

4 Ergebnisse

4.1 Expression von VEGF und seinen Rezeptoren im humanen CCC

Zunächst wurde die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren in 19 Tumorproben von chirurgisch resezierten humanen CCCs untersucht. Mittels endothelzellspezifischer anti-CD31 Färbung, konnte eine deutliche Anzahl von Endothelien zwischen den Tumorzellverbänden nachgewiesen werden (Abb. 1A). Um den genauen Vaskularisierungsgrad der Tumorproben zu bestimmen, wurde die mikrovaskuläre Gefäßdichte (MVD) nach der Methode von Weidner et al⁶⁰ bestimmt. Die MVD der 19 Tumorproben betrug $126,5 \pm 45,1$. Immunhistochemische Färbungen mit einem polyklonalen anti-VEGF Antikörper zeigten eine starke Expression von VEGF über epithelialen Tumorzellen in allen untersuchten Tumorproben (Abb. 1B). *In situ* Hybridisierungen mit VEGF spezifischen ³⁵S-markierten cRNA Radiosonden bestätigten die epithelialen Tumorzellen als zelluläre Quelle von VEGF: Es konnte eine starke VEGF mRNA Expression über den Tumorzellen, nicht aber in umgebenden Mesenchym- oder Endothelzellen beobachtet werden (Abb. 1E/F). Hierbei fiel eine besondere Akzentuierung des Hybridisierungssignals in perinekrotischen Tumorzellarealen auf (Abb. 1E). Um die Spezifität des VEGF-mRNA Expressionsmusters nachzuweisen, wurden parallel Sense cRNA Hybridisierungen durchgeführt, die kein spezifisches Autoradiographiesignal aufwiesen (Abb. 1F). Die Analyse der Expressionsmuster VEGF Rezeptoren zeigte eine Immunoreaktivität in 15 von 19 Tumorproben für VEGFR-1 und 10 von 19 Tumorproben für VEGFR-2. Immunhistochemische Färbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen VEGFR-1 (Abb. 1C) und VEGFR-2 (Abb. 1D) zeigten, dass beide Rezeptoren nur in die Endothelzellen umgebenden Tumorzellen exprimiert werden. Durch *in situ* Hybridisierungen konnten Tumorendothelzellen, als zelluläre Quelle der VEGF Rezeptor mRNA-Transkripte identifiziert werden (Abb. 1G/H). Kontrollhybridisierungen mit Sense cRNA Sonden zeigten kein spezifisches Autoradiographiesignal (keine Abbildung).

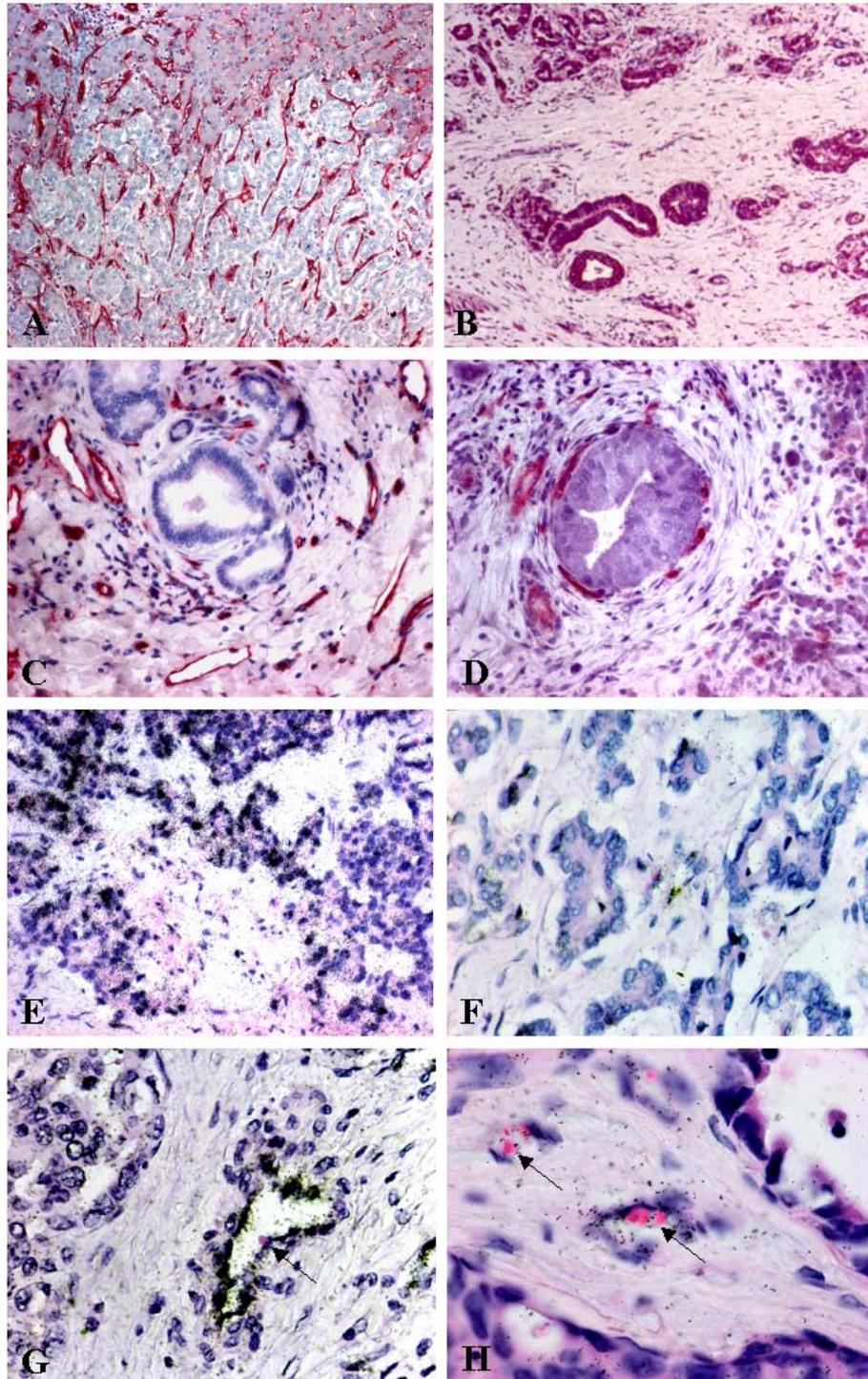


Abbildung 1: Expression von VEGF und seinen Rezeptoren im humanen CCC: (A) Immunfärbung mit anti-CD31 Antikörper zeigt die ausgeprägte Vaskularisierung des CCCs. Am Oberrand des Bildes tumorfreier Resektionsrand. Immunfärbungen mit VEGF (B), VEGFR-1 (C) und VEGFR-2 (D) Antikörpern. *In situ* Hybridisierungen mit ³⁵S-markierter antisense cRNA für VEGF (E), VEGFR-1 (G) und VEGFR-2 (H). Duktale Tumorzellen zeigen eine starke VEGF Immunreaktivität (B) und ein deutliches VEGF-mRNA Autoradiographiesignal (E). Sense cRNA Hybridisierungen ohne spezifisches Hybridisierungssignal (F). VEGFR-1 und VEGFR-2 werden von Tumorzellen umgebenden Endothelzellen exprimiert: Immunfärbung (C, D) und *in situ* Hybridisierung (G, H). Die Pfeile deuten auf intraluminal gelegene Erythrozyten. Vergrößerungen (A) 20x; (B-H) 40x.

4.2 Expression von TGF β -1 und seinen Rezeptoren im CCC

Um eine mögliche Interaktion von VEGF mit TGF β -1 zu untersuchen, wurden nun die Expressionsmuster von TGF β -1 und seinen Rezeptoren untersucht. Immunfärbungen mit einem polyklonalen anti-TGF β -1 Antikörper zeigten, dass alle untersuchten CCC-Tumorproben TGF β -1 exprimierten (19/19). Hierbei zeigten sich zwei verschiedenen Expressionsmuster: In 15 von 19 Präparaten wurde ein starkes TGF β -1 Signal über Tumorzellen umgebende Mesenchymzellen, aber nur ein schwaches Signal über Tumorzellen selbst, detektiert (Abb. 2A). Im Gegensatz hierzu zeigten 4 von 19 Tumorproben ein starkes Signal über Tumorzellen und nur eine schwache Immunfärbung über Mesenchymzellen (Abb. 2B).

