

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der  
Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Molekulare Charakterisierung der Effekte des transformierenden  
Wachstumsfaktors TGF $\beta$ -1 auf die Expression des vaskulären  
endothelialen Wachstumsfaktors VEGF im humanen cholangiozellulären  
Karzinom**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -

Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Benckert

aus Kiel

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. S. Jonas  
2. Prof. Dr. med. F. von Weizäcker  
3. Prof. Dr. med. C. A. Redaelli

Datum der Promotion: 17.03.2006

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Das humane cholangiozelluläre Karzinom (CCC)	6
1.2	Angiogenese und “angiogenic switch“	6
1.3	Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF)	7
1.4	Transforming growth factor $\beta$ -1 (TGF $\beta$ -1)	8
1.5	Zielsetzung	9
<b>2</b>	<b>Materialien</b>	<b>10</b>
2.1	Humane Gewebeproben	10
2.2	Zelllinien	10
2.3	Antikörper	10
2.4	DNA Konstrukte und Reporterplasmide	11
2.5	Plasmide und Herstellung der RNA-Sonden	12
2.6	Chemikalien und Materialien	13
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>14</b>
3.1	Immunhistochemie	14
3.2	in-situ Hybridisierung	15
3.3	Zellkulturen	16
3.4	ELISA	16
3.5	Polymerasekettenreaktion	17
3.5.1	PCR der VEGF Splice-Varianten	17
3.5.2	Quantitative kompetitive RT-PCR	17
3.6	Transiente Transfektionen	20
3.7	EMSA (electrophoretic mobility shift assay)	20
3.8	Statistische Auswertung	21
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
4.1	Expression von VEGF und seinen Rezeptoren im humanen CCC	22
4.2	Expression von TGF $\beta$ -1 und seinen Rezeptoren im CCC	24
4.3	TGF $\beta$ -1 stimuliert VEGF in humanen CCC Zelllinien	26
4.4	Molekulare Mechanismen der TGF $\beta$ -1 induzierten VEGF Expression	30

4.5	TGF $\beta$ -1 responsive Elemente im VEGF Promotor	33
4.6	Sp1 Bindungssequenzen im VEGF Promotor sind essentiell für TGF $\beta$ -1 Responsivität	35
4.7	Sp1 und Sp3 binden im Bereich der -85 bis -50 Region des VEGF Promotors	37
4.8	TGF $\beta$ -1 stimuliert Sp1 abhängig die Transaktivierung des VEGF Promotors	42
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>59</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>60</b>
<b>11</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>61</b>
<b>12</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>62</b>

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

APAAP	Alkalische Phosphatase/Anti-alkalische Phosphatase-Komplex
bp	Basenpaare
CCC	Humanes cholangiozelluläres Karzinom
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium (Zellmedium)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor, epithelialer Wachstumsfaktor
Egr	Early growth response, Transskriptionsfaktor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
FGF	Fibroblast growth factor, Fibroblastenwachstumsfaktor
FKS	Fetales Kalbserum
flk-1	Fetal liver kinase 1
flt	Fms liketyrosine kinase
HGF	Hepatocyte growth factor, Hepatozytenwachstumsfaktor
MVD	Mikrovaskuläre Gefäßdichte
PBS	Phosphate buffered saline, Standard Phosphatpuffer
PDGF	Platelet derived growth factor
PF-4	Platelet factor 4
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellmedium)
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion
Smad	Similar-mothers against decapentaplegic, Transkriptionsfaktor,
Sp	Transkriptionsfaktor, zuerst isoliert in Sephacryl und Phosphocellulose Säulen
TGF $\alpha/\beta$	Transforming growth factor $\alpha/\beta$ , transformierender Wachstumsfaktor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TSP-1	Thrombospondin-1
T $\beta$ RI/II	Transforming growth factor receptor type I/II
VEGF	Vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das humane cholangiozelluläre Karzinom (CCC)**

