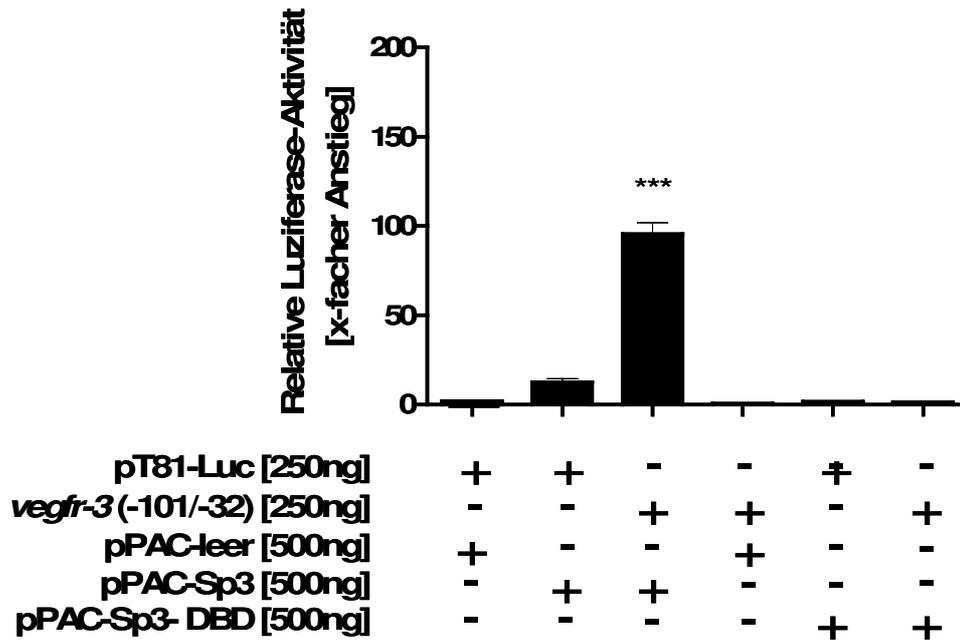
Antikörpern gegen Ap2 α -Antigen nachgewiesen werden. Um die durchgeführten Kreuzinteraktions-Assays zu verifizieren, wurde die Funktionalität des verwendeten Ap2 α -Antikörpers durch Supershift-Studien mit der Ap2 α -Sonde und HeLa-Zellen untersucht und bestätigt, die nachgewiesen positiv für die Expression von Ap2 α sind (Abb. 7C, Bahn 10) (109).

3.5 Funktionelle Untersuchungen zur Regulation des *vegfr-3* Promotors durch Faktoren des Sp-Familie

Um die erhaltenen Daten zur Beteiligung von Sp1 und Sp3 an der Regulation des *vegfr-3* Promotors in einen funktionellen Zusammenhang zu bringen, wurde das Minimalelement als Reportergenkonstrukt transient in *Drosophila melanogaster* SL-2 Zellen transfiziert. Zusätzlich wurden entsprechende Überexpressionsplasmide cotransfiziert, die für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 kodierten, und in Hinblick auf ihre Funktion als potentielle Aktivatoren des Reportergenkonstrukts ausgewertet. SL-2 Zellen zeichnen sich für diese Überexpressionsuntersuchungen dadurch aus, dass ihnen eine Vielzahl der Homologe zu mammalischen Transkriptionsfaktoren (u.a. Sp-Faktoren) fehlt und sie dadurch keinen ungewollten Einfluss auf Expressions-Analysen eines mammalischen Zellsystems besitzen. *Drosophila* SL-2 Zellen wurden mit jeweils 250ng *vegfr-3*(-101/-66) oder pT81 Leervektor im Basisansatz transfiziert. Im Rahmen dieses Assays wurden je nach Fragestellung gleiche Mengen (jeweils 500ng) an pPAC-Konstrukten in Form der pPAC Überexpressionskonstrukte von Sp1 oder Sp3, der pPAC-DNA-Bindungsdomänen (DBD)- Mutanten oder des pPAC-Leervektors zur Transfektion gleicher DNA-Mengen cotransfiziert und nach 24h geerntet. Die Transfektion des pPAC-Leervektor mit pT81-Luc wurde als Bezugsgröße für die Auswertung hinsichtlich signifikanter Aktivitätszunahmen gewählt. Im Vergleich hierzu zeigte eine Cotransfektion des Überexpressionsplasmids pPAC-Sp1 mit dem Minimalelement *vegfr-3*(-101/-66) eine hochsignifikante Aktivitätszunahme (Abb. 8A) mit einer etwa 200fachen Luziferase-Aktivität gegenüber dem Leervektor (***) P<0,001). Um eine Eigenaktivität von *vegfr-3*(-101/-66) in SL-2 Zellen auszuschließen, wurde es sowohl mit dem pPAC-Leervektor als auch mit der pPAC-Sp1 DBD- Mutante cotransfiziert. In diesem Assay zeigte sich keine signifikante Aktivitätszunahme, womit eine Eigenaktivität von *vegfr-3*(-101/-66) ausgeschlossen werden konnte. Analog zu

den Überexpressionsversuchen mit Sp1 wurden Transfektionsexperimente mit dem pPAC-Sp3 Plasmid durchgeführt, um unabhängig von mammalischen Sp-Faktoren den Einfluss von Sp3 auf das identifizierte Minimalelement des *vegfr-3* Promotors zu demonstrieren (Abb. 8B). Auch hier zeigte sich eine signifikante Aktivitätszunahme (***) $P < 0,001$) bei Kotransfektion des Überexpressionsplasmids pPAC-Sp3 mit dem Minimalelement *vegfr-3*(-101/-66), während auch hier die Eigenaktivität der Konstrukte ohne das Expressionsplasmid ausgeschlossen werden konnte. Damit ließ sich vertiefend darstellen, dass die in Bindungsstudien ermittelten Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 eine entscheidende funktionelle Relevanz für den *vegfr-3* Promotor besitzen.

A



B

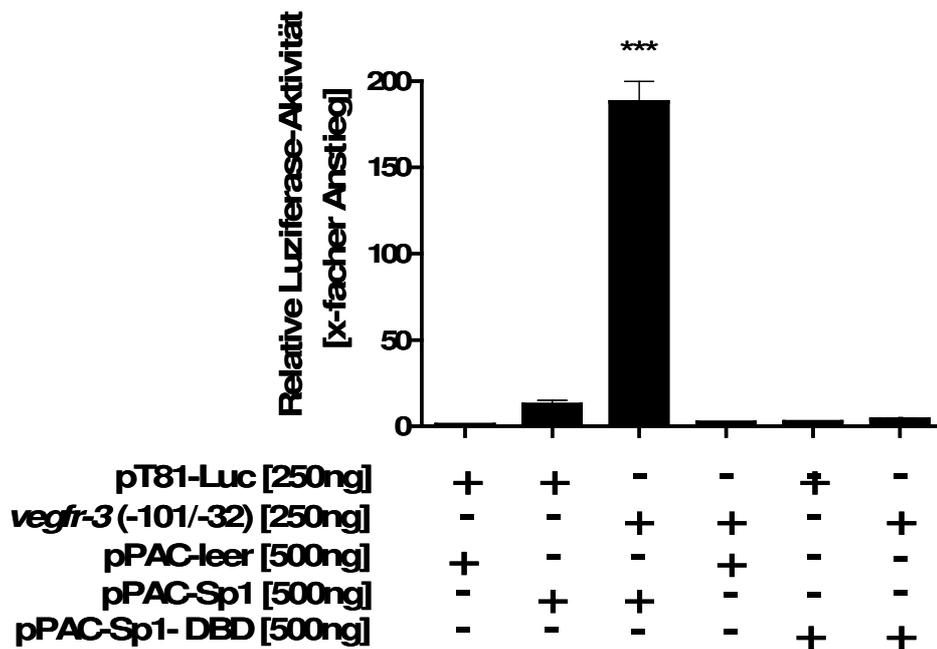


Abb. 8: Sp1 und Sp3 aktivieren den *vegfr-3* Promotor

Drosophila melanogaster SL-2 Schneider Zellen wurden mit 250ng Konstrukt *vegfr-3*(-101/-66) oder Leervektor pT81-Luc sowie 500ng Expressionskonstrukt für Sp1 (A) oder Sp3 (B) bzw. pPAC-Leervektor oder pPAC-DBD Mutanten-Vektor transfiziert und nach 24 h geerntet. Die Luziferase-Aktivität wurde als x-facher Anstieg bezüglich der mit pPAC transfizierten Kontrollen von pT81-Luc berechnet und mittels Student's t-Test ausgewertet (***) P<0,001).

3.6 Untersuchungen zur Proteinbindung mutierter Oligonukleotide im EMSA

Um zu untersuchen, inwiefern eine Mutation der Consensus-Bindungssequenz des *vegfr-3* Promotorelements einen Einfluss auf das Bindungsverhalten regulatorischer Kernproteine besitzt, wurden in Ergänzung zu den EMSA-Studien (Abb. 7) Supershift-Analysen mit der Serie von mutierten Promotorfragmenten durchgeführt. Dabei wurden die Teilsonden B [*vegfr-3(-101/-66)*] Mut 1, Mut 2 und Mut 3 mit zielgerichteten Mutationen der GC-Boxen I und/oder II mit HMEC-1 Zellen und Antikörpern gegen Sp1 und Sp3 inkubiert und nach Auftrennung im Gel detektiert. Im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 9, Bahn 1) zeigte das Bandenmuster der Teilsonde B [*vegfr-3(-101/-66)*] Mut 1 mit einer geringeren Anzahl potentieller Bindungsstellen erwartungsgemäß quantitativ weniger Bindung (Abb. 9, Bahn 2), dennoch war die Ausbildung beider Komplexe und Supershifts von Sp1 (Abb. 9, Bahn 4) und Sp3 (Abb. 9, Bahn 5) sowie in Kombination (Abb. 9, Bahn 6) zu beobachten. Die Verwendung der Teilsonde B [*vegfr-3(-101/-66)*] Mut 2 zeigte ebenfalls eine Formation der Komplexe I und II, die jedoch wie bei der Teilsonde B [*vegfr-3(-101/-66)*] Mut 1 abgeschwächt in der Ausprägung der Bindung war (Abb. 9, Bahn 7). Die Supershifts mit Antikörpern gegen Sp1 (Abb. 9, Bahn 9) und Sp3 (Abb. 9, Bahn 10) konnten auch unter Verwendung von Teilsonde B [*vegfr-3(-101/-66)*] Mut 2 nachgewiesen werden. Eine Bindung von Proteinen unter Verwendung von Teilsonde B [*vegfr-3(-101/-66)*] Mut 3 mit selektiver Mutation aller identifizierten GC-Boxen war erwartungsgemäß nicht zu beobachten (Abb. 9, Bahn 12).

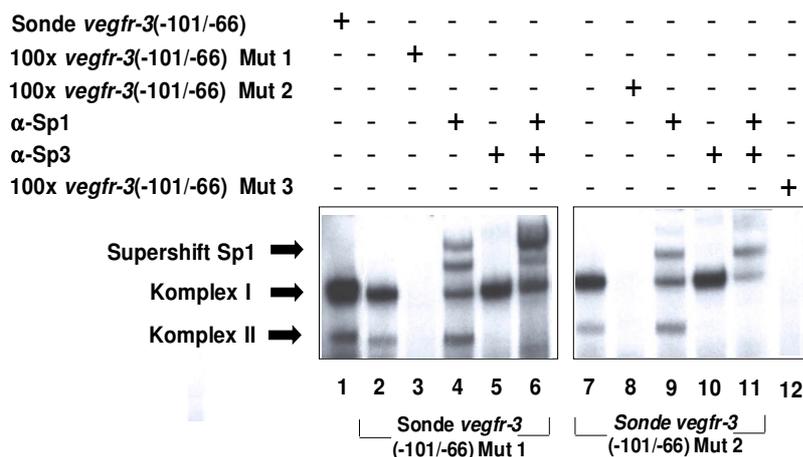


Abb. 9: : Bindungsverhalten der Mutanten von *vegfr-3(-101/-66)*

Supershift-Assays wurden mit nukleären Proteinextrakten von HMEC-1 und spezifischer Antikörper gegen Sp1 und Sp3 durchgeführt. Dargestellt ist der Einfluss einer zielgerichteten Mutation von GC-Box I in Sonde *vegfr-3(-101/-66)* Mut 1 und GC-Box II I in Sonde *vegfr-3(-101/-66)* Mut 2 auf die Bindung der Sp-Faktoren.

3.7 Supershift-Assays in *vegfr-3* RNA exprimierenden Zelllinien

Nachdem zu Beginn sowohl mittels RT-PCR (Taqman[®]) die mRNA-Menge an *vegfr-3*-Transkript als auch die basale Reporterogenaktivität in einer Auswahl verschiedener Zelllinien bestimmt worden war (Abb. 3), sollte in der folgenden Untersuchung die basal *vegfr-3* exprimierenden Zelllinien HMEC-1, HUVEC und HPMEC in Hinblick auf ihre Bindung der identifizierten Faktoren Sp1 und Sp3 untersucht werden, um Unterschiede zwischen den Zelllinien herauszuarbeiten. Zur weiteren Charakterisierung wurden nukleäre Proteinextrakte der drei Zelllinien mit der radioaktiv markierten Sonde *vegfr-3*(-101/-66) sowie mit Antikörpern gegen Sp1 und Sp3 inkubiert und aufgetrennt. Die eingesetzte Menge an Kernproteinen sowie die molare Masse an radioaktiver Sonde waren bei allen drei Zellsystemen im Ansatz gleich. In HMEC-1 Zellen mit höchster basaler *vegfr-3* RNA-Expression und Luziferase-Aktivität von *vegfr-3*(-101/-66) konnte quantitativ die meiste Bindung von Kernproteinen sowohl an der Sonde (Abb. 10, Bahn 1) als auch im Supershift-Komplex von Sp-Faktoren, vorzugsweise von Sp3, (Abb. 10, Bahnen 2-4) nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass basal die Zellen mit der niedrigsten nachweisbaren *vegfr-3* mRNA-Expression, HPMEC-Zellen, quantitativ dennoch fast die gleiche Bindungsintensität von nukleären Proteinen zeigten wie die HMEC-1 -Zellen mit der höchsten Expression (Abb. 10, Bahnen 5-8). Dagegen war die Kernproteinbindung von HUVEC-Zellen, die auf RNA Ebene nahezu die Hälfte der Expression der HMEC-1 Zellen aufwiesen, deutlich am geringsten ausgeprägt, die sich sowohl an der Sonde als auch in den Sp-Supershifts beobachten ließ (Abb. 10, Bahnen 9-12).