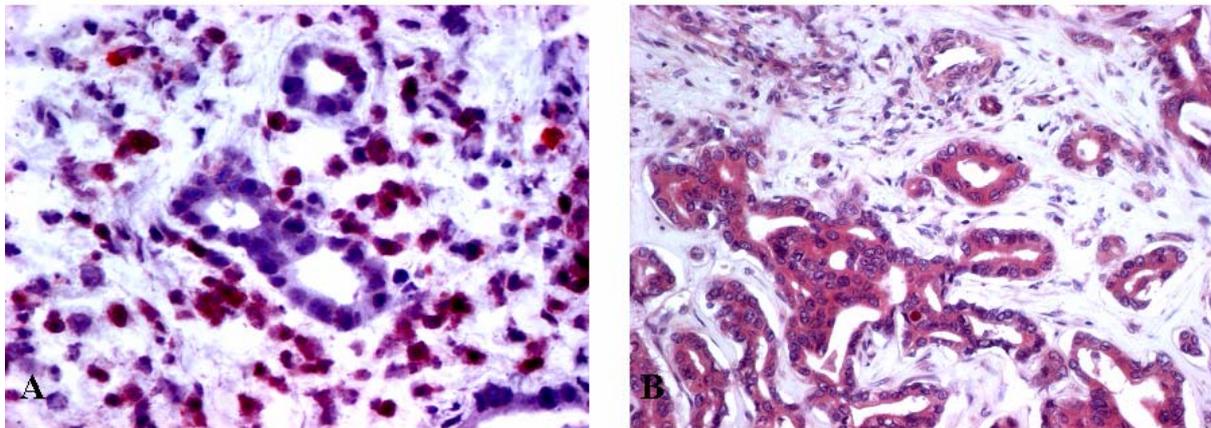


Abbildung 2: Expression von TGF β -1 im humanen CCC. Die Immunfärbungen mit TGF β -1 Antikörpern zeigten zwei verschiedene Expressionsmuster: **(A)** Ein starkes TGF β -1 Signal über Mesenchymzellen und ein schwaches Signal über Tumorzellen. **(B)** Starke TGF β -1 Immunreaktivität über transformierten Zellen, kein Signal über umgebenden Mesenchymzellen. Vergrößerungen **(A)** 40x; **(B)** 20x.

Die immunhistochemischen Untersuchungen der beiden TGF β -1 Rezeptoren, T β R-1 und T β R-2, demonstrierten eine Expression der beiden Rezeptoren über Tumorzellen in allen untersuchten Tumorpräparaten (Abb. 3A,B). Diese Daten zeigten, dass die Mehrzahl der CCCs VEGF und TGF β -1, sowie die jeweiligen Rezeptoren koexprimieren und legen eine funktionelle Abhängigkeit der beiden Zytokine nahe.

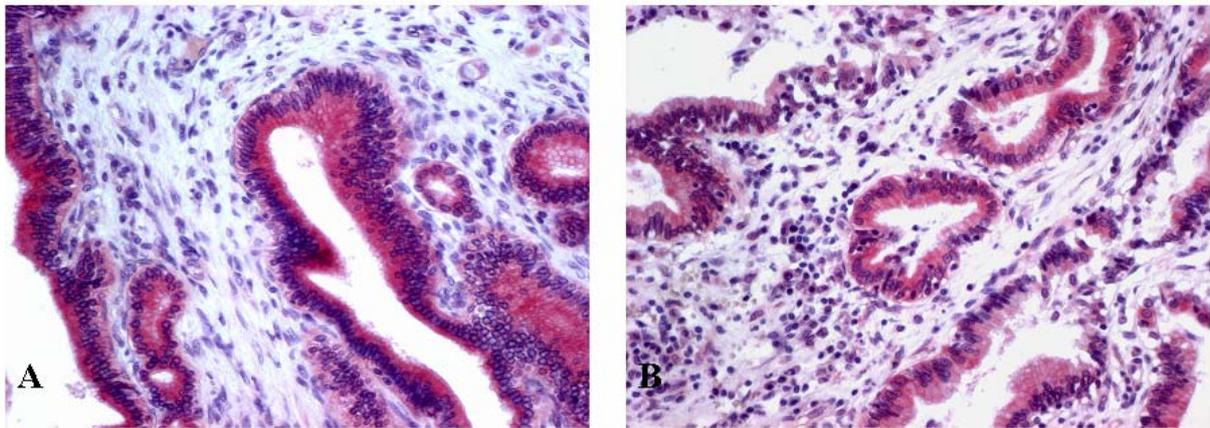


Abbildung 3: Expression der TGF β -1 Rezeptoren im CCC. T β R-I und T β R-II Immunfärbungen weisen die Rezeptoren über transformierten duktalem Epithelzellen nach. Vergrößerungen (A/B) 20x.

4.3 TGFβ-1 stimuliert VEGF in humanen CCC Zelllinien

Um mögliche funktionelle Interaktionen von VEGF und TGFβ-1 weiter zu untersuchen, wurde zunächst ein repräsentatives *in vitro* System etabliert. Es wurde untersucht, ob die beiden gut charakterisierten humanen CCC-Zelllinien TFK-1 und EGI-1, VEGF und TGFβ-1 exprimieren, um die *in vivo* erhobenen Daten zu validieren. Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass verschiedene VEGF-Splice-Varianten von beiden CCC-Zelllinien synthetisiert wurden. Drei Banden, bestehend aus 403, 535 und 607 Basenpaaren, welche mit den VEGF Isoformen VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ und VEGF₁₈₉ korrespondieren wurden amplifiziert (Abb. 4A). mRNA-Transkripte korrespondierend mit den VEGF Isoformen VEGF₁₄₅ und VEGF₂₀₆ wurden nicht amplifiziert. Mittels eines VEGF spezifischen ELISA's wurde VEGF Protein in den Zellysaten beider Zelllinien nachgewiesen (Abb. 4B). Die VEGF Konzentration in den Zellkulturüberständen war 10-fach höher, verglichen mit der VEGF Konzentration in den Zellysaten. Das deutet daraufhin, dass VEGF unmittelbar nach Synthese sezerniert wird. TGFβ-1 Protein wurde durch ELISA in Zellkulturüberständen beider Zelllinien nachgewiesen und akkumulierte (Abb. 4C).

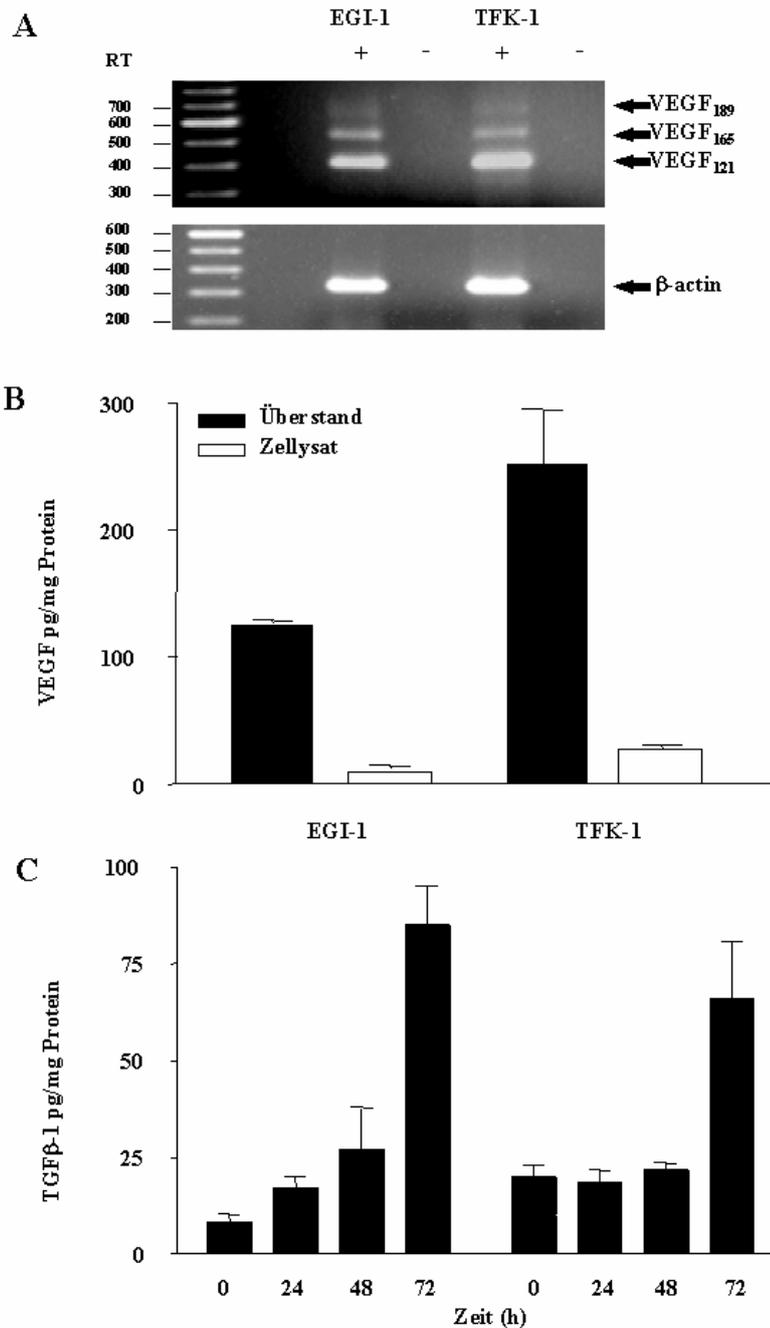


Abbildung 4: Expression von VEGF und TGFβ-1 in humanen CCC Zelllinien. (A) Nachweis von VEGF mRNA in CCC Zellen mittels RT-PCR und Primern, die alle bekannten VEGF Isoformen erkennen. β-Aktin diene als Positivkontrolle. Um genomische Kontamination auszuschließen, wurde parallel eine PCR ohne reverse Transkription durchgeführt. VEGF_{121,165} und VEGF₁₈₉ korrespondieren jeweils mit folgenden Banden: 403, 535 und 607 Basenpaare. (B) VEGF Proteinnachweis in Überständen und Zellysaten mittels VEGF spezifischem ELISA. (C) TGFβ-1 Nachweis mittels TGFβ-1 spezifischem ELISA. Die Werte wurden auf den Gesamtproteingehalt normalisiert und sind als Mittelwerte ± SEM von 4 unabhängigen Experimenten, in Triplikaten, angegeben.