Das humane cholangiozelluläre Karzinom (CCC) repräsentiert etwa 10% der primären Lebermalignome und ist nach dem hepatozellulären Karzinom der zweithäufigste primäre Lebertumor. Ursprünglich wurden unter dem Begriff des CCCs nur die primären Malignome der intrahepatischen Gallengänge zusammengefasst. Aktuellere Klassifikationen hingegen beziehen die Malignome der extrahepatischen Gallenwege mit ein und unterteilen das CCC in Tumoren der intrahepatischen, perihilären und distal extrahepatischen Gallenwege<sup>1</sup>. Die operative Resektion stellt die einzige potentiell kurative Therapieoption dar<sup>2</sup>. Weder chemo- noch strahlentherapeutische Therapieansätze konnten bisher die Überlebensraten dieser Tumorpatienten signifikant verbessern<sup>3</sup>. Trotz erweiterter Indikationsstellung und Zunahme der Radikalität in der chirurgischen Therapie durch optimierte Leberresektionsverfahren ist die Prognose weiterhin sehr schlecht. Die mediane Überlebenszeit in der Gruppe der operierten Patienten beträgt 11 Monate, während Patienten mit einem nicht-resektablen Tumor nach durchschnittlich 4 Monaten versterben<sup>4</sup>.

Diese Daten verdeutlichen die zwingende Notwendigkeit, durch ein vertieftes Verständnis der Ätiopathogenese des humanen CCC neue Ansätze für innovative Therapiestrategien zu entwickeln. In diesem Zusammenhang deuten zahlreiche präklinische und erste klinische Studien der letzten Jahre daraufhin, dass eine Inhibition der Tumor assoziierten Neoangiogenese eine potentiell effektive und nebenwirkungsarme Therapiestrategie zur Behandlung solider epithelialer Tumoren darstellen könnte<sup>5;6</sup>.

## **1.2 Angiogenese und “angiogenic switch“**

Die Neubildung von Gefäßen (Neoangiogenese) ist eine essentielle Voraussetzung für das Wachstum und die Metastasierung solider Malignome (Übersichten<sup>6-11</sup>). Während in nichttransformierten Geweben Neoangiogenese durch eine balancierte Expression von proangiogenen (z.B. VEGF, FGF, EGF, TGF $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1b,-4,-8, HGF, PDGF, TGF $\alpha$ , Vitronectin) und antiangiogenen Faktoren (z.B. TSP-1, IFN- $\alpha$ , Angiostatin, Endostatin, IL-10,-12, PF-4) reguliert wird, kann diese Balance in transformierten Geweben zugunsten proangiogener Faktoren verschoben sein<sup>12</sup>. Dieses Phänomen wird als “angiogenic switch“ bezeichnet (Übersichten<sup>6;13</sup>).

### 1.3 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF)

VEGF gilt als einer der zentralen Faktoren für die tumorassoziierte Neoangiogenese<sup>14-16</sup>. VEGF ist ein Heparin-bindendes, dimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 46 kDa. Durch alternatives Splicing des primären Transkriptes eines einzelnen, etwa 14 kB umfassenden VEGF-Gens entstehen mindestens fünf VEGF-Isoformen mit unterschiedlichen Aminosäurelängen (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub>)<sup>17,18</sup>. Im Rahmen der malignen Transformation kommt es zu einer Überexpression von VEGF in einer Reihe von Tumoren. Die Regulation der VEGF-Expression unterliegt einer komplexen Kontrolle unterschiedlicher pathogenetischer Faktoren: (i) verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie z. B. EGF, PDGF, IL-6 und TGFβ-1 stimulieren VEGF *in vitro*<sup>19-21</sup>; (ii) tumorassoziierte genetische Alterationen, wie z. B. K-ras aktivierende Mutationen oder inaktivierende Mutationen von p53 führen zur Überexpression von VEGF<sup>22,23</sup> und (iii) Verminderung des lokalen Sauerstoffpartialdrucks (Hypoxie) führt zur einer Induktion der VEGF Genexpression<sup>24-27</sup>.