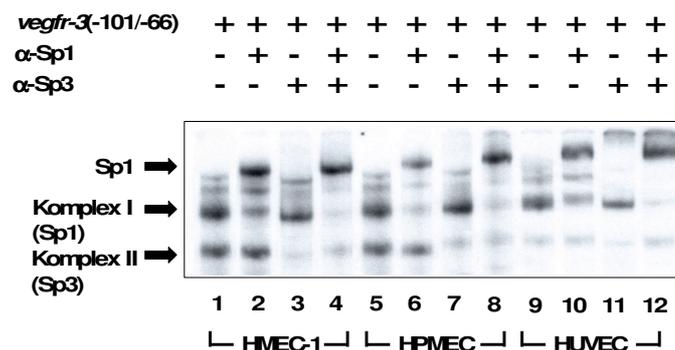


Abb. 10: Supershift-Analyse der Sp-Faktoren in den *vegfr-3* exprimierenden Zelllinien

Drei Zelllinien mit unterschiedlich hoher basaler Expression für die RNA des *vegfr-3* Gens (Abb. 2) wurden hinsichtlich ihrer quantitativen Bindung von Kernproteinen untersucht. Die eingesetzte Menge an Kernproteinen sowie die molare Masse an radioaktiver Sonde waren bei allen drei Zellsystem gleich.

4 Diskussion

4.1 Identifikation der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3

Während die biologische Bedeutung von VEGFR-3 für physiologische Schritte der Lymphangiogenese (8;49;50) sowie für Tumorgenese (63) und lymphonodale Metastasierung (69) in vielen Studien gezeigt wurde, sind bisher nur wenige Details der molekularen, insbesondere strukturellen und funktionellen Charakteristika identifiziert worden (94). Die kontroverse Diskussion der Ergebnisse über die Assoziation von VEGFR-3 mit Hämangiogenese (87) machen weiterführende Untersuchungen über molekulare Eigenschaften von VEGFR-3 unabdingbar. Die Charakterisierung der transkriptionellen Regulation des humanen *vegfr-3* Gens zur Identifizierung der molekularen, strukturellen und funktionellen Mechanismen von VEGFR-3 ist damit bedeutungsvoll für ein besseres Verständnis von Gen und Rezeptor und soll eine bessere physiologische und pathobiologische Einordnung des Gens ermöglichen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen basale transkriptionelle Regulationsmechanismen der Genexpression von *vegfr-3*. Mit Sp1 und Sp3 aus der Familie der Zinkfinger-bindenden Proteine wurden erstmals Transkriptionsfaktoren für die Regulation des *vegfr-3* Gens beschrieben. Die Bindung erfolgt über zwei als essentiell identifizierte GC-reiche Elemente im Sequenzbereich zwischen -101 und -66 am proximalen Promotor und ist schematisch in Abb. 9 dargestellt.

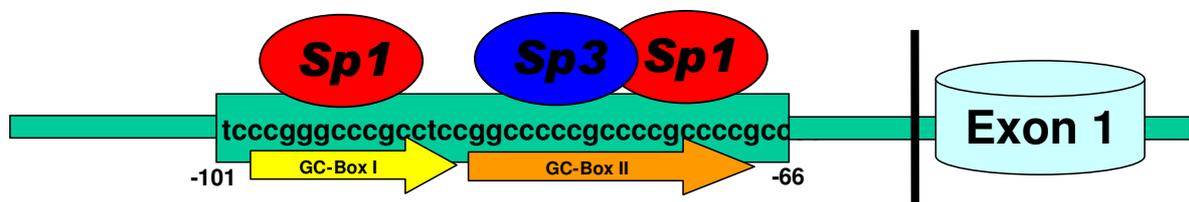


Abb. 11: Molekulare Regulation des *vegfr3*-Gens durch Sp1 und Sp3 zwischen -101 und -66 basierend auf den Untersuchungen dieser Arbeit

Obwohl Sp1 und Sp3 als konstitutionell exprimierte Transkriptionsfaktoren betrachtet wurden, ist ihre Rolle als Regulationsfaktoren in einer Vielzahl biologischer Prozesse demonstriert worden, darunter für Differenzierung und Wachstum sowie Beteiligung an der Regulation von Tumorgenese und der Progression von Tumoren (110). Die transkriptionelle Regulation durch Sp-Faktoren wurde in dieser Arbeit für *vegfr-3* nachgewiesen. Damit konnte die Beteiligung von Sp1 und Sp3 an der Regulation eines essentiellen Gens der Lymphangiogenese gezeigt werden. Die Beteiligung an einem Gen der Lymphangiogenese wurde bereits mit VEGFR-2 (111;112) aus der VEGFR-Familie und für VEGF-C nachgewiesen (113). Ergänzend zu diesen Daten wurde die Beteiligung von Sp1 an der Regulation des *bcl-x* Gens, einem Mitglied aus der *bcl-2* Genfamilie, beschrieben, dessen Expression während der Entwicklung des lymphatischen Systems Apoptose vorzugsweise von Lymphendothelien reguliert (114). Die Beteiligung von Sp1 und Sp3 an der Regulation der Lymphangiogenese-Gene VEGF-C (113), VEGFR-2 (111;112) und VEGFR-3 sowie an der Kontrolle des lymphangioendothelialen Apoptose-Gens *bcl-x* unterstreicht den biologischen Zusammenhang der Transkriptionsfaktoren mit dem lymphatischen System. Mit VEGFR-1 (115), VEGF-A (106;116) und *Fibroblast Growth Factor* (FGF) (117;118) wurde Sp1 in der Regulation von Genen beschrieben, die im Mittelpunkt von Angiogenese stehen. Neben Genen, die unmittelbar mit Lymphangiogenese und Hämangiogenese assoziiert sind, wurde in vorausgegangenen Studien Sp1 als Transkriptionsfaktor identifiziert, der essentiell für die Regulation von Mechanismen der Tumorgenese und wachstumsregulierender Gene ist (119). Zu den Vertretern zählen *Epidermal Growth Factor* (EGF) -Rezeptor (120), *Transforming Growth Factor* (TGF)- α (121), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) -Rezeptor (122), Thymidin-Kinase (123), *Insulin-like Growth Factor Protein* (IGF)-2 (124) und *Serum Response Factor* (SRF) (125), die Schlüsselfaktoren für die Zellproliferation und Zellwachstum sind. Des Weiteren sind vor diesem Hintergrund *Bcl-2* (126), *Bcl-x* (114) und *Survivin* (127) als essentielle Gene für Zellüberleben und Apoptose-Resistenz sowie Matrix-Metalloproteinase (MMP) -2 (128) und *urokinase-type Plasminogen Activator* (uPA) (129) als regulative Proteine für die Zellinvasion identifiziert worden, an deren Regulation Sp1 beteiligt ist. In dieser Arbeit wurde eine gemeinsame Regulation durch Sp1 und Sp3 für VEGFR-3 beschrieben, die auch für HGF- Rezeptor (122), MMP-2 (128), FGF (117;118) sowie VEGF-A (106;116), VEGFR-1 (115) und VEGFR-2

(111;112) gezeigt wurde. Der Nachweis der Sp-Faktoren als essentielle Transkriptionsfaktoren für VEGFR-3 und eine Vielzahl weiterer wachstumsregulierender Gene verdeutlicht die Bedeutung für wachstumsterminierende Mechanismen. Als wesentlicher wachstumsregulierender Prozess ist vor diesem Hintergrund die Tumorgenese hervorzuheben, deren molekulare Mechanismen in den Vordergrund wissenschaftlicher Untersuchungen gerückt sind.

4.2 Sp-Faktoren in der Tumorgenese

Im Rahmen von Genexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass eine signifikant vermehrte Expression von Sp-Faktoren unmittelbar während der Tumorgenese nachweisbar ist (63;130-133). In dieser Arbeit ist eine Beteiligung von Sp1 und Sp3 an der Regulation des *vegfr-3* Gens demonstriert worden, das ebenfalls mit verschiedenen pathogenetischen Prozessen der Tumorgenese assoziiert wurde (63). In verschiedenen Studien konnte eine veränderte Expression von Sp1 und Sp3 in gastrointestinalen Tumoren nachgewiesen werden. Im Magenkarzinom wurde eine Überexpression von Sp1 gezeigt (132;133). Im kolorektalen Karzinoms war Sp1 vermehrt exprimiert verglichen mit Normalgewebe (130). Darüber hinaus korrelierte eine erhöhte Expression von VEGF-A in Pankreaskarzinom-Zellen mit einer Überexpression von Sp1 (134). Äquivalent zu den Ergebnissen dieser Arbeit für VEGFR-3 wurde in Leberzellkarzinom - Zellen für CYP3A7 eine Induktion der Expression sowohl durch Sp1 als auch Sp3 gezeigt (135). Im Schilddrüsenkarzinom wurde ebenfalls eine erhöhte Expression von Sp1 im Vergleich zu gesundem Gewebe nachgewiesen (136). Die Untersuchung des Mammakarzinoms ergab eine signifikant erhöhte Expression von Sp1, während in gutartigen Läsionen der Brust keine signifikante Expression zu detektieren war (137). Ergänzend wurde in Zellen des Mammakarzinoms demonstriert, dass das mit der Tumorgenese assoziierte *Human Activator Protein* (HAP)-2 γ in seiner Expression durch Sp1 induziert wird, während durch Sp3 eine Interaktion mit den GC-reichen Elementen zur Inhibition der Expression von HAP-2 γ führt (138). Sp1 konnte auch in der Pathogenese des Glioblastoms als signifikant vermehrt exprimierter Transkriptionsfaktor identifiziert werden (139). Sowohl Sp1-mRNA als auch DNA-Bindungsaktivität von Sp1 und Sp3 waren in epithelialen Neoplasien im Vergleich zu Papillomen der Haut erhöht (140). In Zellen von Plattenepithelkarzinomen wurde eine vermehrte Expression von

Sp1 verglichen mit papillomatösen Läsionen nachgewiesen (141).

Neben der Expression der Sp-Faktoren in verschiedenen Tumorentitäten konnte eine Überexpression von Sp-Faktoren auch als negativer prognostischer Marker für das Überleben der Patienten verschiedener Tumoren beschrieben werden, indem die Sp-Faktoren zur Proliferation und Metastasierung beitragen (142). Es wurde gezeigt, dass die Sp1-Expression in soliden Tumoren direkt mit dem Tumorstadium korreliert und als prognostischer Marker für den Grad der Tumorprogression und Metastasierung dient (132-134;143;144). Im Magenkarzinom korrelierte eine Überexpression von Sp1 direkt mit dem angiogenen Potential sowie einer schlechten Prognose (132;133) und zeigte eine inverse Korrelation mit dem medianen Überleben der Patienten (132). Sp1 ist damit für das Magenkarzinom als unabhängiger molekularer Marker für die Prognose der Patienten identifiziert worden (132), für das auch VEGFR-3 als prognostischer Marker beschrieben wurde (63) und auf einen wichtigen biologischen Zusammenhang zwischen VEGFR-3 und Sp1 schließen lässt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind im Zusammenhang zu sehen mit Daten vorausgegangener Studien, in denen sowohl für Sp1/Sp3 als auch für den durch beide Faktoren transkriptionell regulierten Faktor VEGFR-3 eine Korrelation mit der Tumorgenese des Magenkarzinoms (63) und des kolorektalen Adenokarzinoms (67) demonstriert wurde. Die Beteiligung an der Regulation des lymphassozierten *bcl-x* Gens (114) und der Assoziation von VEGFR-3 mit peritumorale Lymphgefäßneubildung und lymphatischer Metastasierung (76) verdeutlichen die biologische Beziehung. Im Gegenzug hierzu wurde für VEGFR-3 eine Abnahme der Expression in Zellen des Mamma-Karzinoms gezeigt (75), während Sp1 im Mammakarzinom vermehrt nachzuweisen war (137). Die inverse Korrelation von Sp1 und VEGFR-3 mit dem Mammakarzinom lässt auf bis dato nicht identifizierte zusätzliche Expressionsmechanismen schließen.

Die Mechanismen der Überexpression von Sp-Faktoren in Tumoren sind nicht abschließend aufgeklärt, sondern bisher nur durch einzelne Beobachtungen charakterisiert worden. Außerdem bedarf es weiterer Untersuchungen, die die biologische und therapeutische Relevanz der vermehrten Expression der Sp-Faktoren einordnen. Vor diesem Hintergrund konnte gezeigt werden, dass neben der Korrelation der Expression in einzelnen Tumoren auch eine indirekte Assoziation mit Tumorgenese besteht durch Expression in Tumor-Suppressor-Genen. Die Tumor-Suppressor-Gene p53 (145), p73 (146), von Hippel-Landau (147) und Retinoblastoma-Protein (148) waren

in der Lage, durch Komplexbildung mit Sp1 die Bindung von Sp1 an den Promotor der Gene zu blockieren und damit konsekutiv die Aktivierung zu beeinflussen.