Die beobachtete Koexpression von VEGF und TGF β -1 *in vivo* und *in vitro* legte die Möglichkeit einer autokrinen und/oder parakrinen VEGF Stimulation durch TGF β -1 nahe. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden im weiteren Verlauf TFK-1 Zellen, als repräsentatives Zellkulturmodell, charakterisiert. Zunächst wurde untersucht, ob eine Behandlung mit TGF β -1 zu einer Stimulation von VEGF Protein führte. TFK-1 Zellen wurden mit 10 ng/l TGF β -1 über 24, 48, 72 und 96 Stunden inkubiert und anschließend wurde VEGF in den Zellkulturüberständen per ELISA bestimmt. Es konnte eine zeitabhängige Zunahme der VEGF Konzentration nach TGF β -1 Stimulation beobachtet werden (Abb. 5A). Die VEGF Konzentration nahm von 10 ± 2 pg/mg Protein auf 1006 ± 52 pg/mg Protein nach 96 Stunden Inkubation zu. Eine signifikante Stimulation von VEGF durch TGF β -1 wurde nach 48 Stunden beobachtet (2,3-fache Stimulation) und dauerte bis 96 Stunden nach Inkubation. Um die Möglichkeit einer autokrinen Stimulation von VEGF durch TGF β -1 zu untersuchen, wie sie durch die Expressionsmuster von TGF β -1 *in vivo* und *in vitro* nahegelegt wurde, sind im folgenden die Effekte eines neutralisierenden TGF β -Antikörpers auf die VEGF Expression untersucht worden. TFK-1 Zellen sind über 96 Stunden mit neutralisierendem TGF β -Antikörper inkubiert worden, um die Aktivität von endogenem TGF β -1 zu blockieren. Verglichen mit einem nicht-spezifischen Kontrollantikörper führte die Inkubation der Zellen mit dem Antikörper zu einer signifikanten Inhibition der VEGF Proteinkonzentrationen in Zellkulturüberständen (Abb. 5B). Diese Daten implizieren, dass sowohl exogenes, als auch endogenes TGF β -1 zu einer VEGF Stimulation führen kann.

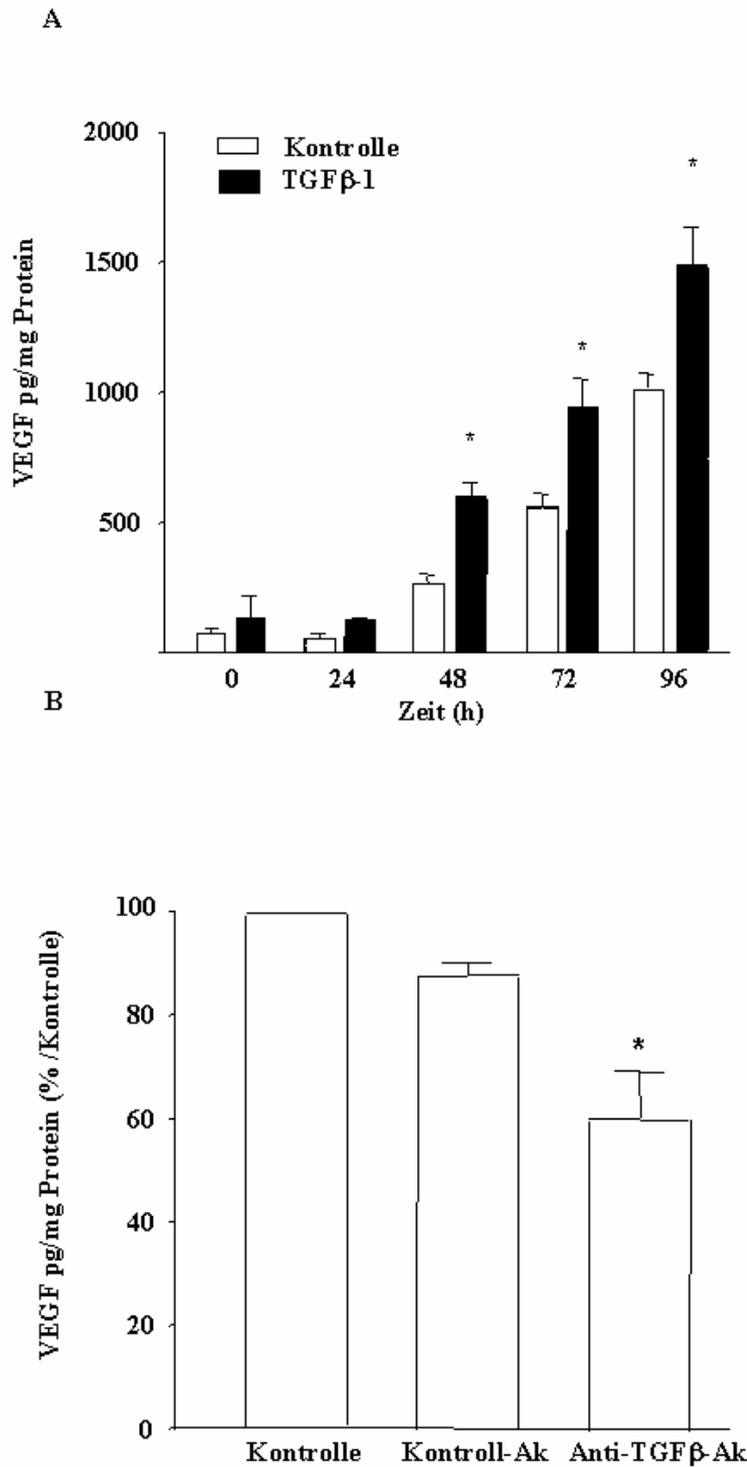
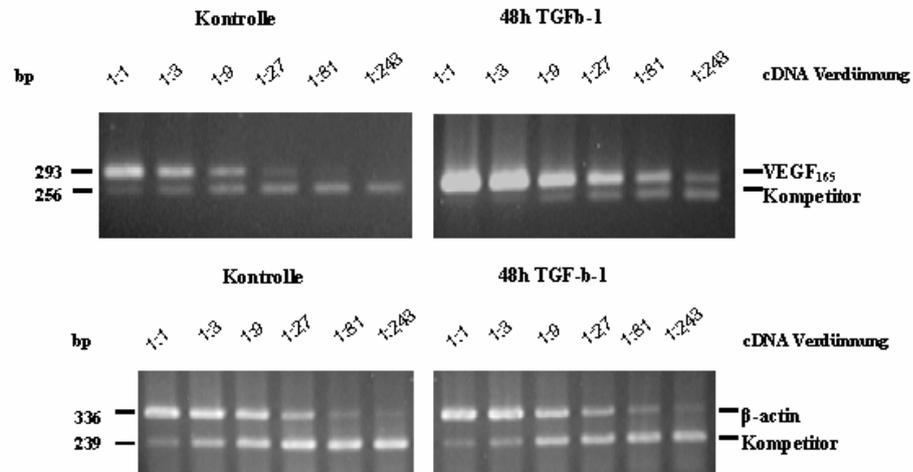


Abbildung 5: VEGF Proteinexpression wird durch exogenes und endogenes TGFβ-1 reguliert. (A) TFK-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml TGFβ-1 inkubiert. Zellkulturüberstände wurden asserviert und mittels VEGF-ELISA bestimmt. (B) Serumdepletierte TFK-1 Zellen wurden mit 50 ng/ml neutralisierendem TGFβ-1 Antikörper oder einem Kontrollantikörper (IgG) für 96 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die VEGF Bestimmung mittels ELISA. Angabe der Ergebnisse als Mittelwert ± SEM, von vier unabhängigen Experimenten in Triplikaten (* p<0,01).

4.4 Molekulare Mechanismen der TGF β -1 induzierten VEGF Expression

Um zu ermitteln, ob die Stimulation von VEGF durch TGF β -1 auf einer Zunahme der VEGF mRNA Konzentrationen beruhte, wurde eine quantitative kompetitive RT-PCR durchgeführt. Die gesamte RNA von TFK-1 Zellen wurde 12, 24 und 48 Stunden nach Inkubation mit TGF β -1 (10 ng/ml) extrahiert und mittels quantitativer kompetitiver RT-PCR untersucht. Nach TGF β -1 Behandlung nahm die VEGF-mRNA Konzentration zeitabhängig zu. Die Stimulation der VEGF-mRNA Konzentration wurde nach 12 Stunden, die maximale Stimulation nach 48 Stunden beobachtet ($5,6 \pm 1,9$ -fach, $n=3$, $p \leq 0,05$) (Abb. 6B).