VEGF ist ein überwiegend parakrin wirkender, endothelzellspezifischer Wachstumsfaktor, der zahlreiche Endothelzellfunktionen, wie beispielsweise Proliferation, Migration und Gefäßpermeabilität reguliert<sup>23,28</sup>. Die fünf verschiedenen Isoformen propagieren in unterschiedlicher Weise, koordiniert die Neovaskularisation von Tumoren<sup>29</sup>. Die biologische Wirkung von VEGF wird über spezifische Oberflächenrezeptoren der Tyrosinkinase-Superfamilie VEGFR-1 (flt-1) und VEGFR-2 (KDR/flk-1) vermittelt<sup>14</sup>, die nahezu exklusiv auf Endothelzellen exprimiert werden<sup>15,30</sup>. Die Bindung von VEGF an VEGFR-1 und VEGFR-2 induziert eine Homodimerisierung, wodurch die Rezeptordimere intrazellulär durch Autophosphorylierung der Tyrosinkinasedomänen aktiviert werden. VEGFR-2 vermittelt überwiegend die VEGF-induzierten mitogenen und chemotaktischen Effekte sowie Veränderungen der Endothelzellmorphologie. Diese Prozesse spielen eine wesentliche Rolle im Rahmen der Neoangiogenese<sup>15,30</sup>. Im Gegensatz hierzu ist VEGFR-1 nicht in der Lage, Proliferation oder Chemotaxis in Endothelzellen zu induzieren. Interessanterweise induziert dieser Rezeptor aber die Migration von Monozyten und scheint darüber hinaus notwendig zu sein, um eine maximale VEGF-Antwort in Endothelzellen zu vermitteln<sup>15,30</sup>. Die biologische Bedeutung des VEGF/VEGF-Rezeptorsystems wird durch die Beobachtung belegt, dass VEGF in einer Reihe von humanen Malignomen und Metastasen überexprimiert wird, wobei das Ausmaß der Überexpression sowohl mit dem Vaskularisierungsgrad als auch mit der Tumorgröße und dem Metastasierungsverhalten korreliert<sup>23,28,30</sup>. Daher bietet sich das

VEGF/VEGF-Rezeptorsystem als potentieller Ansatz für eine antiangiogene Therapiestrategie an. Zahlreiche präklinische Studien konnten zeigen, dass das Tumorwachstum verschiedener Malignome sowie Metastasenbildung durch Injektion eines neutralisierenden anti-VEGF-Antikörpers oder Expression einer dominant-negativen Mutante des Typ 2 VEGF-Rezeptors (VEGFR-2) oder Inhibition der VEGF Rezeptorkinase deutlich inhibiert werden kann<sup>31-35</sup>.

Die ersten antiangiogenen therapeutischen Strategien finden sich derzeit in klinischer Erprobung<sup>36</sup>. Über die biologische Bedeutung sowie die Regulation von VEGF und seiner Rezeptoren speziell im humanen CCC liegen bisher wenige und zum Teil konträre experimentelle Daten vor<sup>37;38</sup>. Insbesondere bleibt derzeit unklar, welche Faktoren zu einer Induktion der VEGF Expression im humanen CCC beitragen und für den “angiogenic switch“ mitverantwortlich sind.

#### **1.4 Transforming growth factor $\beta$ -1 (TGF $\beta$ -1)**

TGF $\beta$ -1 ist ein ubiquitär vorkommendes Zytokin, das in drei Isoformen exprimiert wird, die sich hinsichtlich ihrer Rezeptor-Bindungsaffinität unterscheiden<sup>39;40</sup>. TGF $\beta$ -1 wird von den Zellen als inaktives Propeptid sezerniert (latentes TGF $\beta$ -1) und in der extrazellulären Matrix als Komplex, bestehend aus dem inaktiven Propeptid und einem TGF $\beta$ -Bindungsprotein gespeichert<sup>40</sup>. Die biologisch aktive Form besteht aus einem Homodimer von je 112 Aminosäuren. *In vivo* wird aktives TGF $\beta$ -1 entweder durch das Matrixglykoprotein Thrombospondin-1 von dem inaktiven Komplex gelöst<sup>41</sup> oder durch Proteasen wie Kathepsin und Plasmin abgespalten<sup>42</sup>. Die biologische Wirkung von TGF $\beta$ -1 wird durch zwei spezifische Zelloberflächenrezeptoren (T $\beta$ RI und T $\beta$ RII) vermittelt. Ligandenbindung initiiert die Dimerisierung dieser Rezeptoren, die dann als Serin/Threonin-Kinasen Effektor-Moleküle die Smad-Familie von Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und so aktivieren. Mit dem TGF $\beta$ -Rezeptor sind Smad-2 und Smad-3 direkt assoziiert, die daher auch als Rezeptor-regulierte Smads (R-Smads) bezeichnet werden. Nach Aktivierung bilden sie mit zytosolischem Smad-4 heteromultimere Komplexe, die dann in den Zellkern translozieren und dort die Expression von TGF $\beta$ -1 Zielgenen steuern können (Übersichten<sup>39;43</sup>). Zu diesen zählen unter anderem weitere Mitglieder der Smad-Familie, Smad-6 und Smad-7, die im Sinne eines negativen Feedbacks durch kompetitive Bindung an den Typ I Rezeptor die TGF $\beta$ -Signalkette unterbrechen können (Übersichten<sup>44-46</sup>). Vereinfacht führt TGF $\beta$ -1 in Zellen epithelialen Ursprungs zu einer Wachstumsinhibition, während Zellen mesenchymalen Ursprungs in ihrem Wachstum