Neben ihrer Bedeutung für die Tumorbilogie sind Sp-Faktoren auch in pathogenetischen Prozessen beschrieben worden, die die Steuerung von Wachstum und Überleben vermitteln. Es wurde in densitometrischen Untersuchungen von Sp1 im Mausmodell gezeigt, dass erhöhte Proteinmengen in Kardiomyozyten verteilt auf alle Herzzäume mit Ausnahme des Septums zu finden sind, nachdem es durch Anlage von *shunts* und konsekutiver Volumenbelastung zur Entwicklung einer Herzhypertrophie kam (149). Die vermehrte Sp1-Menge ging einher mit einer Abnahme des Sp3 Menge (149).

4.3 Struktur und Bindungsverhalten der Sp-Faktoren

Die biologische Bedeutung und Funktion der Sp-Faktoren wird bestimmt durch ihre strukturellen Besonderheiten und das charakteristische Bindungsverhalten. Die identifizierten Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 aus der Familie der Sp-Faktoren sind Proteine mit GC/GT-Boxen als potentielle Bindungssequenzen, von denen als erster Sp1 beschrieben wurde (150;151). Sp1 wurde nach seiner Isolierung und Aufreinigung nach den enthaltenen Sepharyl- und Phosphozellulose-Säulen benannt (152), wird aber heute in der Literatur als *specificity protein* (Sp) 1 aufgeführt. Die Transkriptionsfaktoren der Familie der Sp-Faktoren gehören zu der Gruppe der Zink-Finger bindenden Proteine mit hochkonservierter Bindungsdomäne, zu denen neben den hier beschriebenen Sp-Faktoren die Faktoren BTEB1 (*Basic Transcription Element Binding Protein*), TIEG1 (*TGF β -Inducible Early Proteine Gene*) und TIEG2 sowie die Familie der Krüppel-Faktoren XKLF (*X-Krüppel-Like Factor*) gehören (153;154). Die Bindung der Zink-Finger bindenden Proteine wird nahe dem C-terminalen Ende sowie durch Serin-/Threonin-Reste und Glutamin-reiche Domänen im N-terminalen Bereich vermittelt. Es wurde gezeigt, dass die DNA-Bindungsdomäne drei hintereinander geschaltete ähnliche Sequenzen besitzt, die jeweils durch zwei benachbarte Cystein-Reste und ebenso benachbarte Histidin-Reste begrenzt werden. In deren Zentrum bindet gemeinsam mit den jeweiligen Seitenketten ein Zink-Ion, wodurch der definierende Zink-Finger gebildet wird (C_2-Zn-H_2) (142). Durch zweidimensionale und dreidimensionale Wechselwirkungen zwischen den Nukleotiden, den Proteinen und

dem Zink-Ion entstehen ein β -Blatt und eine α -Helix als spezifische Struktur in der Bindungsdomäne, wodurch eine für die Domäne charakteristische Rinne entsteht. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten, dass jeder der drei Zinkfinger in Sp1 drei Guanosin- bzw. Cytosin- Basen eines Strangs und entsprechend eine Base des komplementären Strangs eines GC-reichen Elements der Sequenz 5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3' erkennt und bindet (155;156). Außerdem wurde demonstriert, dass der C-terminale Zink-Finger eine reduzierte Bindungsspezifität aufweist und Sp1 eine Bindung eingeht, wenn nur zwei Basen in beiden Strängen vorhanden sind (157). Die Variabilität in der Erkennungssequenz wurde als Grundlage für das Expressionsmuster der Sp-Faktoren in verschiedenen Genen beschrieben (107;108). Vor allem Gene, die an der Regulation von Zellzyklus, Zellwachstums und Differenzierung, an apoptotischen Vorgängen und am Wachstum von Kapillaren beteiligt sind, besitzen GC-reiche Elemente für die Bindung von Sp-Faktoren (116;158-160). Diese Eigenschaft wurde in dieser Arbeit auch für GC-reiche Sequenz des lymphangiogenen *vegfr-3* Promotors und Sp1 und Sp3 gezeigt. Neben Sp1 und Sp3 sind als weitere Vertreter der Familie die Faktoren Sp2 und Sp4 zu nennen, die ebenfalls vor allem an GC-Boxen binden und je nach Gen synergistisch oder antagonistisch wirken können, jedoch an der transkriptionellen Regulation von *vegfr-3* nicht beteiligt waren. Sp1, Sp3 und Sp4 binden bevorzugt über die gleichen konservierten Aminosäureketten an die GC-Box (153;154), während Sp2 bevorzugt an GT-reiche Elemente bindet (161). Sp5 bis Sp8 zeigten eine ähnliche Struktur mit Teilsequenzen von Sp1 bis Sp4 und Deletionen des N-terminalen Endes (107;108;162). Für die unmittelbare transkriptionelle Aktivität von Sp1 wurden hydrophobe Glutamin-reiche Aktivierungsdomänen am N-terminalen Ende als verantwortlich identifiziert (163). Es wurde gezeigt, dass die synergistische Aktivität der Faktoren bei der Aktivierung eines Promotors mit mehreren GC-Boxen durch eine kurze C-terminale Domäne vermittelt wird (164).

In ihrer Funktion unterscheiden sich die Sp-Faktoren und zeigen genspezifisch und faktorspezifisch entweder einen aktivierenden oder inhibierenden Effekt auf die Promotoraktivität. Es wurde demonstriert, dass die Anzahl der funktionellen Bindungsstellen für Sp1 entscheidend dafür ist, ob Sp3 für die transkriptionelle Regulation eine aktivierende oder inhibitorische Funktion einnimmt (165). In dieser Arbeit wurde im pT81 Promotorsystem der individuelle Einfluss der GC-Boxen I und II

auf die *vegfr-3* Promotoraktivität untersucht. Es wurde gezeigt, dass ein Verlust von GC-Box I mit vorzugsweiser Bindung von Sp1- Proteinen zu einem geringeren Aktivitätsverlust führt als ein Verlust von GC-Box II, an der Sp3 bindet. Ohne eingefügte Mutation vermitteln Sp1 und Sp3 synergistisch die maximale Aktivität des Promotors. Die fehlende Bindung von Sp3 führte zu einem signifikanten Verlust der Promotoraktivität. Außerdem zeigte der *vegfr-3* Promotor, dass Sp1 und Sp3 unabhängig voneinander in *Drosophila melanogaster* SL-2 Zellen ohne Vorhandensein mammalischer Transkriptionsfaktoren den *vegfr-3* Promotor aktivieren. Es bleibt jedoch zu klären, ob diese aktivierende Funktion durch gleichzeitige Aktivität von Sp1 und Sp3 eine veränderte Funktion für *vegfr-3* besitzt. Für den *vegfr-2* Promotor zeigten Hata *et al.* eine transaktivierende Funktion für Sp1 (112). Es wurde nachgewiesen, dass der HIV-Promotor durch Bindung von Sp1 aktiviert wird, während eine Bindung von Sp3 die Promotoraktivität durch Protein-Protein Interaktion mit NF κ B hemmt (166). Der kardiale Troponin T-Gen (cTnT) Promotor enthält eine GC-Box, die durch Sp1 transaktiviert wurde, während Sp3 die Sp1-vermittelte Aktivierung dosisabhängig reduzierte und eine kompetitive Bindungskinetik aufwies (149). In Transfektionsassays mit *Drosophila melanogaster* SL2-Zellen wurde gezeigt, dass es keine funktionelle Äquivalenz zwischen Sp1 und Sp3 gibt, und es Sp3-vermittelt zu einer Repression von transkriptioneller Aktivierung durch Sp1 kommt (153;166). Obwohl verschiedene Studien gezeigt haben, dass die Überexpression von Sp3 die Transaktivierung durch Sp1 hemmt (153;165;167) oder reduziert (166;168), konnte für *vegfr-3* gezeigt werden, dass Sp3 isoliert zu einer Aktivierung des Promotors führt. Durch Suske *et al.* konnte demonstriert werden, dass Sp3 entweder als transkriptioneller Aktivator oder Repressor interagiert (107). Es wurde nachgewiesen, dass Promotoren von Genen, die nur eine Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie besitzen, vergleichsweise häufig durch Sp3 aktiviert wurden (165). Demgegenüber konnte im Fall einer transkriptionellen Inhibition durch Sp3 häufig ein spezifisches Aminosäure-Triplett zwischen der Glutamin-reichen Aktivierungsdomäne und dem ersten Zink-Finger beschrieben werden (168;169). Für Sp4 wurde in dieser Arbeit keine Beteiligung an der basalen Transkriptionskontrolle für den *vegfr-3* Promotor gezeigt. Diese Ergebnisse verdeutlichen die gewebsspezifische Expression von Sp4 *in vivo* mit Beschränkung auf bestimmte Gehirnzellen (154). In vorausgegangenen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass Sp4 wie Sp1 ein aktivierender Transkriptionsfaktor ist, der durch

Anwesenheit einer nicht-DNA-bindenden Mutante von Sp1 superaktiviert werden kann. Die Sp4-vermittelte transkriptionelle Aktivierung wurde durch Sp3 inhibiert (154).

In den endothelialen Zelllinien HMEC-1, HPMEC und HUVEC mit nachgewiesener *vegfr-3* Expression wurden Sp1 und Sp3 nachgewiesen. Diese Ergebnisse gehen einher mit den Studien von Patterson *et al.*, durch die die Bindung von Sp1 als regulativen Faktor *in vivo* als endothelzellspezifisch beschrieben wurden (170). Ähnliche Ergebnisse wurden durch Hata *et al.* im Rahmen der Analyse der transkriptionellen Regulation des *vegfr-2* Promotors gezeigt, dessen Minimalelement *vegfr-2*(-85/+296) eine 10-30fach höhere Luziferase-Aktivität in Endothelzellen gegenüber nicht-endothelialen Zellen zeigte (112). Das Verhältnis von Sp1/Sp3 war in einer Reihe untersuchter endothelialer Zelllinien größer als in allen untersuchten nicht-endothelialen Zelllinien, das in Verbindung mit der ermittelten niedrigeren Gesamtexpression für Sp1 in allen nicht-endothelialen Zelllinien die Ergebnisse von Patterson *et al.* (170) bestätigt (112). Darüber hinaus wurden Sp1 und Sp3 bereits im Rahmen der Transkriptionsanalyse des *vegfr-2* Promotors in HUVEC-Zellen als endothelspezifisch nachgewiesen (112). Eine Überexpression von Sp1 in nicht-endothelialen Zellen führt darüber hinaus zur Expression von VEGFR-2 (112). Es bleibt jedoch zu klären, ob eine Regulation von *vegfr-3* durch weitere Faktoren der Sp-Familie unter *in vitro* Bedingungen oder unter spezifischen *in vivo* Bedingungen mit Veränderungen der Gensequenz erfolgt. Außerdem ist unter diesen Bedingungen eine potentielle Bindung der untersuchten Transkriptionsfaktoren Ap2 α , Egr-1 und c-Myc erneut zu bewerten, die jedoch unter den gezeigten basalen Bedingungen keine Rolle für Regulation des *vegfr-3* Gens spielen. Ein entsprechender funktioneller Polymorphismus konnte bereits in der Tumorgenese des Glioblastoms nachgewiesen werden, bei dem durch erhöhte Expression und Aktivität von Sp1 eine um 40% erhöhte Gentranskription des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) als erhöhter Risikofaktor für die Entstehung eines Glioblastoms nachzuweisen ist (139).

4.4 Molekulare Mechanismen der Regulation durch Sp-Faktoren

Die Regulation durch Sp-Faktoren unterliegt vielfältigen Kontrollmechanismen. Ob Sp1 und Sp3 entweder als aktivierende oder inhibitorische Faktoren genspezifisch ihre Effekte ausüben, wurde auf molekularer Ebene untersucht. Für *vegfr-3* konnte in dieser

Arbeit eine aktivierende Funktion für Sp1 und Sp3 identifiziert werden, während weiterführende molekulare Mechanismen mit Blick auf vorausgegangene Studien bewertet werden.

Es wurde gezeigt, dass Sp1 als aktivierender Faktor sowohl phosphoryliert (164) als auch glykosyliert (171) vorliegen kann und in dieser Struktur in der Lage ist, durch *Looping* an der DNA multimeren Komplexe zu bilden (172). Das Sp3-Gen kodiert für drei verschiedene Isoformen des Transkriptionsfaktors (173). Während das vollständig transkribierte Protein in der Regel als Transaktivator beschrieben wurde, konnte zwei Isoformen als Inhibitoren der Genaktivität identifiziert werden (173). Diese Beobachtungen müssen jedoch im zellulären Kontext betrachtet werden und entsprechen in ihrer Biologie keinem einheitlichen Verhalten (107;173).

Es ließ sich zeigen, dass im Mittelpunkt der Signalkaskade von Sp-Proteinen die initiale Bindung an GC-reiche Promotorsequenzen proangiogener und wachstumsterminierender Gene steht (142), die in dieser Arbeit für *vegfr-3* beschrieben wurden. Anschließend erfolgte die Aktivierung transkriptioneller Areale und die subsequente Genexpression (142). Es wurde gezeigt, dass der Sp1-Promotor selbst potentielle Bindungsstellen für Sp1, Sp3, Kernfaktor Y, AP2 α und CCAAT/ *enhancer-binding* Protein besitzt (174;175). Aufgrund der Identifikation von Sp1/Sp3-Bindungsstellen im Bereich des Sp1-Promotors ist eine Autotransaktivierung des Promotors denkbar. Im Magenkarzinom wurde eine gleichzeitige Expression von Sp1 und Krüppel-*like* Faktor 4 (KLF4), einem Tumor-Supressor-Gen, beschrieben (176). Eine erhöhte Expression von KLF4 resultierte in einer verminderten Expression von Sp1. Innerhalb des Sp1 Promotors wurden überlappende kompetitive Bindungsstellen für Sp1 und KLF4 nachgewiesen, die einen Anstieg der Expression mittels Autotransaktivierung durch Sp1-Bindung zeigten, während KLF4-Bindung zur Abnahme der Expression führte. Eine verminderte Expression von KLF4 führte durch Überexpression und Autotransaktivierung von Sp1 zur Entwicklung und signifikanten Expression im Magenkarzinoms (176).