A



B

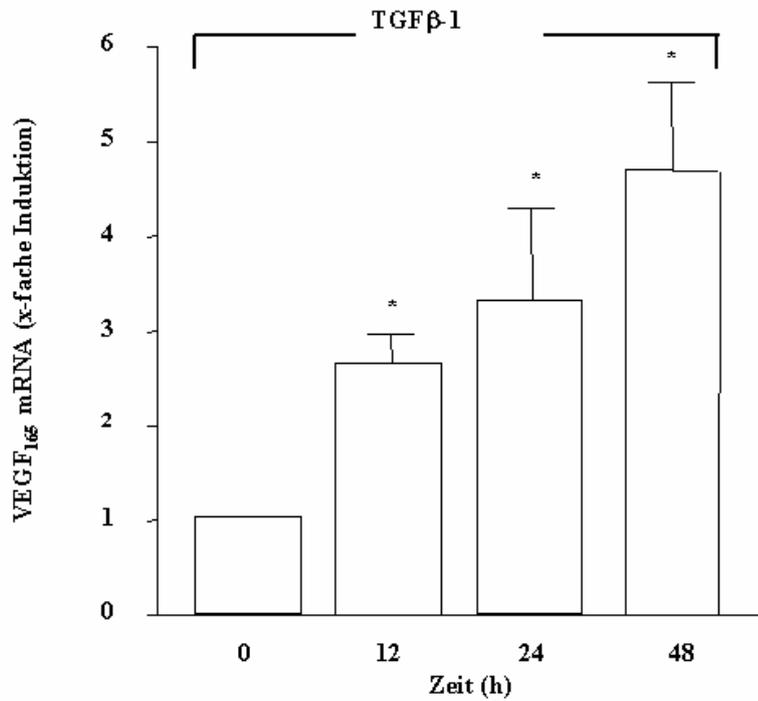


Abbildung 6: TGFβ-1 stimuliert VEGF-mRNA Expression. Die RNA von TFK-1 Zellen wurden nach Stimulation mit 10 ng/ml TGFβ-1 extrahiert und revers transkribiert. Eine konstante Kompetitor Konzentration und 3-fache verdünnte cDNAs wurden als DNA-Matrize unter Verwendung VEGF oder β-Aktin spezifischer Primer verwandt. (A) Repräsentatives Bild von VEGF Amplifikationsprodukten, dargestellt auf einem Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel. (B) Quantitative Analyse der VEGF₁₆₅ mRNA Expression, berechnet als molares Verhältnis von VEGF₁₆₅/ β-Aktin Kopien. Die Werte sind als x-fache Induktion nach TGFβ-1 Inkubation angegeben (Mittelwert ± SEM, 3 unabhängige Experimente; * p<0,05).

Um zu untersuchen, ob die Zunahme der VEGF mRNA Konzentration auf eine vermehrte Transaktivierung des VEGF Promotors zurückzuführen ist, wurden daraufhin die Effekte von TGF β -1 auf die VEGF Gentranskription untersucht. Ein humanes VEGF Promotor Reportergenkonstrukt (hVEGF -2018/+50) wurde in TFK-1 und EGI-1 Zellen transient transfiziert. Die Behandlung mit TGF β -1 resultierte in einer Zunahme der VEGF Promotoraktivität in beiden Zelllinien, gemessen an der Luziferaseaktivität, auch wenn die Stimulation in den EGI-1 Zellen keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 7A). Weil die TGF β -1 Effekte in den TFK-1 Zellen ausgeprägter nachzuweisen waren, wurden die Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der VEGF Promotoraktivität von TGF β -1, an dieser Zelllinie durchgeführt. Es wurde eine dosisabhängige Zunahme der VEGF Promotoraktivität nach TGF β -1 Inkubation beobachtet, wobei statistische Relevanz nach Stimulation mit 1 ng/ml und maximale Stimulation bei 100 ng/ml zu verzeichnen war (Abb. 7B). Die weiteren Experimente wurden mit einer Konzentration von 10 ng/ml TGF β -1 durchgeführt.

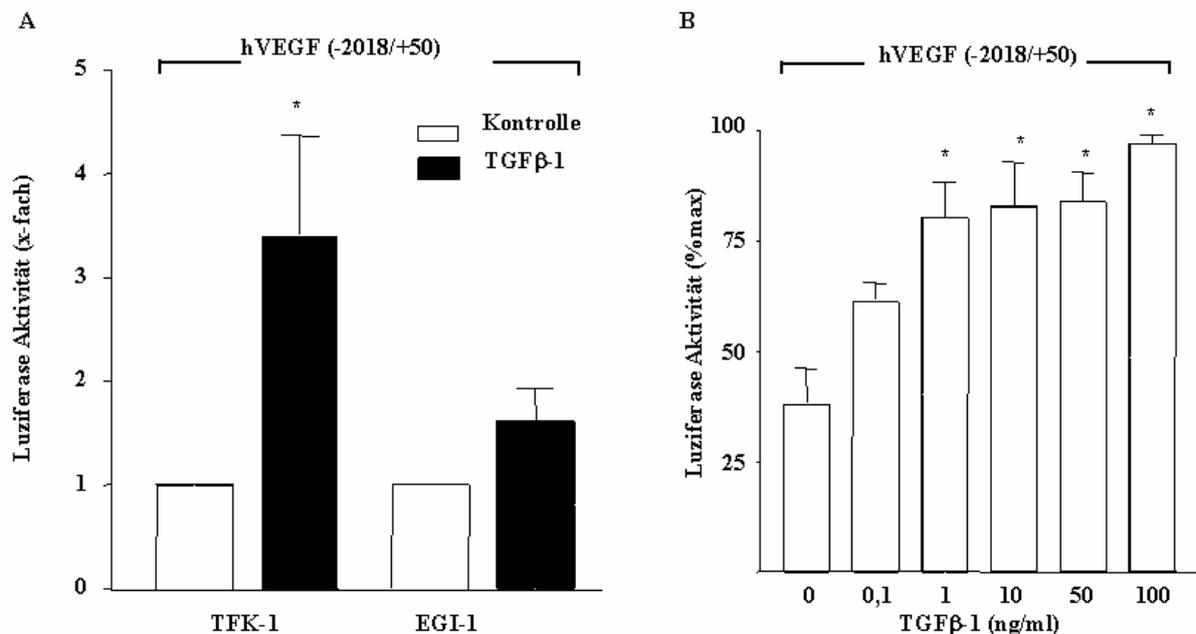


Abbildung 7: TGF β -1 transaktiviert den humanen VEGF Promotor. (A) TFK-1 und EGI-1 Zellen wurden mit 2 μ g/ml hVEGF Promotorluziferase-Konstrukt und 100 ng/ml Renilla-Luziferaseexpressionskonstrukt kotransfiziert und mit 10 ng/ml TGF β -1 unter serumfreien Bedingungen inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. (B) Dosisabhängige Regulation der hVEGF Promotoraktivität in TFK-1 Zellen, stimuliert mit angegebenen TGF β -1 Konzentrationen. (Mittelwert \pm SEM, 5 unabhängige Experimente, x-facher Anstieg im Vergleich zur Kontrolle (A) oder % der Maximalstimulation (B)).

4.5 TGFβ-1 responsive Elemente im VEGF Promotor

Um die VEGF Promotorregion, welche die TGFβ-1 Responsivität vermittelt, einzugrenzen, wurde eine Serie von 5' Deletionskonstrukten des VEGF Promotors transient transfiziert. Die in Abb. 8 gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass 5' Deletionen bis zur Region -85/+50, sowohl die basale Promotoraktivität, als auch TGFβ-1 Responsivität erhalten haben. Im Gegensatz hierzu führte die Deletion des -85/-53 Abschnitts des VEGF Promotors zu einer Reduktion der basalen Promotoraktivität um 95% und zu einem Verschwinden der TGFβ-1 Responsivität.