stimuliert werden. Diese Zuordnung trifft allerdings in transformierten Zellen häufig nicht mehr zu. So wird in Karzinomzellen häufig ein Verlust oder auch die Umkehrung der antiproliferativen Wirkung von TGF $\beta$ -1 beobachtet. Für verschiedene gastrointestinale Neoplasien konnte belegt werden, dass TGF $\beta$ -1 die Tumorprogression fördert. Hierzu zählen Pankreas-<sup>47</sup>, Kolon-<sup>48</sup> und, wie kürzlich berichtet auch cholangiozelluläre Karzinome<sup>49</sup>. Für den Verlust der mitoseinhibitorischen und proapoptotischen Effekte in Karzinomen scheinen inaktivierende Mutationen auf unterschiedlichen Ebenen der TGF $\beta$ -Signaltransduktionskaskade verantwortlich<sup>50;51</sup>. Häufig sind jedoch nur selektive Ausschnitte der TGF $\beta$ -1 vermittelten Signaltransduktion inaktiviert, wodurch Funktionen von TGF $\beta$ -1, die eine Tumorprogression fördern können, typischerweise erhalten sind. Hierbei erscheint die TGF $\beta$ -1 vermittelte Stimulation von VEGF und die resultierende Tumorneoangiogenese von zentraler Bedeutung<sup>52-56</sup>. Saadeh<sup>26</sup> und Frank<sup>56</sup> konnten in humanen Osteoblasten und humanen Keratinozyten eine Induktion des VEGF Proteins durch TGF $\beta$ -1 belegen. Zwei weitere Arbeiten, die eine TGF $\beta$ -1 vermittelte Induktion der VEGF-mRNA in murinen Osteoblasten<sup>54</sup> und in humanen Adenokarzinomzellen der Lunge<sup>21</sup> belegen konnten, lassen vermuten, dass die Mechanismen der TGF $\beta$ -1 vermittelte VEGF-Induktion auf prätranslationaler Ebene stattfinden. Es bleibt bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch unklar, durch welche molekularen Mechanismen TGF $\beta$ -1 zur Stimulation von VEGF führt. Chua et al<sup>54</sup> konnten eine transkriptionelle Aktivierung des VEGF Promotors in murinen Osteoblasten nachweisen. Ob dieser Mechanismus jedoch auch bei epithelialen Tumoren und im besonderen im humanen CCC bedeutsam ist, blieb bislang unklar.

## **1.5 Zielsetzung**

Die Expressionsmuster von VEGF, TGF $\beta$ -1 und den jeweiligen Rezeptoren im humanen cholangiozellulären Karzinom wurden bislang nicht untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Charakterisierung der Mechanismen der Expression von VEGF und TGF $\beta$ -1 *in vivo* sowie die Analyse möglicher funktioneller Interaktionen auf molekularbiologischer Ebene *in vitro*.

## 2 Materialien

### 2.1 Humane Gewebeproben

Die Gewebeproben intrahepatischer humaner CCCs stammen von 19 Patienten, die sich einer kurativen Leberteilresektion im Virchow Klinikum Berlin unterzogen. 15 Proben wiesen normales Lebergewebe an den Resektionrändern auf, welches als Kontrolle diente. Die Patienten hatten vor der Operation weder eine chemo-, noch eine strahlentherapeutische Behandlung erhalten.

### 2.2 Zelllinien

Name	Beschreibung	Herkunft	Kulturmedium
TFK-1	humane cholangiozelluläre Karzinomzelllinie	DSMZ GmbH, Braunschweig	DMEM+10% FKS
EGI-1	humane cholangiozelluläre Karzinomzelllinie	DSMZ GmbH, Braunschweig	RPMI+10% FKS

**Tabelle 1: Zelllinien**

### 2.3 Antikörper

Zur Endothelzellfärbung wurde ein monospezifischer (Maus Anti-Mensch) Antikörper, anti-CD31 Antikörper (Dianova, Hamburg), verwendet.

Folgende polyklonale Antikörper (Kaninchen Anti-Mensch) wurden zum immunhistochemischen Nachweis von VEGF, TGF $\beta$ -1 und der jeweiligen Rezeptoren verwendet: anti-VEGF-Antikörper, anti-VEGFR-1-Antikörper, anti-VEGFR-2-Antikörper, anti-TGF $\beta$ -1-Antikörper, anti-T $\beta$ RI- und anti-T $\beta$ RII-Antikörper (alle Santa Cruz, Kalifornien).