Darüber hinaus wurden Unterschiede in der Aktivität durch Vorhandensein zell- und gewebespezifischer Signalkaskaden nachgewiesen, die vor allem durch Interaktion mit Kofaktoren oder weiteren Transkriptionsfaktoren definiert wurden, z.B. mit *Cofactor Required for Sp1 Activation* (CRSP) (107;108), CBP/p300 (Billon, 1999 4 /id) oder *Sma and Mad related Proteine* (Smad) (177). Sp1 war an Promotoren ohne TATA-Box

an der Initiierung der Transkription beteiligt, indem es die Bindung des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID an der entsprechenden Sequenz bahnt. *In vitro* stimulierte der spezielle Koaktivator-Komplex für Sp1, CRSP, die durch Sp1 vermittelte Transaktivierung (178). *In vivo* Assays haben für die Zelllinie HUVEC das Vorhandensein eines noch nicht identifizierten Proteins im Sp-Faktor Sequenzbereich bestätigt, das kompetitiv bindet und damit am Beispiel von Sp1 zu einer reduzierten Sp1 Expression und Inaktivierung des Sp1-Promotors führte (170). Außerdem wurde das Vorhandensein von distalen regulativen Elementen diskutiert, durch die mittels sterischer Veränderung der Chromatinstruktur die genspezifische Sp1-vermittelte Expression des *vegfr-2* Promotors ermöglicht wurde (170). Darüber hinaus konnte die Sp1-Aktivität durch das Vorhandensein von weiteren Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden. Hierzu zählten GATA (179), NF-E1 (179;180), Nonstructural Protein (NS) -1 (181), Ap1(182) und Egr-1 (183), von denen potentielle Bindungsstelle am *vegfr-3* Promotor für Egr-1 nachgewiesen wurden. Es konnte eine Modulation der Sp1-vermittelten transkriptionellen Regulation zusätzlich durch das Tumorsuppressorgen *Rb* gezeigt werden, indem es an eine 20 kDa messende inhibitorische Sp1-Regulatorregion bindet und damit gebundenes Sp1 freisetzt, sowie das Sp1-Level erhöhte (148). Im Rahmen der transkriptionellen Regulationsanalyse für *vegfr-2* wurde unter Verwendung von Rb-spezifischen Antikörpern in einem Supershift-Assay zur Detektion von Sp1 und Sp3 kein Supershift detektiert (112). Diese Untersuchungen bestätigten die Vermutung, dass Rb entweder kompetitiv mit der Sp1 Sequenz in Bindung geht und diese blockiert oder mit Sp1 und/oder Sp3 in vorhandener Bindung an der eigenen Sequenz allosterisch interagiert und diese inaktiviert. Untersuchungen mit dem Einfluss von Rb auf den *vegfr-3* Promotor stehen jedoch noch aus.

Die Komplexität der dargestellten Kontrollmechanismen in der Promotorregulation durch Sp-Faktoren muss individuell im zellulären Kontext betrachtet werden und ist nur partiell auf *vegfr-3* übertragbar. Für *vegfr-3* wurde in dieser Arbeit die bevorzugte Bindung von Sp1 an die Minimalsequenz gezeigt. Damit war eine Bindung von Sp3 an GC-Box I nur nach erfolgreicher Bindung von Sp1 am Minimalpromotor möglich. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Mutantenuntersuchungen im EMSA, in denen sowohl *vegfr-3*(-101/-66) Mut 1 als auch an *vegfr-3*(-101/-66) Mut 2 eine Bindung von Sp1 zulassen, während keine Bindung von Sp3 nachzuweisen war. *Vegfr-3*(-101/-66) Mut 3 mit Mutation von GC-Box I und II führte zur vollständigen Aufhebung der

Bindung und Verdrängung beider Komplexe und diene damit als Kontrolle. Als kausal ist für dieses Bindungsverhalten eine erhöhte Affinität oder ein gesteigertes Sp1/Sp3 Verhältnis zugunsten von Sp1 im untersuchten Zellsystem zu sehen. Als weitere Gründe für eine unterschiedliche Promotoraffinität von Sp-Faktoren wurde von Schäfer *et al.* posttranslationale Mechanismen durch Glykosylierung oder Phosphorylierung sowie die Beteiligung von Koaktivatoren diskutiert, die die Affinität von Sp1 und Sp3 am *vegf-A* Promotors beeinflussten (106). Strowski *et al.* zeigten, dass *H.pylori* als externer Faktor auf molekularer Ebene die Empfindlichkeit für Sp1 und Sp3 und damit die Transaktivierbarkeit des *vegf-A* Promotors erhöhte (184), während im Gegensatz dazu *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass unter oxidativem Stress mit epithelialen Magenzellen nur die Empfindlichkeit für Sp1 am *vegf-A* Promotor erhöht wird und zur vermehrten Transaktivierbarkeit beitrug (106). Maßgebenden Einfluss auf die dargestellten funktionellen Eigenschaften von Sp1 und Sp3 besitzt das individuelle Muster der essentiellen Promotorsequenz.

4.5 Vergleich der Regulation von VEGFR-3 mit der VEGF/VEGFR-Familie

4.5.1 Essentielle regulative Promotorelemente

Die Gegenüberstellung proximaler Promotorelemente der VEGF-/VEGFR-Familien und der Vergleich der individuellen transkriptionellen Regulation zielen darauf, die Ergebnisse dieser Arbeit biologisch einzuordnen und Zusammenhänge zwischen einzelnen Mitgliedern zu identifizieren.

Der proximale Promotorbereich von *vegfr-3* mit der Sequenz 5'(-101)-TCCCGGGCCCGCCTCCGGCCCCCGCCCCGCCCGCC(-66)/3' enthält GC-Boxen als potentielle Bindungsstellen für Sp1, Sp3 und Sp4 und ist charakterisiert durch einen absoluten GC-Gehalt von 94%. Nach initialer Identifikation eines essentiellen Promotorbereichs zwischen -101 und -32 wurden im EMSA und durch funktionelle Untersuchungen im pT81-System gezeigt, dass dieser Bereich einzugrenzen war durch identisches Bindungsverhalten und gleiche Funktionalität auf *vegfr-3(-101/-66)*. In vorausgegangenen Untersuchungen wurde bereits demonstriert, dass der Promotorbereich von *vegfr-3* keine klassischen TATA- oder CAAT Boxen, dafür aber potentielle Bindungsstellen im 3'-flankierenden Bereich für Transkriptionsfaktoren aus der Sp-Familie und Sequenzen enthält, die für TATA-Box

freie Gene typisch sind (94). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Sp1-Proteine nahezu vollständig eine Bindung mit der 3'-gelegenen GC-Box II eingehen, während Sp3 mit der 5'-gelegenen GC-Box I interagiert. Sp4 zeigte keine Bindung am *vegfr-3* Promotor. Es bleibt weiterführend zu klären, ob die Restbande von GC Box II mit Komplex I nach Supershift und Bindung der Sp1-Proteine zusätzliche noch nicht identifizierte regulative Proteine oder Kofaktoren enthält. Trotz Vorhandensein potentieller Bindungsstellen in der TRANSFAC® Sequenzanalyse und Nachweis einer Verdrängung durch Ap2 α -Oligonukleotide bzw. Bindungsabschwächung durch Egr-1-Oligonukleotide wurde durch Verwendung von Antikörpern gegen Ap2 α , Egr-1 und c-Myc keine nachweisbare Rolle unter basalen Bedingungen nachgewiesen. Es wurde eine Kreuzreaktivität durch strukturelle Interaktion zwischen Sp-Faktoren und Ap2 α -Oligonukleotiden nachgewiesen, indem die Funktionalität der AP2 α Consensus-Sequenz im Vergleich zwischen HMEC-1 Zellen und HeLa-Zellen untersucht, die nachweislich AP2 α Protein enthalten (109;109). Strukturelle Interaktionen zwischen Sp-Faktoren und AP2 α -Oligonukleotiden wurden bereits am *vegfr-A* Promotor durch Strowski *et al.* beschrieben (184).

Es konnte nachgewiesen werden, dass der klonierte *vegfr-3* Promotor in der Deletionsanalyse bis -319 eine reduzierte Aktivität aufweist, die ein Minimum der Aktivität im Bereich von -858 zeigte. In Ergänzung hierzu wurde durch Iljin *et al.* in einer vorausgegangene Untersuchung im Mausmodell demonstriert, dass die Transfektion von hämangioendothelialen Zelllinien mit *vegfr-3* Promotorkonstrukten der Maus zu einer höheren Aktivität im 3'-gelegenen Bereich mittels 1,1 kb Fragment führten als unter Verwendung des 3 kb Fragments (100). In der durchgeführten Deletionsanalyse ausgehend vom 3 kb Konstrukt zeigt sich jedoch im Mausmodell die höchste Aktivität im Bereich -819 des Mauspromotors (94;100), dessen vergleichbares Konstrukt in dieser Arbeit die geringste Promotoraktivität zeigte. Durch Iljin *et al.* wurde im Vergleich des 5'-flankierenden *vegfr-3* Promotors eine Homologie zwischen Mensch und Maus in zwei ausgewählten Bereichen in bis zu 70% beschrieben, die als mögliche 5'-Enhancerbereiche für die Regulation von VEGFR-3 diskutiert wurden (94). Die unterschiedliche Aktivität zwischen humanen und Mauspromotorkonstrukten ist vor dem Hintergrund einer 70% igen Homologie zu diskutieren, die in überlappenden Sequenzbereichen die Bindung aktivierender versus inhibierender Faktoren zulässt. Diese beiden konservierten Bereiche von *vegfr-3* ausgehend vom

Die *vegfr-1* Sequenz zeigte zwischen -886 und +304 drei GC-Boxen mit Bindung von Sp-Faktoren sowie eine Element für Egr-1 unmittelbar in 5'-Nähe zur am meisten in 3' Richtung gelegenen GC-Box (186), die an der Regulation des Promotors beteiligt waren (187). Als essentieller minimaler Promotorbereich wurde durch Ikeda *et al.* der Sequenzbereich zwischen -229 und +8 beschrieben (115). Für den *vegfr-2* Promotor wurde eine Vielzahl von regulativen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert. Hierzu zählen GATA Bindungssequenzen (188) sowie Bindungsstellen für Sp1/Sp3 (112;170) und NFκB (189) mit einem minimalen Promotorelement zwischen -101 und -53. Die zusätzlich beschriebene Bindungssequenz für Sp1 und Sp3 am *vegfr-2* Promotor war zwischen -79 und -68 lokalisiert (112). Dieser Bereich des *vegfr-3* Promotors enthält ebenfalls GC-reiche Elemente und Bindungssequenzen für Sp1 und Sp3. In einer Deletionsanalyse in Adenokarzinomzellen des Pankreas wurde gezeigt, dass die proximale Promotorregion mit GC-Boxen bei -58 und -44 elementar ist für die VEGFR-2 Expression (190). Die GC-Box III des klonierten Promotorfragments von VEGFR-3 im benannten Sequenzbereich -65 und -32 zeigt in dieser Arbeit jedoch keine Beteiligung an der transkriptionellen Regulation. Die Promotoranalyse ausgehend von einem in 5'-Richtung des Transkriptionsstartpunkts gelegenen 4kb messenden *vegfr-2* Konstrukt führte zur Identifikation eines minimalen Promotorelements zwischen -225 und dem Transkriptionsstartpunkt für eine maximale Promotoraktivität und drei E-Boxen zwischen -225 und +268 bei -170, +70 und +184 (111). Außerdem wurde ein *functional Initiator* (Inr) Element beschrieben, das durch TFII-I transaktiviert (111), bisher jedoch für VEGFR-3 nicht beschrieben wurde.

Der Minimalpromotorbereich von *vegfr-A* zwischen -85 und -50 enthält wichtige regulatorische GC-reiche Elemente für die Promotoraktivität sowie für die Bindung und Transaktivierung im Rahmen der Pathogenese durch *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) (184). Das 3'-terminale Ende des *vegfr-C* Promotors zeigte vergleichbar sich wiederholende GC-Muster wie *vegfr-3*, über den VEGF-C seine biologische Funktion im Rahmen der Lymphangiogenese ausübt. Während die minimalen Promotorelemente von *vegfr-A*, *vegfr-C* sowie von den Rezeptoren *vegfr-1*, *vegfr-2* und *vegfr-3* alle GC-reiche Bindungselemente für Sp-Faktoren enthalten, führte die Klonierung der 2kb Promotorregion von *vegfr-D* dagegen zur Identifikation von *direct repeat* (DR) Elementen und einer Consensus-Hälfte mit Bindungssequenz AGGTCA bei -125/-119 sowie einer degenerierten DR-Hälfte (ATGTTA) bei -99/-94 als essentielle Elemente für die

transkriptionelle Regulation (191). Es ließen sich keine GC-Boxen abgrenzen.