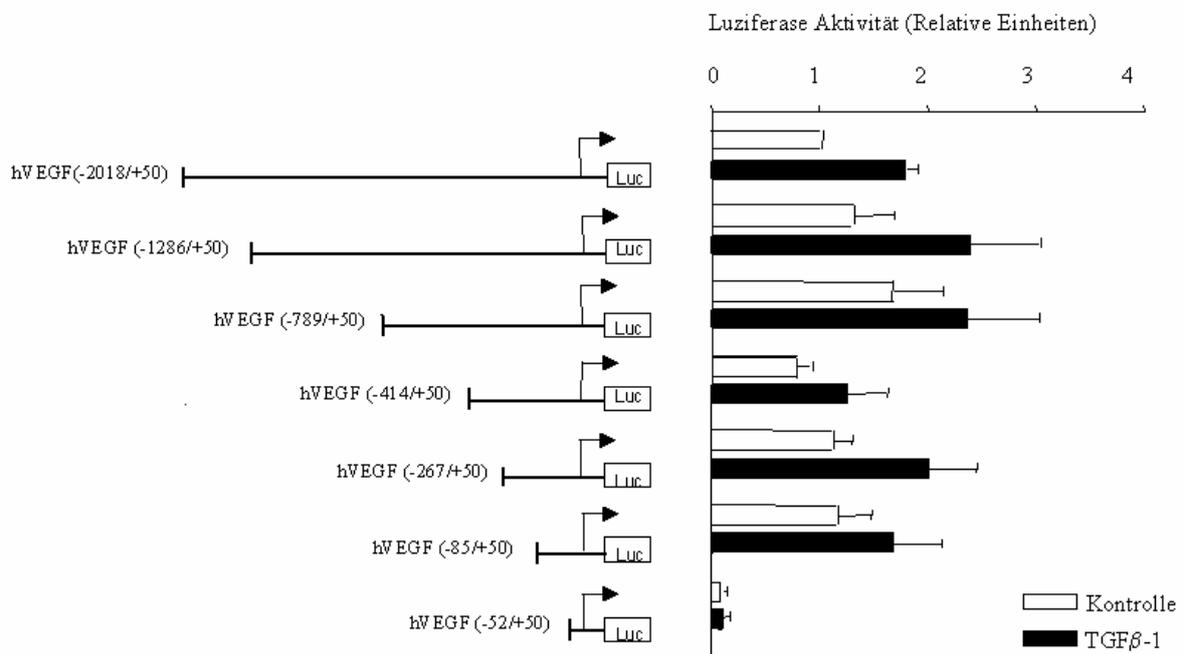


Abbildung 8: TGFβ-1 responsive Elemente im VEGF Promotor. Die Nukleotidsequenz -2018 bis +50 bp des hVEGF Promotors ist vor ein Luziferasereporter geklont und vom 5'Ende seriell geschnitten worden. TFK-1 Zellen wurden mit 2 µg des jeweiligen Konstruktes und 100 ng/ml Renillaluziferasekonstrukt (zur Normalisierung der Transkriptionseffektivität) transient transfiziert. Nach Transfektion, Serumentzug und TGFβ-1 Inkubation (10 ng/ml) über 24 Stunden erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität.

Um weiter zu belegen, dass der Abschnitt -85/-53 die TGF β -1 Stimulation vermittelt, wurde ein heterologes Promotorsystem angewandt. Die hierfür verwendeten Konstrukte enthalten ein dem Luciferasereporter gen vorgeschalteten enhancerlosen Thymidinkinase Promotor (pTK-Luc). Mit dem "leeren" pTK-Luc transfizierte Zellen zeigten kaum basale Promotoraktivität und keine TGF β -1 Responsivität. War die hVEGF -88/-50 Sequenz dem Thymidinkinase Promotor vorgeschaltet, kam es zu einer starken Promotraktivität. Dies legt nahe, dass die hVEGF -88/-50 Region eine basale Enhancerfunktion für das humane VEGF-Gen ausübt. Weiterhin zeigte das pTK-Luc/hVEGF-88/-50 Konstrukt nach Inkubation mit TGF β -1 einen zweifachen Anstieg der Reporter genaktivität (Abb. 9) und demonstrierte so eine TGF β -1 Sensitivität der hVEGF -88/-50 Region.

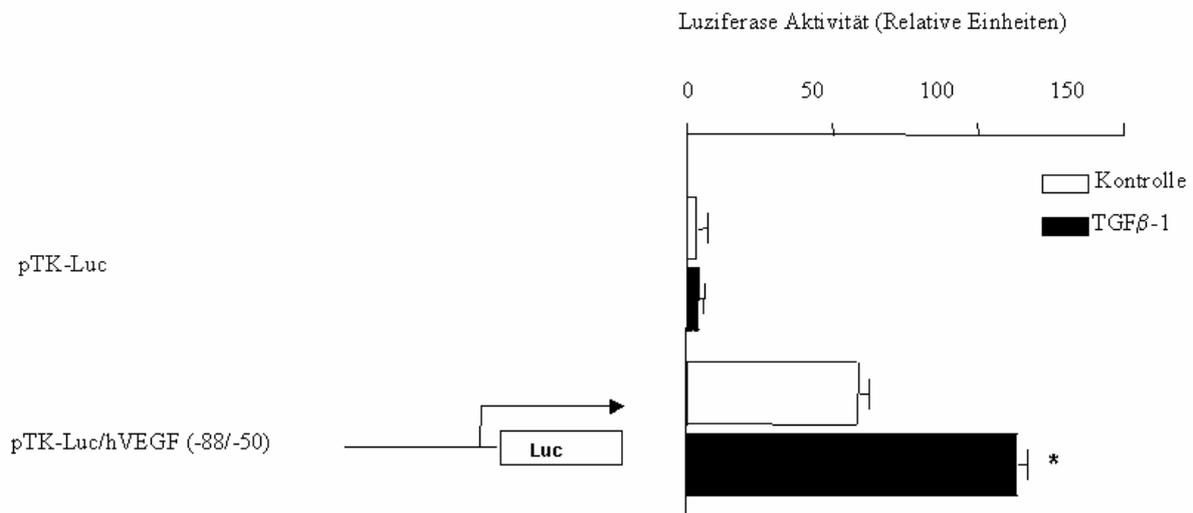
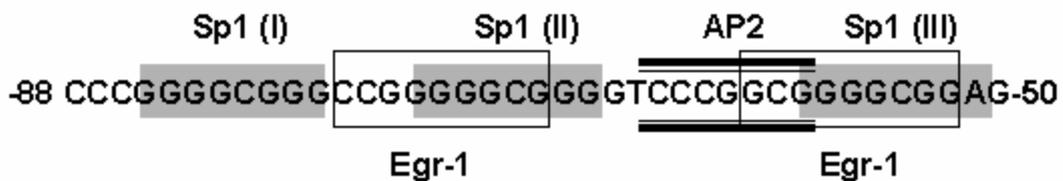


Abbildung 9: Vektor unabhängige Regulation der hVEGF -88/-50 Sequenz. Es erfolgten Transfektionen mit einem Konstrukt bestehend aus dem hVEGF -88/-50 Promotorelement, welches vor einen enhancerlosen Thymidinkinase-Promotor und ein Luciferasegen subkloniert wurde. Nach Serumentzug und TGF β -1 Inkubation erfolgte die Bestimmung der Luziferaseaktivität. Die angegebenen Luziferaseaktivitäten stellen Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden, dar (* $p < 0,05$).

4.6 Sp1 Bindungssequenzen im VEGF Promotor sind essentiell für TGFβ-1 Responsivität

Die hVEGF -88/-50 Region des VEGF Promotors enthält drei potentiell Bindungssequenzen für den Transkriptionsfaktor Sp1, zwei für den Transkriptionsfaktor Egr-1 und eine für den Transkriptionsfaktor AP2, die sich teilweise überlappen.



Schema 2: Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren im Promotorabschnitt hVEGF -88/-50.

Um zu ermitteln welcher dieser Faktoren an der TGFβ-1 Signaltransduktion beteiligt ist, wurde eine Mutationsanalyse der potentiellen Sequenzen durchgeführt. hVEGF-88/+50/Sp1-mut und hVEGF-88/+50/Egr-mut enthalten zwei Nukleotidmutationen die, die Bindung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren verhindern⁵⁷. Nach transsienter Transfektion der TFK-1 Zellen mit mutierten Egr-1 Bindungssequenzen war die TGFβ-1 Sensivität erhalten. Stimulation der mit hVEGF-88/+50/Egr-mut transaktivierten Zellen mit TGFβ-1 führte zu einem 1,7-fachen Anstieg der Luziferaseaktivität. Dies entspricht der Stimulation von hVEGF-88/+50 transfizierten Zellen (1,9-fache Stimulation). Im Gegensatz hierzu führte die Transfektion mit Vektoren, die Mutationen im Bereich der Sp1 Bindungssequenzen aufwiesen, zu einer deutlichen Reduzierung der basalen Promotoraktivität und einem Verlust der TGFβ-1 Sensivität (Abb. 10).

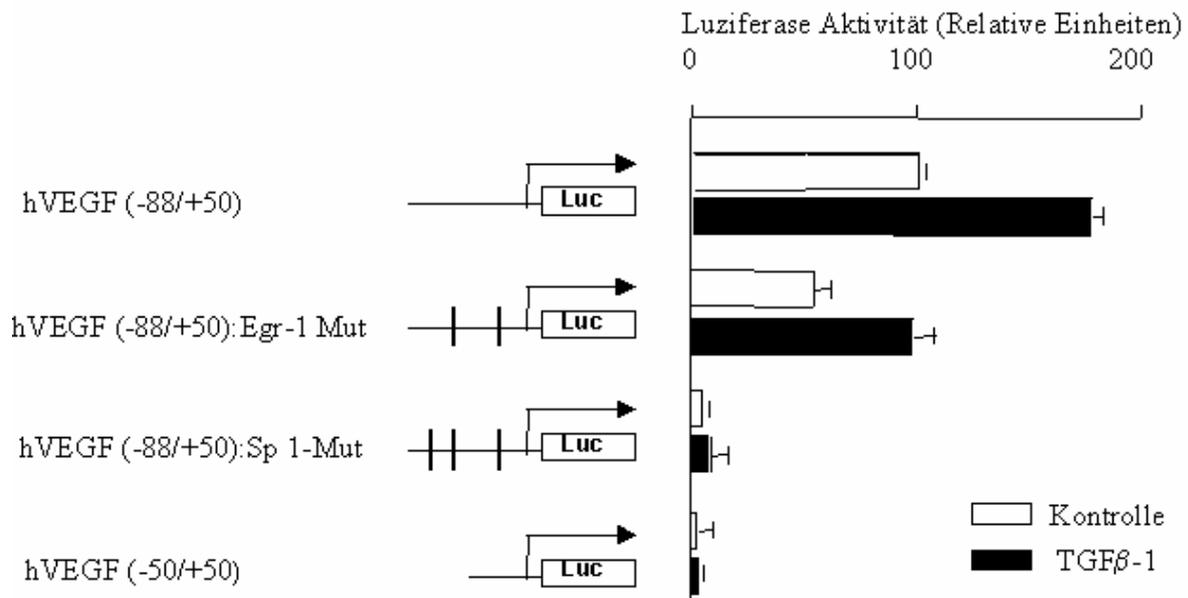


Abbildung 10: Mutationsanalyse, Sp1 Bindungssequenzen im VEGF Promotor sind essentiell für TGFβ-1 Responsivität. In das hVEGF -88/-50 Konstrukt wurden Mutationen im Bereich der Bindungssequenzen für Sp1 und Egr-1 eingefügt. Die Luziferaseaktivität wurde nach transienter Transfektion mit 2 µg des jeweiligen Konstruktes mit oder ohne TGFβ-1- Inkubation (10 ng/ml) gemessen. Nach Transfektion (2 µg Konstrukt, Serumentzug und TGFβ-1 Inkubation) wurde die Luziferaseaktivität gemessen. (Mittelwert ± SEM, 4 unabhängige Experimente, *p<0,05).

Um genauer zu bestimmen, welche der potentiellen Sp1 Bindungssequenzen erforderlich für die Transaktivierung sind, wurden im folgenden Deletionskonstrukte verwendet, die einzelne Sp1 Bindungssequenzen deletieren⁵⁸ (Schema 2). Die in Abbildung 11 gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass alle drei Konstrukte eine leicht verminderte basale Promotoraktivität aufweisen. Die TGFβ-1 Sensitivität nahm nach Deletion der Sp1 Bindungssequenz I ab, war aber erhalten, während sie nach Deletion von zwei Bindungssequenzen (I und II) oder aber der dem -50-Ende nahen Sequenz, nahezu nicht vorhanden war. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Sp1 Bindungssequenz I verzichtbar, die Sp1 Bindungssequenz III aber unverzichtbar für die TGFβ-1 vermittelte Transaktivierung des VEGF Promotors ist.

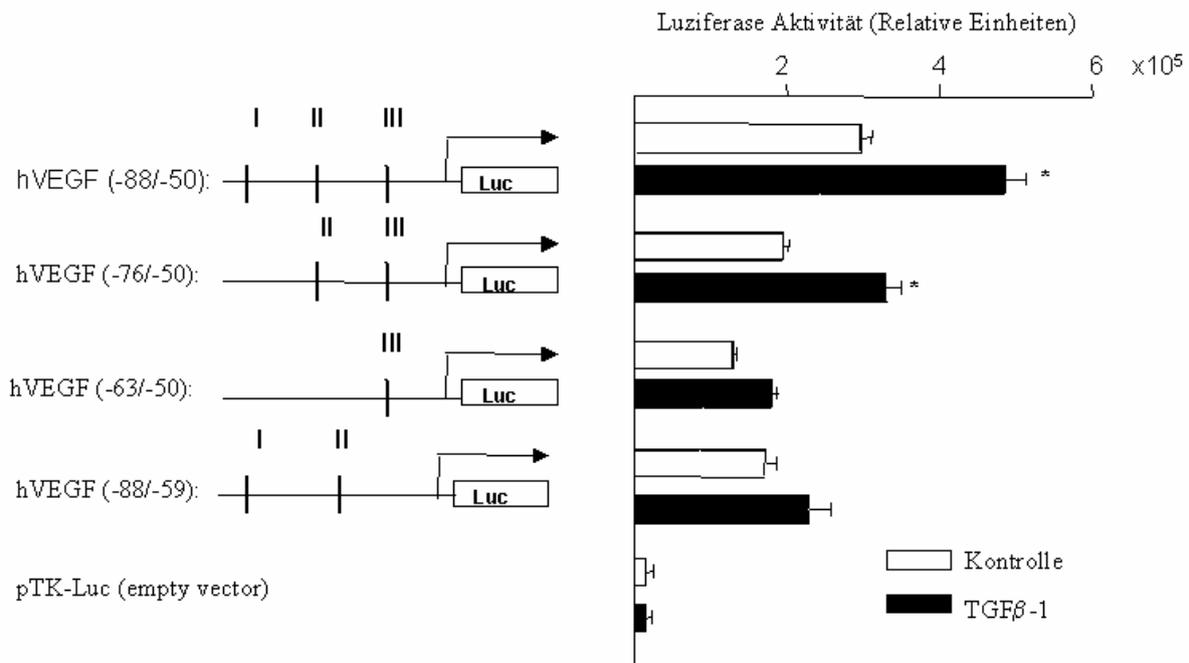


Abbildung 11: Deletionsanalyse, Sp1 Bindungssequenz III ist notwendig für TGF β -1 vermittelte VEGF Sensitivität. Aus dem hVEGF -88/-50 Reporterergenkonstrukt wurden Promotorsequenzen generiert, welche zu dargestelltem Verlust von Sp1 Bindungssequenzen führten. Nach Transfektion (2 μ g Konstrukt, Serumentzug und TGF β -1 Inkubation wurde die Luciferaseaktivität gemessen. (Mittelwert \pm SEM, unabhängige Experimente, $p < 0,05$).

4.7 Sp1 und Sp3 binden im Bereich der -85 bis -50 Region des VEGF Promotors

Basierend auf den Ergebnissen der VEGF Promotoranalyse sollte nun untersucht werden, welche Mitglieder der Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren tatsächlich an die Transkriptionsfaktorbindungssequenzen binden. 32 P-markierte Oligonukleotide der hVEGF-Sequenz -88 bis -50 und nukleäre Extrakte von TFK-1 Zellen bildeten zwei DNA-Protein-Komplexe, die in Elektromobility shift assays (EMSA) nachgewiesen werden konnten (Abb. 9A, Bande 1). Diese beiden Komplexe verschwanden nach Konkurrenz (Zugabe von Überschuß an nicht-markiertem Oligonukleotid) mit hVEGF -88/-50 oder Sp1 bindendem Oligonukleotid, während Konkurrenz mit einem Oligonukleotid welches eine mutierte Sp1 Bindungssequenz repräsentiert, die Formation des hVEGF -88/-50 Oligonukleotid-Kernprotein-Komplexes nicht beeinträchtigt (Abb. 12, Banden 2-4). Die -88 bis -50 Region des VEGF Promotors enthält weiterhin Bindungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren Egr-

1 und AP2 (Schema 2). Die DNA-Kernprotein Komplexformation konnte durch Kompetition mit nicht-markierten AP2 und Egr-1 Oligonukleotiden reduziert werden und war nicht beeinträchtigt durch Kompetition mit mutierten AP2 und Egr-2 Bindungssequenzen (Abb. 12, Banden 5-8). Diese Ergebnisse wiesen daraufhin, dass die Transkriptionsfaktoren Sp1 und möglicherweise AP2 und Egr-1 an das VEGF Promotorfragment binden.