Während *vegfr-3* und sein Ligand *vegfr-C* im essentiellen Promotorbereich vergleichbare Sequenzmuster zeigten, wies der *vegfr-D* Promotor als weiterer identifizierter Ligand ein sich deutlich unterscheidendes Sequenzmuster auf. Die 3' - terminalen Enden von *vegfr-2* und *vegfr-3* zeigen ähnliche repetitive Sequenzmuster. Beide Rezeptoren besitzen im Rahmen der Angiogenese nach bisherigen Erkenntnissen zum Teil überlappende biologische Funktionen für Lymphangiogenese und lymphatische Metastasierung, und aus der konservierten Gensequenz lässt sich auf einen gemeinsamen Ursprung im Rahmen der Evolution schließen. Demgegenüber zeigte auch der *vegfr-A* Promotor ähnliche Nukleotidmuster. Bisher ist kein eindeutiger biologischer Zusammenhang zwischen beiden Genen gezeigt wurde, obwohl die konservierte Sequenz auf eine evolutionsbiologische Nähe schließen lässt. In einer Arbeit von Nagy *et al.* wurde eine Assoziation von VEGF-A mit Lymphangiogenese beschrieben (192;193). Die Arbeitsgruppe zeigte eine durch VEGF-A vermittelte Lymphangiogenese mit dem Ergebnis von strukturell atypischen und funktionell eingeschränkten Lymphendothelien, wie dies in Tumoren zu finden war (192;193). Demgegenüber wurde die Rolle von VEGFR-3 für Hämangiogenese in verschiedenen Studien bestätigt (87). Durch das zunehmende Wissen über ihre biologische Bedeutung auf und die strukturellen und funktionellen, molekularen Charakteristika der VEGF/VEGFR- Familien unterstreicht die Gegenüberstellung der essentiellen Transkriptionsfaktoren die zunehmende Auflösung der strikten Trennung zwischen VEGF-A/VEGFR-1/VEGFR-2-System (11) und VEGF-C/VEGFR-D/VEGFR-3-System (80;194).

4.5.2 Vergleich der regulierenden Transkriptionsfaktoren

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen Sp1 und Sp3 in der Regulation von VEGFR-3, die darüber hinaus als essentiell für die Transkriptionskontrolle von VEGFR-1 (187), VEGFR-2 (190;195) und VEGF (106;116) identifiziert werden konnten. Für VEGF-C konnte dagegen nur Sp1 beschrieben werden (113) (Übersicht: Tab. 7). Außerdem wurde gezeigt, dass an der Regulation von VEGFR-1 neben Sp1 und Sp3 auch Sp4 beteiligt war (187), dessen Expression in den meisten vorausgegangenen Untersuchungen ausschließlich in neuronalem Gewebe nachgewiesen wurde (154).

Damit zeigte die Arbeit von Abdelrahim *et al.* erstmals eine gleichzeitige transkriptionelle Regulation von Sp1, Sp3 und Sp4 im Pankreaskarzinom. Die Regulation von VEGF-D wird dagegen nicht durch Sp-Faktoren beeinflusst. Es wurde nachgewiesen, dass das DR-Element des *vegf-D* Promotors durch *Hepatocyte Nuclear Factor* (HNF)-4 α und *Chicken Ovalbumin Upstream Promotor Transcription Factor* (COUP-TF)-1/2 reguliert wird (191). Darüber hinaus wurden die transkriptionellen Co-Aktivatoren *Glucocorticoid Receptor Interacting Protein* (GRIP) -1 und *Cyclic AMP-responsive Element Binding Protein* (CBP) in der Regulation von *vegf-D* nachgewiesen (191). Simiantonaki *et al.* zeigten eine Hypoxie-induzierte autokrine VEGF-C/VEGFR-3-Schleife unter Coexpression von HIF-1 Alpha in verschiedenen epithelialen Karzinomzelllinien (196). Die Anpassung an ein hypoxisches Milieu, an dessen Mechanismus HIF-1 beteiligt ist, stellt einen wichtigen Schritt in der Entkopplung des geordneten Zellzyklus im Rahmen von Tumorwachstum dar. Im Rahmen der Anpassung kommt es außerdem zur vermehrten Expression von VEGF-A (106). In Untersuchungen des *vegf-A* Promotors wurde demonstriert, dass je nach entsprechendem zellulärem System und untersuchtem Stimulus zusätzliche Transkriptionsfaktoren zur Transaktivierung des Promotors beitragen (184), zu denen auch die in dieser Arbeit untersuchten und als nicht beteiligt identifizierten Transkriptionsfaktoren AP2 α und Egr-1 gehörten (197). Es bleibt kritisch zu bewerten, ob AP2 α und Egr-1 in einem anderen biologischen System mit entsprechendem Stimulus an den potentiellen Bindungsstellen binden und funktionell den *vegfr-3* Promotor beeinflussen. Die Gegenüberstellung der transkriptionellen Regulation zielt darauf, bisher nicht identifizierte biologische Verbindungen zwischen dem Hämangiogenese vermittelnden VEGF-A/VEGFR-1/VEGFR-2-System und dem Lymphangiogenese vermittelnden VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3-System aufzuzeigen. Vor diesem Hintergrund wurde bereits gezeigt, dass Lymphangiogenese und lymphatische Metastasierung nicht ausschließlich über das VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 System vermittelt werden, sondern durch VEGF-A eine fehlerhafte Lymphangiogenese mit atypischen Lymphendothelien in Tumoren vermittelt wurde (80;194). Im Umkehrschluss konnte mit VEGFR-3 ein Vertreter des VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 System in der Hämangiogenese nachgewiesen werden (56;85). Die gleichzeitige transkriptionelle Kontrolle der Promotoren von *vegf-A* (106;116) und *vegfr-3* durch Sp1 und Sp3 unterstreicht diese Verbindungen. Es bedarf jedoch noch weiterführender

Untersuchungen, um die biologischen Hintergründe ähnlicher transkriptioneller Regulation im Detail interpretieren zu können.

4.6 Therapeutische Interaktionsmöglichkeiten mit Sp-Faktoren

Die Beobachtung, dass Sp-Faktoren eine entscheidende Rolle an der Regulation vieler essentieller Gene zur Steuerung von Wachstum, Überleben, Invasion und Angiogenese besitzen, rückte Sp-Faktoren auch in den Mittelpunkt therapeutischer Studien mit Sp-Faktoren als *Target*. Hintergrund dieser Untersuchungen war es, expressionsmodulierende Moleküle zu identifizieren. Im Vorfeld wurde bereits von Papavassiliou *et al.* diskutiert, dass oberstes Ziel im Design eines Medikaments mit einem Transkriptionsfaktor als *Target* die lokale Begrenzung der Wirkung des Medikaments auf eine spezielle Zellreihe oder ein selektioniertes Gewebe sein muss (198). Vor diesem Hintergrund wurde gezeigt, dass eine Interferenz mit Sp1/Sp3 durch das Einbringen von siRNA sowie von Antisense-Oligonukleotiden möglich sei. Darüber hinaus ist die Konstruktion von Antikörpern und Decoy-Oligonukleotiden denkbar, die mit den Transkriptionsfaktoren bzw. der entsprechenden DNA interagieren (199). Des Weiteren wurde eine thermische Instabilität von Sp1 beschrieben, die zur Destruktion und Hemmung des Transkriptionsfaktors von Nutzen sein könnte (200). In einer Studie wurde unter Verwendung von EMSA-Untersuchungen mit Sp1 und Oligonukleotiden mit Sp1 Consensus-Sequenz durch Einsatz von Anthrazyklinen die Interaktion zwischen Protein und Sequenz inhibiert. Es zeigte sich ein kompetitives Bindungsverhalten zwischen Sp1 Proteinen und Anthrazyklinen und eine 35%ige Inhibition der Bindung (201). In Adenokarzinomzellen des Pankreas mit erhöhter Expression von Sp-Faktoren konnte gezeigt werden (187;190;202), dass die Applikation des Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Inhibitors Celecoxib Angiogenese und Metastasierung durch Suppression der Sp1 vermittelten VEGF-A Expression reduziert, an der proximale GC-reiche Elemente des *vegf-A* Promotors im vorbeschriebenen Bereich zwischen -104 und -60 essentiell beteiligt waren (203). Außerdem wurde als zusätzlicher Wirkmechanismus ein verringertes Verhältnis von phosphoryliertem (P-Sp1) gegenüber dephosphoryliertem Sp1 beschrieben (203). Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass sich die Wirkung von Celecoxib über einen Mechanismus der Dephosphorylierung von Sp1 vollzieht, welches in seiner dephosphorylierten Form eine reduzierte Aktivität zeigte (164). Dieser

molekulare Mechanismus ergänzt potentielle transkriptionelle Regulationsmechanismen in der Regulation von Sp-Faktoren. Ähnliche Beobachtungen konnten durch Applikation des nicht-steroidalen Antirheumatikums (NSAR) Tolfenamid durch Abdelrahim *et al.* in Adenokarzinomzellen des Pankreas gemacht werden, indem nach Applikation eine signifikanten Abnahme der Expression von Sp1, Sp3, Sp4 und VEGFR-1 nachgewiesen wurde (187). In der Kolonkarzinom-Zelllinie SW480 ließ sich darüber hinaus erstmals eine Sp1-, Sp3- und zusätzlich Sp4-abhängige Regulation von VEGF-A nachweisen. Die Degradation von Sp1 und Sp4 nach Applikation eines COX-2 Inhibitors führte zur verminderten Expression von VEGF und zeigte damit erstmals Sp4 im Rahmen der Tumorgenese (204). Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen die für VEGFR-3 ermittelten Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 im Mittelpunkt der Interaktion mit Medikamenten und geben dabei eine Richtung vor, in der die wachstumsterminierenden Faktoren aus der Familie der Sp-Faktoren als *Targets* einer antiangiogenen und antikanzerösen Therapie dienen können. Jedoch bedarf es weiterführender Studien, die die *in vitro* demonstrierten molekularen Mechanismen der transkriptionellen Regulation von *vegfr-3* und die Aktivierung durch Sp1 und Sp3 *in vitro* weiterführend untersuchen, um eine wachstumsterminierende Interaktion auf molekularer Ebene zu ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Hintergrund:

VEGFR-3 besitzt als Bindungsstelle für die lymphangiogenen Faktoren VEGF-C und VEGF-D eine entscheidende Bedeutung für physiologische Prozesse der Lymphangiogenese während der Embryogenese. Die Bedeutung von VEGFR-3 für die Regulation der Lymphangiogenese wurde durch die Assoziation mit pathogenetischen Schritten der Tumorgenese und Metastasierung verdeutlicht, in denen eine vermehrte Expression in einer Vielzahl solider Tumoren nachgewiesen wurde. Während für andere Vertreter der VEGF-/VEGFR-Familie bereits Transkriptionsfaktoren und entscheidende regulative Elemente der transkriptionellen Regulation beschrieben worden sind, fehlen für das *vegfr-3* Gen trotz seiner großen Bedeutung für lymphangiogenetische Prozesse wesentliche Kenntnisse über die molekularen, strukturellen und funktionellen Mechanismen.

Methode:

Durch molekularbiologischen Techniken wurde der *vegfr-3* Promotor kloniert, um mittels 5'-Promotoranalyse unter Generierung von Reportergenkonstrukten essentielle Promotorelemente und strukturelle Charakteristika zu ermitteln. Transiente Transfektionen in Endothelzellen zeigten ein Minimalpromotorelement, das als Sonde für EMSA-Studien zur Identifikation nukleärer Transkriptionsfaktoren diente. Durch Synthetisierung von Mutanten zum Einsatz als DNA-Sonde wurde die funktionelle Rolle der identifizierten Transkriptionsfaktoren bestimmt sowie im heterologen Promotorsystem ohne mammalischer Transkriptionsfaktoren untersucht. Anschließend wurden die identifizierten strukturellen und funktionellen, molekularen Charakteristika des *vegfr-3* Promotors im Vergleich zu den Vertretern der VEGF-/VEGFR-Familie interpretiert.

Ergebnisse:

Erstmals wurden mit Sp1 und Sp3 aus der Familie der Zinkfinger-bindenden Proteine essentielle Transkriptionsfaktoren für die Regulation des *vegfr-3* Gens beschrieben, die an (5')-101 TCCCGGGCCCGCCTCCGGCCCCCGCCCCGCCCGCC -66(3') binden. Damit wurde für *vegfr-3* ein essentielles, regulatives GC-reiches Element im proximalen Promotorbereich identifiziert. Für beide Transkriptionsfaktoren wurde eine Transaktivatorfunktion mit Bindung an GC-Boxen gezeigt. Es konnte eine bevorzugte Bindung von Sp1 an den *vegfr-3* Promotor demonstriert werden. Für *vegfr-3* konnten

konservierte GC-reiche Elemente mit ähnlichem Nukleotidmuster im Vergleich zu anderen Vertretern der VEGF-/VEGFR-Familien nachgewiesen werden.

Diskussion:

Mit der Analyse der transkriptionellen Regulation des *vegfr-3* Promotors wurde ein weiteres Gen aus der VEGF-/VEGFR-Familie identifiziert, an dessen Regulation Sp1 und Sp3 beteiligt sind. Beide Transkriptionsfaktoren wurden bereits für die Regulation wachstumsterminierender Gen-Promotoren und Angiogenese-Gene beschrieben. Neben VEGFR-3 wurden auch Sp1 und Sp3 in der Tumorgenese verschiedener Tumorentitäten nachgewiesen. Sp1 wurde als unabhängiger, molekularer Marker für das Magenkarzinom und das kolorektale Karzinom beschrieben, in denen auch die erhöhte Expression von VEGFR-3 identifiziert wurde.