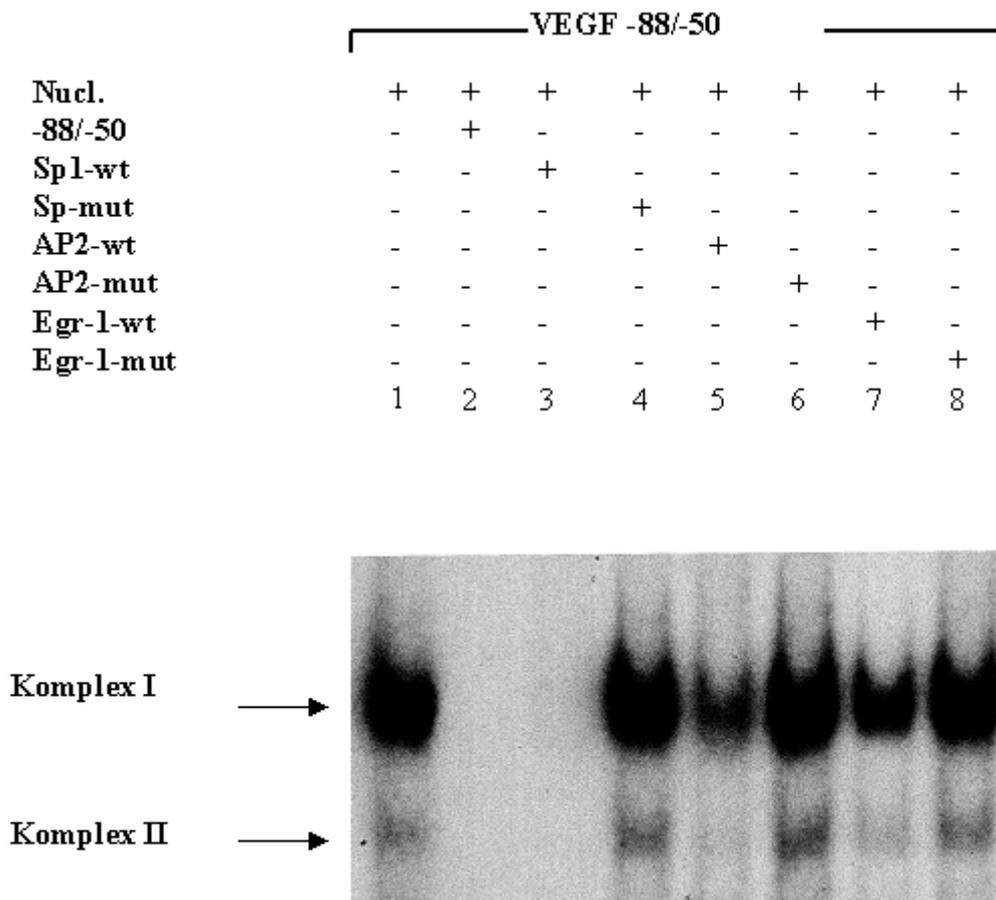


Abbildung 12: Sp1 und/oder AP2 binden an hVEGF -88/-50. Kernproteinextrakte von TFK-1 Zellen wurden für EMSA-Studien verwendet. DNA-Kernproteinkomplexe sind durch Pfeile markiert. Die Oligonukleotidsequenzen sind im Kapitel Material und Methoden angegeben. Die Spezifität der DNA-Protein Interaktion wurde durch Kompetition mit 100-fachem Überschuss unmarkierten Oligonukleotides bestätigt.

Um zu beweisen, dass die genannten Transkriptionsfaktoren in den Nukleoproteinkomplexen enthalten sind wurden Supershiftexperimente mit spezifischen anti-Sp1, anti-AP2 und anti-Egr-1 Antikörpern durchgeführt. Des weiteren wurde anti-Sp3 Antikörper eingesetzt, da beschrieben ist, dass Sp3 an Sp1 Bindungssequenzen binden kann⁶². Hinzugabe von anti-Sp1

Antikörper führte zu einem Supershift von Komplex I, Addition von anti-Sp3 Antikörper führte zu einem Supershift von Komplex II (Abb. 13, Banden 2-3). Wurden beide Antikörper dem Oligonukleotid-Kernprotein Ansatz hinzugefügt, führte dies zu einem kompletten Supershift von Komplex II und einem nahezu vollständigen Supershift von Komplex I. Hinzugabe von anti-AP2 oder Anti-Egr-1 Antikörpern führte hingegen zu keiner Veränderung der Komplexformation (Abb. 13, Banden 5 und 6). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass Komplex I vornehmlich die Bindung von Sp1 und Komplex II die Bindung von Sp3 an den humanen VEGF Promotor repräsentiert.

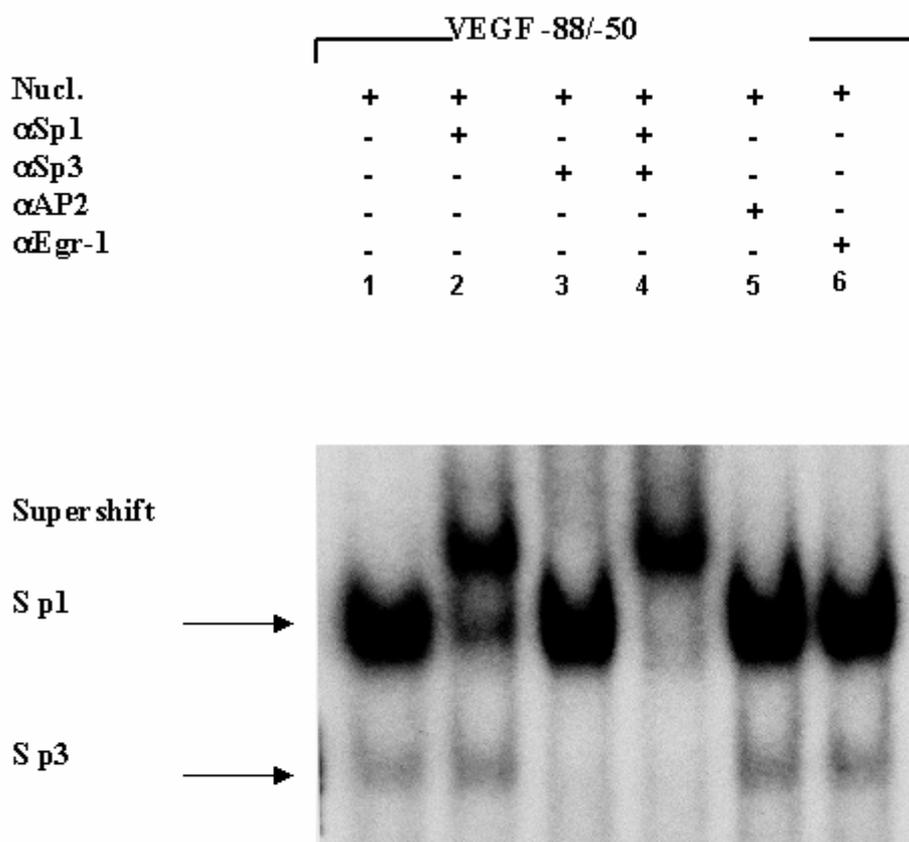


Abbildung 13: Supershiftexperimente zur Identifikation der Transkriptionsfaktoren. Die angegebenen Antikörper wurden den nukleären Extrakten von TFK-1 Zellen und radioaktiv markiertem hVEGF -88/-50 Oligonukleotid hinzugefügt.

Kompetitionsexperimente mit nicht-markiertem AP2 Oligonukleotid zeigten, dass sich die Formation von Komplex I zu einem gewissen Maße verringerte. Diese Ergebnisse befanden

sich in offensichtlichem Widerspruch zu den Ergebnissen der Supershiftanalysen, in denen weder anti-AP2, noch anti-Egr-1 Antikörper zu Veränderungen der Komplexbildung geführt hatten. Um die Hypothese zu überprüfen, dass Sp1, nicht aber AP2 an den VEGF-Promotor bindet, wurden daher Kreuzkompetitionsexperimente durchgeführt. ³²P markierte Oligonukleotide mit Bindungssequenzen für Sp1 oder AP2 wurden mit Kernextrakten von TFK-1 Zellen inkubiert. Inkubation von radioaktiv markierten Sp1 Oligonukleotiden führte zur Bildung von zwei DNA-Kernkomplexen. Beide Komplexe konnten durch einen Überschuss an unmarkiertem Sp1 Oligonukleotiden kompetitiert werden, während Überschuss von unmarkiertem AP2 oder Egr-1 Oligonukleotiden nur zu einer geringen Veränderung der Komplexe führte (Abb. 14, Banden 1 bis 4). Lediglich die Zugabe von Sp-1 Antikörpern, nicht aber von AP2 oder Egr-1 Antikörpern führte zu Bildung eines Supershiftkomplexes (Abb. 14, Banden 5 bis 7). Auch die Inkubation von markiertem AP2 mit Kernextrakten führte zur Bildung von zwei DNA-Proteinkomplexen (Abb. 14, Bande 8). Zugabe von Überschuss an unmarkiertem Sp1 Oligonukleotid führte zum kompletten Verschwinden der beiden Komplexe (Abb. 14, Bande 9), während Inkubation mit Sp1 Antikörper zur Bildung eines Supershiftkomplexes führte (Abb. 14, Bande 10). Diese Ergebnisse belegen, dass Sp1 an potentiellen AP2 Bindungssequenzen des humanen VEGF Promotorfragments -88 bis -50 bindet.

| | Sp1 | | | | AP2 | | | AP2 | | |
|----------------|-----|---|---|---|-----|---|---|-----|---|----|
| Nucl. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sp1 | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - |
| AP2 | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Egr-1 | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| α Sp1 | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + |
| α AP2 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| α Egr-1 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |

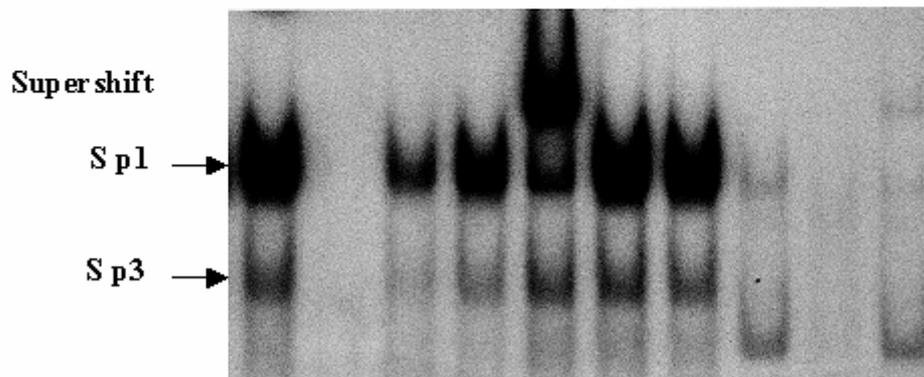


Abbildung 14: Sp1 kann an Ap2 Konsensus Sequenzen binden. Kernproteinextrakte wurden mit radioaktiv markierten Sp1 (Banden 1-7) oder AP2 (Banden8-10) bindenden Oligonukleotidsequenzen inkubiert. Für Kompetitionsexperimente wurde 100-facher Überschuss des indizierten Oligonukleotides hinzugefügt. Für Supershifts wurden die Reagenzien mit indizierten Antikörpern (Banden 5-7,10) vorinkubiert.

Um einen möglichen Effekt von TGF β -1 auf die Bindung der Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden EMSAs nach Inkubation von TFK-1 Zellen mit TGF β -1 über unterschiedliche Zeiträume durchgeführt. Es zeigten sich keine Veränderungen der DNA-Proteinkomplexformation (Abb. 15).

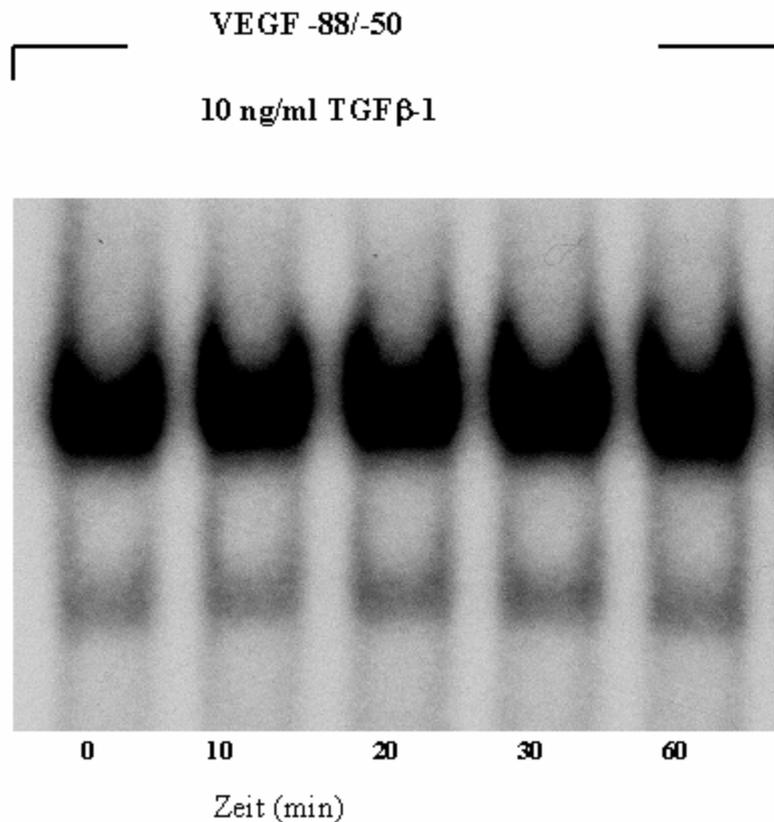


Abbildung 15: TFK-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml TGFβ-1 über 10, 20, 30 und 60 Minuten vor der Kernproteinextraktion stimuliert. Die Kernproteine wurden daraufhin mit ³²P markierten HVEGF -88/-50 Oligonukleotiden inkubiert. Gezeigt werden in allen EMSA Abbildungen repräsentative Autoradiographieresultate von 2 bis 3 unabhängigen Experimenten

4.8 TGFβ-1 stimuliert Sp1 abhängig die Transaktivierung des VEGF Promotors

Da die TGFβ-1 induzierte Stimulation der VEGF Transkription nicht von einer Veränderung der SP1 und Sp3 DNA-Proteinkomplexe begleitet war, wurden im folgenden die Effekte von TGFβ-1 auf die Sp1 oder Sp3 abhängige Transaktivierung untersucht. Es wurden transiente Transfektionen mit Konstrukten durchgeführt, in welchen entweder Sp1 oder Sp3 an die DNA bindende Domäne des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 fusioniert wurden. Durch Kotransfektion von Sp1/Gal4 oder Sp3/Gal4 mit einem Vektor in dem Gal4 an ein Luziferasereporter gen gekoppelt ist (Gal4/Luc) kann die Fähigkeit von Sp-Gal4-Fusionsproteinen untersucht werden, die Bindung von Gal4 an DNA zu aktivieren. Das heißt eine Verstärkung der transaktivierenden Wirkung von Sp1 oder Sp3 nach Behandlung mit TGFβ-1 sollte zu verstärkter Transkription des Gal4-Luciferase Konstruktes, gemessen an der

Luziferaseaktivität, führen. Die Kotransfektion von Sp1/Gal4 und Gal4/Luc führte zu einer substantiellen Zunahme der basalen Luziferaseaktivität (Abb. 16). Nach Behandlung mit TGF β -1 kam es zu einem 2,6-fachen Anstieg der Gal4/Luc Promotoraktivität, verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Die Kotransfektion von Sp3/Gal4 mit Gal/Luc führte zu einer basalen Promotoraktivität vergleichbar der Kotransfektion mit Sp1/Gal4, während Behandlung mit TGF β -1 keinen signifikanten Effekt auf die Sp3 vermittelte Transaktivierung von Gal4/Luc hatte (Abb. 16). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die transaktivierende Domäne von Sp1 die TGF β -1 induzierte transkriptionelle Aktivierung des humanen VEGF Promotors vermittelt.

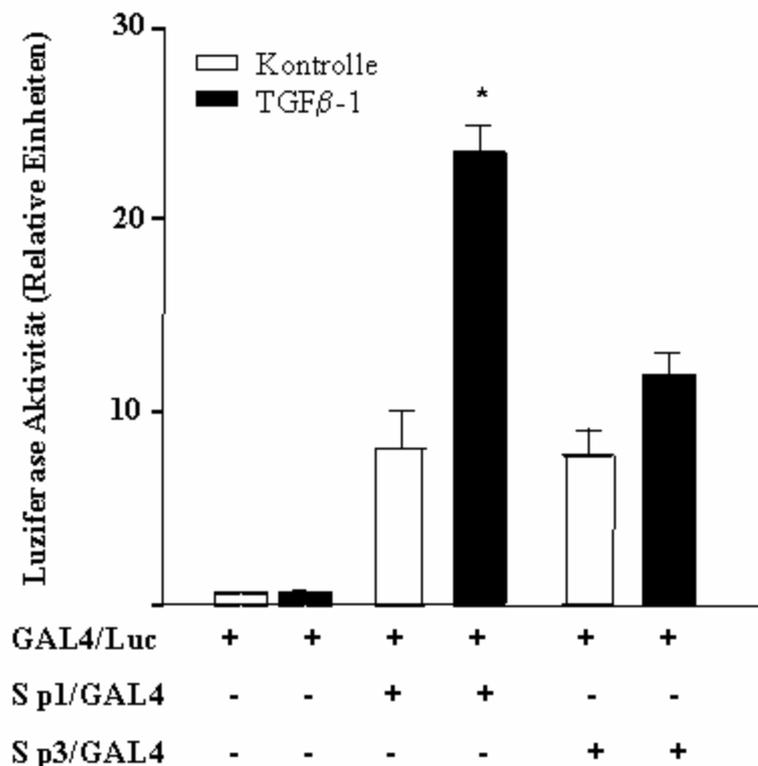


Abbildung 16: TGF β -1 stimuliert Sp1 abhängig die Transaktivierung des VEGF Promotors. Gal4/Luc wurde entweder mit Gal4/Sp1 oder Gal4/Sp3 Expressionskonstrukten in TFK-1 Zellen kotransfiziert. Parallelkulturen wurde nur mit Gal4/Luc als Negativkontrollen transfiziert. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml TGF β -1 inkubiert oder unbehandelt gelassen, nach 24 Stunden geerntet und auf die Luziferaseaktivität untersucht (Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Versuchen; * $p < 0,05$).