Schlussfolgerung:

In dieser Arbeit konnten basale transkriptionelle Regulationsmechanismen der Genexpression von *vegfr-3* gezeigt werden. Die Ergebnisse sind bedeutungsvoll für ein besseres Verständnis der molekularen Regulation von *vegfr-3* und sollen für weiterführende Untersuchungen die Grundlage für eine umfassendere physiologische und pathobiologische Einordnung bieten.

6 Literaturverzeichnis

1. Goldman E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* , 1236-1240. 1907.
2. Greenblatt M, Shubi P. Tumor Angiogenesis: Transfilter Diffusion Studies in the Hamster by the Transparent Chamber Technique. *J Natl Cancer Inst* 1968; 41(1): 111-24.
3. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a Tumor Factor Responsible for Angiogenesis. *J Exp Med* 1971; 133(2): 275-88.
4. Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med* 1971; 285(21): 1182-6.
5. Gullino PM. Angiogenesis and Oncogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61(3): 639-43.
6. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-Specific Growth Factors and Blood Vessel Formation. *Nature* 2000; 407(6801): 242-8.
7. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptors. *FASEB J* 1999; 13(1): 9-22.
8. 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(17): 4762-73.
9. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG et al. Induction of Tumor Lymphangiogenesis by VEGF-C Promotes Breast Cancer Metastasis. *Nat Med* 2001; 7(2): 192-8.
10. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME et al. VEGF-D Promotes the Metastatic Spread of Tumor Cells Via the Lymphatics. *Nat Med* 2001; 7(2): 186-91.
11. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and Cancer Metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8): 573-83.
12. Armstrong E, Kastury K, Aprelikova O et al. FLT4 Receptor Tyrosine Kinase Gene Mapping to Chromosome Band 5q35 in Relation to the T(2;5), T(5;6), and T(3;5) Translocations. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; 7(3): 144-51.
13. Galland F, Karamysheva A, Mattei MG, Rosnet O, Marchetto S, Birnbaum D. Chromosomal Localization of FLT4, a Novel Receptor-Type Tyrosine Kinase Gene. *Genomics* 1992; 13(2): 475-8.
14. Eriksson U, Alitalo K. Structure, Expression and Receptor-Binding Properties of Novel Vascular Endothelial Growth Factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 41-57.

15. Ferrara N, Gerber HP. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Angiogenesis. *Acta Haematol* 2001; 106(4): 148-56.
16. Lymboussaki A, Olofsson B, Eriksson U, Alitalo K. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF-C Show Overlapping Binding Sites in Embryonic Endothelia and Distinct Sites in Differentiated Adult Endothelia. *Circ Res* 1999; 85(11): 992-9.
17. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current Biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10(6): 528-35.
18. Risau W. Mechanisms of Angiogenesis. *Nature* 1997; 386(6626): 671-4.
19. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G et al. Abnormal Blood Vessel Development and Lethality in Embryos Lacking a Single VEGF Allele. *Nature* 1996; 380(6573): 435-9.
20. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor During Embryonic Angiogenesis and Endothelial Cell Differentiation. *Development* 1992; 114(2): 521-32.
21. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular Endothelial Growth Factor Is a Potential Tumour Angiogenesis Factor in Human Gliomas in Vivo. *Nature* 1992; 359(6398): 845-8.
22. Hamada K, Oike Y, Takakura N et al. VEGF-C Signaling Pathways Through VEGFR-2 and VEGFR-3 in Vasculoangiogenesis and Hematopoiesis. *Blood* 2000; 96(12): 3793-800.
23. Huang HY, Ho CC, Huang PH, Hsu SM. Co-Expression of VEGF-C and Its Receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3, in Endothelial Cells of Lymphangioma. Implication in Autocrine or Paracrine Regulation of Lymphangioma. *Lab Invest* 2001; 81(12): 1729-34.
24. Wissmann C, Hocker M. [VEGF-C, VEGF-D and VEGF-Receptor 3: Novel Key Regulators of Lymphangiogenesis and Cancer Metastasis]. *Z Gastroenterol* 2002; 40(9): 853-6.
25. Silvestre JS, Tamarat R, Ebrahimian TG et al. Vascular Endothelial Growth Factor-B Promotes in Vivo Angiogenesis. *Circ Res* 2003; 93(2): 114-23.
26. Mould AW, Tonks ID, Cahill MM et al. Vegfb Gene Knockout Mice Display Reduced Pathology and Synovial Angiogenesis in Both Antigen-Induced and Collagen-Induced Models of Arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(9): 2660-9.
27. Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U. Genomic Organization of the Mouse and Human Genes for Vascular Endothelial Growth Factor B (VEGF-B) and Characterization of a Second Splice Isoform. *J Biol Chem* 1996; 271(32): 19310-7.

28. Yonekura H, Sakurai S, Liu X et al. Placenta Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor B and C Expression in Microvascular Endothelial Cells and Pericytes. Implication in Autocrine and Paracrine Regulation of Angiogenesis. *J Biol Chem* 1999; 274(49): 35172-8.
29. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A et al. Vascular Endothelial Growth Factor B, a Novel Growth Factor for Endothelial Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(6): 2576-81.
30. Paavonen K, Horelli-Kuitunen N, Chilov D et al. Novel Human Vascular Endothelial Growth Factor Genes VEGF-B and VEGF-C Localize to Chromosomes 11q13 and 4q34, Respectively. *Circulation* 1996; 93(6): 1079-82.
31. Gretschel S, Astrosini C, Vieth M et al. Markers of Tumour Angiogenesis and Tumour Cells in Bone Marrow in Gastric Cancer Patients. *Eur J Surg Oncol* 2007.
32. 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(45): 32127-36.
33. Thelen A, Scholz A, Benckert C et al. VEGF-D Promotes Tumor Growth and Lymphatic Spread in a Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma. *Int J Cancer* 2008; 122(11): 2471-81.
34. von Marschall Z, Scholz A, Stacker SA et al. Vascular Endothelial Growth Factor-D Induces Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis in Models of Ductal Pancreatic Cancer. *Int J Oncol* 2005; 27(3): 669-79.
35. 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 J* 1999; 18(2): 363-74.
36. Ogawa S, Oku A, Sawano A et al. A Novel Type of Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), Preferentially Utilizes KDR/Flk-1 Receptor and Carries a Potent Mitotic Activity Without Heparin-Binding Domain. *J Biol Chem* 1998; 273(47): 31273-82.
37. Wise LM, Veikkola T, Mercer AA et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Like Protein From Orf Virus NZ2 Binds to VEGFR2 and Neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(6): 3071-6.
38. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2: Its Unique Signaling and Specific Ligand, VEGF-E. *Cancer Sci* 2003; 94(9): 751-6.
39. Shibuya M. Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39(5): 469-78.

40. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Receptor2: Its Biological Functions, Major Signaling Pathway, and Specific Ligand VEGF-E. *Endothelium* 2006; 13(2): 63-9.
41. Andre T, Kotelevets L, Vaillant JC et al. Vegf, Vegf-B, Vegf-C and Their Receptors KDR, FLT-1 and FLT-4 During the Neoplastic Progression of Human Colonic Mucosa. *Int J Cancer* 2000; 86(2): 174-81.
42. Orre M, Rogers PA. VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, Microvessel Density and Endothelial Cell Proliferation in Tumours of the Ovary. *Int J Cancer* 1999; 84(2): 101-8.
43. Wey JS, Fan F, Gray MJ et al. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Promotes Migration and Invasion in Pancreatic Carcinoma Cell Lines. *Cancer* 2005; 104(2): 427-38.
44. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of Blood-Island Formation and Vasculogenesis in Flk-1-Deficient Mice. *Nature* 1995; 376(6535): 62-6.
45. 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(8): 3566-70.
46. Petrova TV, Makinen T, Makela TP et al. Lymphatic Endothelial Reprogramming of Vascular Endothelial Cells by the Prox-1 Homeobox Transcription Factor. *EMBO J* 2002; 21(17): 4593-9.
47. 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(6): 2372-9.
48. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J et al. Cardiovascular Failure in Mouse Embryos Deficient in VEGF Receptor-3. *Science* 1998; 282(5390): 946-9.
49. 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(6): 1223-31.
50. Lymboussaki A, Partanen TA, Olofsson B et al. Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor C Receptor VEGFR-3 in Lymphatic Endothelium of the Skin and in Vascular Tumors. *Am J Pathol* 1998; 153: 395-403.
51. Lyon MF, Glenister PH. Chylous Ascites (Chy). *Mouse News Lett* 1984; 71: 26.
52. Brice G, Child AH, Evans A et al. Milroy Disease and the VEGFR-3 Mutation Phenotype. *J Med Genet* 2005; 42: 98-102.

53. Evans AL, Bell R, Brice G et al. Identification of Eight Novel VEGFR-3 Mutations in Families With Primary Congenital Lymphoedema. *J Med Genet* 2003; 40(9): 697-703.
54. 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(2): 199-205.
55. Ji R, Miura M, Kato S. Expression of VEGFR-3 and 5-Nase in Regenerating Lymphatic Vessels of the Cutaneous Wound Healing. *Microsc Res Tech* 2004; 64: 279-86.
56. Witmer AN, van Blijswijk BC, Dai J et al. VEGFR-3 in Adult Angiogenesis. *J Pathol* 2001; 195(4): 490-7.
57. 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(5): 1499-504.
58. Timke C, Krause MF, Oppermann HC, Leuschner I, Claviez A. Interferon Alpha 2b Treatment in an Eleven-Year-Old Boy With Disseminated Lymphangiomas. *Pediatr Blood Cancer* 2005.
59. Geleff S, Schoppmann SF, Oberhuber G. Increase in Podoplanin-Expressing Intestinal Lymphatic Vessels in Inflammatory Bowel Disease. *Virchows Arch* 2003; 442: 231-7.
60. Chen L, Hamrah P, Cursiefen C, Zhang Q, Pytowski B, Streilein J, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Mediates Induction of Corneal Alloimmunity. *Nat Med* 2004; 10: 813-5.
61. He Y, Karpanen T, Alitalo K. Role of Lymphangiogenic Factors in Tumor Metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1654(1): 3-12.
62. Kubo H, Cao R, Brakenhielm E, Makinen T, Cao Y, Alitalo K. Blockade of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 Signaling Inhibits Fibroblast Growth Factor-2-Induced Lymphangiogenesis in Mouse Cornea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(13): 8868-73.
63. Shimizu K, Kubo H, Yamaguchi K et al. Suppression of VEGFR-3 Signaling Inhibits Lymph Node Metastasis in Gastric Cancer. *Cancer Sci* 2004; 95(4): 328-33.
64. Padera TP, Kuo AH, Hoshida T et al. Differential Response of Primary Tumor Versus Lymphatic Metastasis to VEGFR-2 and VEGFR-3 Kinase Inhibitors Cediranib and Vandetanib. *Mol Cancer Ther* 2008.
65. Hoshida T, Isaka N, Hagendoorn J et al. Imaging Steps of Lymphatic Metastasis Reveals That Vascular Endothelial Growth Factor-C Increases Metastasis by Increasing Delivery of Cancer Cells to Lymph Nodes: Therapeutic Implications. *Cancer Res* 2006; 66(16): 8065-75.

66. Sugaya M, Watanabe T, Yang A et al. Lymphatic Dysfunction in Transgenic Mice Expressing KSHV K-Cyclin Under the Control of the VEGFR-3 Promoter. *Blood* 2005; 105(6): 2356-63.
67. Witte D, Thomas A, Ali N, Carlson N, Younes M. Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 (VEGFR-3) and Its Ligand VEGF-C in Human Colorectal Adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2002; 22(3): 1463-6.
68. Jennbacken K, Vallbo C, Wang W, Damber JE. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGF-C) and VEGF Receptor-3 in Human Prostate Cancer Is Associated With Regional Lymph Node Metastasis. *Prostate* 2005; 65(2): 110-6.
69. Zeng Y, Opeskin K, Baldwin ME et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 by Lymphatic Endothelial Cells Is Associated With Lymph Node Metastasis in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5137-44.
70. 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(11): 819-25.
71. Kojima H, Shijubo N, Yamada G, Ichimiya S, Abe S, Satoh M, Sato N. Clinical Significance of Vascular Endothelial Growth Factor-C and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 in Patients With T1 Lung Adenocarcinoma. *Cancer* 2005; 104(8): 1668-77.
72. Hong YK, Foreman K, Shin JW et al. Lymphatic Reprogramming of Blood Vascular Endothelium by Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Nat Genet* 2004; 36(7): 683-5.
73. Jüttner S, Wissmann C, Jöns T et al. Vascular Endothelial Growth Factor-D and Its Receptor VEGFR-3: Two Novel Independent Prognostic Markers in Gastric Adenocarcinoma. *JCO* 2004.
74. Li R, Younes M, Wheeler TM, Scardino P, Ohori M, Frolov A, Ayala G. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 (VEGFR-3) in Human Prostate. *Prostate* 2004; 58(2): 193-9.
75. Gunningham SP, Currie MJ, Han C et al. The Short Form of the Alternatively Spliced Flt-4 but Not Its Ligand Vascular Endothelial Growth Factor C Is Related to Lymph Node Metastasis in Human Breast Cancers. *Clin Cancer Res* 2000; 6(11): 4278-86.
76. 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(3): 713-22.
77. 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(11): 4739-46.
78. 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(7): 918-23.
 79. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E et al. Lymphatic Metastasis in the Absence of Functional Intratumor Lymphatics. *Science* 2002; 296(5574): 1883-6.
 80. Niki T, Iba S, Tokunou M, Yamada T, Matsuno Y, Hirohashi S. Expression of Vascular Endothelial Growth Factors A, B, C, and D and Their Relationships to Lymph Node Status in Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6(6): 2431-9.
 81. 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(5): 1381-90.
 82. Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The Role of Tumor Lymphangiogenesis in Metastatic Spread. *FASEB J* 2002; 16(9): 922-34.
 83. 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(13): 2087-96.
 84. Su JL, Yen CJ, Chen PS et al. The Role of the VEGF-C/VEGFR-3 Axis in Cancer Progression. *Br J Cancer* 2007; 96(4): 541-5.
 85. Clarijs R, Schalkwijk L, Hofmann UB, Ruiter DJ, de Waal RM. Induction of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 Expression on Tumor Microvasculature As a New Progression Marker in Human Cutaneous Melanoma. *Cancer Res* 2002; 62(23): 7059-65.
 86. Kamba T, Tam BY, Hashizume H et al. VEGF-Dependent Plasticity of Fenestrated Capillaries in the Normal Adult Microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(2): H560-H576.
 87. 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(2): 546-53.
 88. Hirakawa S, Hong YK, Harvey N, Schacht V, Matsuda K, Libermann T, Detmar M. Identification of Vascular Lineage-Specific Genes by Transcriptional Profiling of Isolated Blood Vascular and Lymphatic Endothelial Cells. *Am J Pathol* 2003; 162(2): 575-86.
 89. 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.

90. 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.
91. Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A et al. Vascular Endothelial Growth Factor C and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Expression in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *Head Neck* 2003; 25(6): 464-74.
92. Van Trappen PO, Steele D, Lowe DG et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-C and VEGF-D, and Their Receptor VEGFR-3, During Different Stages of Cervical Carcinogenesis. *J Pathol* 2003; 201(4): 544-54.
93. 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(4): 1361-9.
94. Iljin K, Karkkainen MJ, Lawrence EC et al. VEGFR3 Gene Structure, Regulatory Region, and Sequence Polymorphisms. *FASEB J* 2001; 15(6): 1028-36.
95. Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular Endothelial Growth Factor Receptors in the Regulation of Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Oncogene* 2000; 19(49): 5598-605.
96. 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(22): 12956-63.
97. 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(5): 921-31.
98. Pajusola K, Aprelikova O, Pelicci G, Weich H, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Signalling Properties of FLT4, a Proteolytically Processed Receptor Tyrosine Kinase Related to Two VEGF Receptors. *Oncogene* 1994; 9(12): 3545-55.
99. 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(26): 27088-97.
100. Iljin K, Dube A, Kontusaari S, Korhonen J, Lahtinen I, Oettgen P, Alitalo K. Role of Ets Factors in the Activity and Endothelial Cell Specificity of the Mouse Tie Gene Promoter. *FASEB J* 1999; 13(2): 377-86.
101. 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(2): 297-305.

102. Moller B, Rasmussen C, Lindblom B, Olovsson M. Expression of the Angiogenic Growth Factors VEGF, FGF-2, EGF and Their Receptors in Normal Human Endometrium During the Menstrual Cycle. *Mol Hum Reprod* 2001; 7(1): 65-72.
103. Moller B, Ronnerdag M, Wang G, Odland V, Olovsson M. Expression of Vascular Endothelial Growth Factors and Their Receptors in Human Endometrium From Women Experiencing Abnormal Bleeding Patterns After Prolonged Use of a Levonorgestrel-Releasing Intrauterine System. *Hum Reprod* 2005; 20(5): 1410-7.
104. Fink L, Seeger W, Ermert L et al. Real-Time Quantitative RT-PCR After Laser-Assisted Cell Picking. *Nat Med* 1998; 4(11): 1329-33.
105. Nordeen SK. Luciferase Reporter Gene Vectors for Analysis of Promoters and Enhancers. *Biotechniques* 1988; 6(5): 454-8.
106. Schäfer G, Cramer T, Suske G, Kemmner W, Wiedenmann B, Höcker M. 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(10): 8190-8.
107. Suske G. The Sp-Family of Transcription Factors. *Gene* 1999; 238(2): 291-300.
108. Philipsen S, Suske G. A Tale of Three Fingers: the Family of Mammalian Sp/XKLF Transcription Factors. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(15): 2991-3000.
109. Jiang JG, DeFrances MC, Machen J, Johnson C, Zarnegar R. The Repressive Function of AP2 Transcription Factor on the Hepatocyte Growth Factor Gene Promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272(3): 882-6.
110. Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and Kruppel-Like Factor Family of Transcription Factors in Cell Growth Regulation and Cancer. *J Cell Physiol* 2001; 188(2): 143-60.
111. Jackson TA, Taylor HE, Sharma D, Desiderio S, Danoff SK. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2: Counter-Regulation by the Transcription Factors, TFII-I and TFII-IRD1. *J Biol Chem* 2005; 280(33): 29856-63.
112. 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(30): 19294-303.
113. 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(40): 25176-83.
114. Grillot DA, Gonzalez-Garcia M, Ekhterae D et al. Genomic Organization, Promoter Region Analysis, and Chromosome Localization of the Mouse Bcl-x Gene. *J Immunol* 1997; 158(10): 4750-7.

115. Ikeda T, Wakiya K, Shibuya M. Characterization of the Promoter Region for Flt-1 Tyrosine Kinase Gene, a Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor. *Growth Factors* 1996; 13(3-4): 151-62.
116. 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(6): 669-76.
117. Jimenez SK, Sheikh F, Jin Y et al. Transcriptional Regulation of FGF-2 Gene Expression in Cardiac Myocytes. *Cardiovasc Res* 2004; 62(3): 548-57.
118. Luster TA, Rizzino A. Regulation of the FGF-4 Gene by a Complex Distal Enhancer That Functions in Part As an Enhanceosome. *Gene* 2003; 323: 163-72.
119. Xie K, Wei D, Huang S. Transcriptional Anti-Angiogenesis Therapy of Human Pancreatic Cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17(3): 147-56.
120. Kageyama R, Merlino GT, Pastan I. Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Gene Transcription. Requirement for Sp1 and an EGF Receptor-Specific Factor. *J Biol Chem* 1988; 263(13): 6329-36.
121. Shin TH, Paterson AJ, Grant JH, III, Meluch AA, Kudlow JE. 5-Azacytidine Treatment of HA-A Melanoma Cells Induces Sp1 Activity and Concomitant Transforming Growth Factor Alpha Expression. *Mol Cell Biol* 1992; 12(9): 3998-4006.
122. Zhang X, Li Y, Dai C, Yang J, Mundel P, Liu Y. Sp1 and Sp3 Transcription Factors Synergistically Regulate HGF Receptor Gene Expression in Kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284(1): F82-F94.
123. Sorensen P, Wintersberger E. Sp1 and NF-Y Are Necessary and Sufficient for Growth-Dependent Regulation of the Hamster Thymidine Kinase Promoter. *J Biol Chem* 1999; 274(43): 30943-9.
124. Kutoh E, Margot JB, Schwander J. Identification and Characterization of the Putative Retinoblastoma Control Element of the Rat Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 Gene. *Cancer Lett* 1999; 136(2): 187-94.
125. Spencer JA, Misra RP. Expression of the SRF Gene Occurs Through a Ras/Sp/SRF-Mediated-Mechanism in Response to Serum Growth Signals. *Oncogene* 1999; 18(51): 7319-27.
126. Dong L, Wang W, Wang F et al. Mechanisms of Transcriptional Activation of Bcl-2 Gene Expression by 17beta-Estradiol in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem* 1999; 274(45): 32099-107.
127. Li F, Altieri DC. Transcriptional Analysis of Human Survivin Gene Expression. *Biochem J* 1999; 344 Pt 2: 305-11.

128. Qin H, Sun Y, Benveniste EN. The Transcription Factors Sp1, Sp3, and AP-2 Are Required for Constitutive Matrix Metalloproteinase-2 Gene Expression in Astrogloma Cells. *J Biol Chem* 1999; 274(41): 29130-7.
129. Benasciutti E, Pages G, Kenzior O, Folk W, Blasi F, Crippa MP. MAPK and JNK Transduction Pathways Can Phosphorylate Sp1 to Activate the UPA Minimal Promoter Element and Endogenous Gene Transcription. *Blood* 2004; 104(1): 256-62.
130. 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(2): 461-8.
131. Schewe DM, Leupold JH, Boyd DD et al. Tumor-Specific Transcription Factor Binding to an Activator Protein-2/Sp1 Element of the Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Promoter in a First Large Series of Resected Gastrointestinal Cancers. *Clin Cancer Res* 2003; 9(6): 2267-76.
132. 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(17): 6371-80.
133. 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(12 Pt 1): 4109-17.
134. 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(10): 4143-54.
135. Saito T, Takahashi Y, Hashimoto H, Kamataki T. Novel Transcriptional Regulation of the Human CYP3A7 Gene by Sp1 and Sp3 Through Nuclear Factor Kappa B-Like Element. *J Biol Chem* 2001; 276(41): 38010-22.
136. 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.
137. 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(6): 1546-51.
138. Hasleton MD, Ibbitt JC, Hurst HC. Characterization of the Human Activator Protein-2gamma (AP-2gamma) Gene: Control of Expression by Sp1/Sp3 in Breast Tumour Cells. *Biochem J* 2003; 373(Pt 3): 925-32.
139. Carpentier C, Laigle-Donadey F, Marie Y et al. Polymorphism in Sp1 Recognition Site of the EGF Receptor Gene Promoter and Risk of Glioblastoma. *Neurology* 2006; 67(5): 872-4.

140. Kumar AP, Butler AP. Serum Responsive Gene Expression Mediated by Sp1. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252(2): 517-23.
141. Kumar AP, Butler AP. Enhanced Sp1 DNA-Binding Activity in Murine Keratinocyte Cell Lines and Epidermal Tumors. *Cancer Lett* 1999; 137(2): 159-65.
142. Safe S, Abdelrahim M. Sp Transcription Factor Family and Its Role in Cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41(16): 2438-48.
143. Wang J, Bannon MJ. Sp1 and Sp3 Activate Transcription of the Human Dopamine Transporter Gene. *J Neurochem* 2005; 93(2): 474-82.
144. Zhu GH, Lenzi M, Schwartz EL. The Sp1 Transcription Factor Contributes to the Tumor Necrosis Factor-Induced Expression of the Angiogenic Factor Thymidine Phosphorylase in Human Colon Carcinoma Cells. *Oncogene* 2002; 21(55): 8477-85.
145. Borellini F, Glazer RI. Induction of Sp1-P53 DNA-Binding Heterocomplexes During Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor-Dependent Proliferation in Human Erythroleukemia Cell Line TF-1. *J Biol Chem* 1993; 268(11): 7923-8.
146. Stros M, Ozaki T, Bacikova A, Kageyama H, Nakagawara A. HMGB1 and HMGB2 Cell-Specifically Down-Regulate the P53- and P73-Dependent Sequence-Specific Transactivation From the Human Bax Gene Promoter. *J Biol Chem* 2002; 277(9): 7157-64.
147. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG, Jr., Goldberg MA. Negative Regulation of Hypoxia-Inducible Genes by the Von Hippel-Lindau Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(20): 10595-9.
148. Chen LI, Nishinaka T, Kwan K et al. The Retinoblastoma Gene Product RB Stimulates Sp1-Mediated Transcription by Liberating Sp1 From a Negative Regulator. *Mol Cell Biol* 1994; 14(7): 4380-9.
149. 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(2): H600-H611.
150. Dynan WS, Tjian R. The Promoter-Specific Transcription Factor Sp1 Binds to Upstream Sequences in the SV40 Early Promoter. *Cell* 1983; 35(1): 79-87.
151. Dynan WS, Tjian R. Isolation of Transcription Factors That Discriminate Between Different Promoters Recognized by RNA Polymerase II. *Cell* 1983; 32(3): 669-80.
152. Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. Isolation of cDNA Encoding Transcription Factor Sp1 and Functional Analysis of the DNA Binding Domain. *Cell* 1987; 51(6): 1079-90.

153. Hagen G, Muller S, Beato M, Suske G. Sp1-Mediated Transcriptional Activation Is Repressed by Sp3. *EMBO J* 1994; 13(16): 3843-51.
154. 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(42): 24989-94.
155. Narayan VA, Kriwacki RW, Caradonna JP. Structures of Zinc Finger Domains From Transcription Factor Sp1. Insights into Sequence-Specific Protein-DNA Recognition. *J Biol Chem* 1997; 272(12): 7801-9.
156. Pavletich NP, Pabo CO. Zinc Finger-DNA Recognition: Crystal Structure of a Zif268-DNA Complex at 2.1 Å. *Science* 1991; 252(5007): 809-17.
157. Oka S, Shiraishi Y, Yoshida T, Ohkubo T, Sugiura Y, Kobayashi Y. NMR Structure of Transcription Factor Sp1 DNA Binding Domain. *Biochemistry* 2004; 43(51): 16027-35.
158. 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.
159. Ji C, Casinghino S, McCarthy TL, Centrella M. Multiple and Essential Sp1 Binding Sites in the Promoter for Transforming Growth Factor-Beta Type I Receptor. *J Biol Chem* 1997; 272(34): 21260-7.
160. 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(45): 28220-8.
161. 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(10): 4251-61.
162. Lania L, Majello B, De Luca P. Transcriptional Regulation by the Sp Family Proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(12): 1313-23.
163. Gill G, Pascal E, Tseng ZH, Tjian R. A Glutamine-Rich Hydrophobic Patch in Transcription Factor Sp1 Contacts the DTAFL110 Component of the Drosophila TFIID Complex and Mediates Transcriptional Activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(1): 192-6.
164. Pascal E, Tjian R. Different Activation Domains of Sp1 Govern Formation of Multimers and Mediate Transcriptional Synergism. *Genes Dev* 1991; 5(9): 1646-56.
165. 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(50): 16503-8.

166. 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(23): 4914-21.
167. Discher DJ, Bishopric NH, Wu X, Peterson CA, Webster KA. Hypoxia Regulates Beta-Enolase and Pyruvate Kinase-M Promoters by Modulating Sp1/Sp3 Binding to a Conserved GC Element. *J Biol Chem* 1998; 273(40): 26087-93.
168. Dennig J, Hagen G, Beato M, Suske G. Members of the Sp Transcription Factor Family Control Transcription From the Uteroglobin Promoter. *J Biol Chem* 1995; 270(21): 12737-44.
169. Sapetschnig A, Rischitor G, Braun H et al. Transcription Factor Sp3 Is Silenced Through SUMO Modification by PIAS1. *EMBO J* 2002; 21(19): 5206-15.
170. Patterson C, Wu Y, Lee ME, DeVault JD, Runge MS, Haber E. Nuclear Protein Interactions With the Human KDR/Flk-1 Promoter in Vivo. Regulation of Sp1 Binding Is Associated With Cell Type-Specific Expression. *J Biol Chem* 1997; 272(13): 8410-6.
171. Jackson SP, Tjian R. O-Glycosylation of Eukaryotic Transcription Factors: Implications for Mechanisms of Transcriptional Regulation. *Cell* 1988; 55(1): 125-33.
172. Su W, Jackson S, Tjian R, Echols H. DNA Looping Between Sites for Transcriptional Activation: Self-Association of DNA-Bound Sp1. *Genes Dev* 1991; 5(5): 820-6.
173. Kennett SB, Udvadia AJ, Horowitz JM. Sp3 Encodes Multiple Proteins That Differ in Their Capacity to Stimulate or Repress Transcription. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(15): 3110-7.
174. Nicolas M, Noe V, Jensen KB, Ciudad CJ. Cloning and Characterization of the 5'-Flanking Region of the Human Transcription Factor Sp1 Gene. *J Biol Chem* 2001; 276(25): 22126-32.
175. Nicolas M, Noe V, Ciudad CJ. Transcriptional Regulation of the Human Sp1 Gene Promoter by the Specificity Protein (Sp) Family Members Nuclear Factor Y (NF-Y) and E2F. *Biochem J* 2003; 371(Pt 2): 265-75.
176. Kanai M, Wei D, Li Q et al. Loss of Kruppel-Like Factor 4 Expression Contributes to Sp1 Overexpression and Human Gastric Cancer Development and Progression. *Clin Cancer Res* 2006; 12(21): 6395-402.
177. 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(19): 5178-93.
178. 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(6718): 446-50.

179. Merika M, Orkin SH. Functional Synergy and Physical Interactions of the Erythroid Transcription Factor GATA-1 With the Kruppel Family Proteins Sp1 and EKLF. *Mol Cell Biol* 1995; 15(5): 2437-47.
180. Yu CY, Chen J, Lin LI, Tam M, Shen CK. Cell Type-Specific Protein-DNA Interactions in the Human Zeta-Globin Upstream Promoter Region: Displacement of Sp1 by the Erythroid Cell-Specific Factor NF-E1. *Mol Cell Biol* 1990; 10(1): 282-94.
181. Krady JK, Ward DC. Transcriptional Activation by the Parvoviral Nonstructural Protein NS-1 Is Mediated Via a Direct Interaction With Sp1. *Mol Cell Biol* 1995; 15(1): 524-33.
182. Noti JD, Reinemann BC, Petrus MN. Sp1 Binds Two Sites in the CD11c Promoter in Vivo Specifically in Myeloid Cells and Cooperates With AP1 to Activate Transcription. *Mol Cell Biol* 1996; 16(6): 2940-50.
183. Lin JX, Leonard WJ. The Immediate-Early Gene Product Egr-1 Regulates the Human Interleukin-2 Receptor Beta-Chain Promoter Through Noncanonical Egr and Sp1 Binding Sites. *Mol Cell Biol* 1997; 17(7): 3714-22.
184. 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.
185. Yin LY, Wu Y, Ballinger CA, Patterson C. Genomic Structure of the Human KDR/Flk-1 Gene. *Mamm Genome* 1998; 9(5): 408-10.
186. 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(2): 146-53.
187. 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(7): 3286-94.
188. Minami T, Rosenberg RD, Aird WC. Transforming Growth Factor-Beta 1-Mediated Inhibition of the Flk-1/KDR Gene Is Mediated by a 5'-Untranslated Region Palindromic GATA Site. *J Biol Chem* 2001; 276(7): 5395-402.
189. 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(12): E110-E117.
190. 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(1): 292-301.
191. 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(2): 457-66.
192. 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(11): 1497-506.
 193. Nagy JA, Vasile E, Feng D et al. VEGF-A Induces Angiogenesis, Arteriogenesis, Lymphangiogenesis, and Vascular Malformations. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002; 67: 227-37.
 194. O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Family Members in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Correlates With Lymph Node Metastasis. *Cancer* 2001; 92(3): 556-68.
 195. 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(2): 388-402.
 196. Simiantonaki N, Jayasinghe C, Michel-Schmidt R, Peters K, Hermanns MI, Kirkpatrick CJ. Hypoxia-Induced Epithelial VEGF-C/VEGFR-3 Upregulation in Carcinoma Cell Lines. *Int J Oncol* 2008; 32(3): 585-92.
 197. Gille J, Swerlick RA, Caughman SW. Transforming Growth Factor-Alpha-Induced Transcriptional Activation of the Vascular Permeability Factor (VPF/VEGF) Gene Requires AP-2- Dependent DNA Binding and Transactivation. *EMBO J* 1997; 16(4): 750-9.
 198. Papavassiliou AG. Transcription-Factor-Modulating Agents: Precision and Selectivity in Drug Design. *Mol Med Today* 1998; 4(8): 358-66.
 199. Vita M, Henriksson M. The Myc Oncoprotein As a Therapeutic Target for Human Cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16(4): 318-30.
 200. Lim K, Chang H. O-Linked N-Acetylglucosamine Suppresses Thermal Aggregation of Sp1. *FEBS Letters* 2006;(580): 4645-52.
 201. Mansilla S, Portugal J. Sp1 Transcription Factor As a Target for Anthracyclines: Effects on Gene Transcription. *Biochimie* 2008.
 202. 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(18): 6740-9.
 203. Wei D, Wang L, He Y, Xiong HQ, Abbruzzese JL, Xie K. Celecoxib Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor Expression in and Reduces Angiogenesis and Metastasis of Human Pancreatic Cancer Via Suppression of Sp1 Transcription Factor Activity. *Cancer Res* 2004; 64(6): 2030-8.

204. Abdelrahim M, Safe S. Cyclooxygenase-2 Inhibitors Decrease Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Colon Cancer Cells by Enhanced Degradation of Sp1 and Sp4 Proteins. *Mol Pharmacol* 2005; 68(2): 317-29.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B	EMSA	Electronic Mobility Shift Assay
AP	Activator Protein	ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
BSA	Bovine Serum Albumine	FKS	Fötales Kälberserum
CBP	CREB Binding Protein	HEPES	N-2-Hydroxyethyle Piperazine- N'-2- Ethane Sulfonic acid
CD	Cluster of Differentiation	Ig	Immunglobulin
c-myc	cellular myelocytomatosis virus	IFN	Interferon
cpm	counts per minute	Kb	Kilobasen (Einheit)
CRSP	Cofactor Required for Sp1 activation	LYVE	Lymphatic Vessel Endothelial Receptor
cTNT	cardial Troponin T	MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
Cys	Cystein	NSCLC	Non-Small-Cell Lung Cancer
DBD	DNA- Bindungsdomäne	PBS	Phosphate Buffered Saline
DNA	Desoxy-Ribonucleine Acid	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium	Prox-1	Prospero-related Homebox-1
DN	dominat-negativ	PSA	Prostata-Spezifisches Antigen
DTT	Dithiothreitol	PTB	Phosphotyrosin-Bindungsdomäne
ECM	Extracellular Matrix		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
EGF	Epidermal Growth Factor		
Egr	Early growth response protein		

RNA	Ribonucleine Acid	Sp	Specificity protein
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)	SRF	Serum Response Factor
RT	Reverse Transkription	TGF	Transforming Growth Factor
(RT)-PCR	(Real Time)- Polymerase Chain Reaction	Tris	Trishydroxymethylamino- methan
S.E.M	Standard Error of the Mean	VEGF(R)	Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)
SDS	Sodiumdodecylsulfate	vegfr-3	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor -3 Gen
SHC	SH-Containing protein	w/v	weight/ volume
Smad	Sma and Mad related protein		

7.1 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Die Familie der VEGF-Rezeptoren	7
Abb. 2: Klonierung des Promotors - der pGL3 Leervektor	28
Abb. 3: Ausschnitt aus der Gensequenz der 5'-flankierenden Region.....	30
Abb. 4: Basale Expression und Transaktivierung des <i>vegfr-3</i> Gens in humanen endothelialen und epithelialen Zelllinien.....	36
Abb. 5: Funktionelle Bereiche des <i>vegfr-3</i> Promotors.....	40
Abb. 6: Bindung von zwei Proteinkomplexen an das <i>vegfr-3</i> Promotorminimal- element und an Teilelemente	44
Abb. 7: Sp1 und Sp3 binden an das Promotorelement <i>vegfr-3(-101/-66)</i>	47
Abb. 8: Sp1 und Sp3 aktivieren den <i>vegfr-3</i> Promotor	50
Abb. 9: Bindungsverhalten der Mutanten von <i>vegfr-3(-101/-66)</i>	51
Abb. 10: Supershift-Analyse der Sp-Faktoren der <i>vegfr-3</i> exprimierenden Zelllinien.....	52
Abb. 11: Molekulare Regulation des <i>vegfr3</i> - Gens basierend auf den Untersuchungen der Arbeit	53

7.2 **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Zelllinien.....	22
Tab. 2: Plasmide für transiente Transfektionen.....	24
Tab. 3: Primersequenzen für quantitative Duplex-RT-PCT (Taqman [®]).....	25
Tab. 4: Primersequenzen für die Generierung der 5'- Deletionskonstrukte	29
Tab. 5: Synthetische Oligonukleotide für EMSA und Subklonierungen	31
Tab. 6: Antikörper für EMSA-Studien.....	34
Tab. 7: Vergleich der VEGF/VEGFR-Familie zur transkriptionellen Regulation	65

7.3 Wissenschaftliche Tätigkeit

7.3.1 Publikationen

Hirche, C.; Hünerbein M.

Navigierte Leberresektionen – ein Review.

PRAXIS 11/2009, Seite 589 - 595

Murawa, D.; **Hirche, C.**; Dresel, S.; Hünerbein, M.

Sentinel node biopsy in breast cancer guided by ICG fluorescence: a feasibility study.

British Journal of Surgery, im Druck

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

Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 by Zinc Finger Proteins Sp1 and Sp3. (*geteilte Erstautorenschaft)

Manuskript in Vorbereitung

7.3.2 Vorträge

32. Dreiländertreffen SGUM, DGUM, ÖGUM 2008, Davos, Schweiz:

Navigierte Leberresektionen

Hirche C.

Benjamin Franklin Kolleg der Charite – Universitätsmedizin Berlin, 2001:

Leberzirrhose - von der Grundlagenforschung zur Therapie

Hirche C.

7.3.3 Posterpräsentationen

Jahrestagung der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft Verbrennungsmedizin (DAV) 2007, St. Anton, Österreich:

Verbrennungsmedizin im Shriners Burns Hospital for Children, Cincinnati, USA – Strategien in der Verbrennungsmedizin: Unterschiede zwischen den USA und Deutschland;

Hirche C., Ottomann C., Hartmann B.

Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2003, Berlin:

Expressionsanalyse des lymphangiogenen VEGF-Rezeptors 3 in humanen Magenkarzinomen und Charakterisierung der molekularen Expressionskontrolle des VEGFR-3 Gens;

Wissmann C., Jüttner S., **Hirche C.**, Kemmner W., Haensch W., Gretscher S., Jöns T., Wiedenmann B., Höcker M.

7.4 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Christoph Hirche, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Transkriptionelle Regulation des lymphogenen VEGF-Rezeptors 3 - Gens in Endothelzellen“ selbstständig 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.

Datum

Unterschrift

7.5 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand durch Anregung und unter Leitung von meinem Doktorvater und Leiter des Labors für Angiogenese und Tumormetastasierung der Charité, Herrn Prof. med. Michael Höcker, dem an dieser Stelle mein besonderer Dank gilt. Ich möchte mich bei Ihnen für die intensive Betreuung und die vielen konstruktiven Gespräche bedanken, für die Möglichkeit, eigenverantwortlich experimentell zu arbeiten und für die stetige wissenschaftliche Förderung sowie Motivation während schwieriger Phasen sowie die Mühe bezüglich der Korrektur der vorliegenden Arbeit. Dieses Engagement hat die Vollendung meiner Dissertation erst möglich gemacht und meinen wissenschaftlichen Horizont geprägt.

Herrn Prof. Dr. med. Wiedenmann danke ich für die Möglichkeit, im Labor für Angiogenese und Tumormetastasierung der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie der Charite-Universitätsmedizin Berlin, am Campus Virchow Klinikum meine Dissertation durchführen zu können.

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Dr.rer.nat. Christoph Wissmann für die stets optimale fachliche und "biologische" Betreuung und die Durchsicht dieser Arbeit sowie Herrn Dr. med. Stefan Jüttner für die vielen gemeinsamen Wege ins Isotopenlabor.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für eine unvergessliche schöne Zeit mit vielen kulinarischen Genüssen und anregenden Gesprächen, mit denen die Laborarbeit immer Spaß gemacht hat.

Für die persönliche Unterstützung und Motivation sowie mühevoll weiterführende Korrekturen bedanke ich mich insbesondere bei meinem Vater, meiner Familie und meinen Freunden.