Folgende polyklonale Antikörper wurden für Transkriptionsfaktorbindungsstudien mittels EMSA verwendet: anti-Sp-1-Antikörper, anti-Sp-3-Antikörper, anti-AP-2-Antikörper und anti-EGR-1-Antikörper (alle SantaCruz, Kalifornien). Folgender polyklonaler, panspezifischer Antikörper wurde für die TGF $\beta$ -1 Immunneutralisationsexperimente verwendet: anti-TGF $\beta$ -1-Antikörper (R&D Systems, Minneapolis).

## 2.4 DNA Konstrukte und Reportergenplasmide

Die Serie der VEGF 5'Deletionskonstrukte sind alle in das promotorlose Luziferasereporter-Gen-Plasmid pAH1409<sup>57</sup> eingefügt. Um potentielle hVEGF regulierende Elemente in einem heterologen Promotorsystem zu charakterisieren wurde das Plasmid pT81, in welches ein Oligonucleotid bestehend aus der Region hVEGF -88 bis -50 bp subkloniert wurde, verwandt<sup>58</sup>. Dieser Vektor enthält das Luziferase-Gen aus *P.pyralis*, dem ein 133 bp langes Fragment des enhancerlosen viralen Thymidinkinase-Promotors vorgeschaltet ist. Diese Experimente sind erforderlich, um den Nachweis der regulatorischen Funktion der eingegrenzten DNA Bereiche unabhängig vom Kontext des VEGF Promotors zu führen.

hVEGF (-2018/+50)-Luc	Prof. Dr. Georg Finkenzeller, Freiburg
hVEGF (-1268/+50)-Luc	Prof. Dr. Georg Finkenzeller, Freiburg
hVEGF (-789/+50)-Luc	Prof. Dr. Georg Finkenzeller, Freiburg
hVEGF (-414/+50)-Luc	Prof. Dr. Georg Finkenzeller, Freiburg
hVEGF (-267/+50)-Luc	Prof. Dr. Georg Finkenzeller, Freiburg
hVEGF (-85/+50)-Luc	Prof. Dr. Georg Finkenzeller, Freiburg
hVEGF (-52/+50)-Luc	Prof. Dr. Georg Finkenzeller, Freiburg
hVEGF (-88/+50)-Luc: EGR-1-Mut	Prof. Dr. Georg Finkenzeller, Freiburg
hVEGF (-88/+50)-Luc: Sp1-Mut	Prof. Dr. Georg Finkenzeller, Freiburg
pTK-Luc/hVEGF (-88/-50)	Dr. Schäfer, Berlin
pTK-Luc/hVEGF (-50/-50)	Dr. Schäfer, Berlin
pTK-Luc/hVEGF (-76/-50)	Dr. Schäfer, Berlin
pTK-Luc/hVEGF (-63/-50)	Dr. Schäfer, Berlin
pTK-Luc/hVEGF (-88/-59)	Dr. Schäfer, Berlin
Gal4/Luc	Prof. Dr. Guntram Suske, Marburg
Sp1/Gal4	Prof. Dr. Guntram Suske, Marburg
Sp3/Gal4	Prof. Dr. Guntram Suske, Marburg

**Tabelle 2: DNA Konstrukte und Reportergenplasmide**

## 2.5 Plasmide und Herstellung der RNA-Sonden

“Sense“ und “Antisense“ <sup>35</sup>S-cRNA Sonden wurden aus humaner cDNA, die in einen pBlueskript KS Vektor eingebaut wurde, erzeugt:

<b>cDNA-Sonde</b>	<b>Basenpaare</b>	<b>Restriktionsenzym</b>	<b>Polymerase</b>
VEGF <sub>121</sub> -sense-	517	EcoRI	T7
VEGF <sub>121</sub> -antisense-	517	BamHI	T3
VEGFR-1-sense-	1080	XbaI	T3
VEGFR-1-antisense-	1080	EcoRI	T7
VEGFR-2-sense-	1400	Sa11	T3
VEGFR-2-antisense-	1400	Not I	T7

**Tabelle 3: Plasmide und Herstellung der RNA-Sonden**

Nach Linearisierung der Plasmide durch die genannten Restriktionsenzyme und Sicherstellung des vollständigen Verdau per Gelelektrophorese wurden die cDNA Sequenzen mittels der jeweiligen Polymerasen in “Sense“ und “Antisense“ RNA Sonden transkribiert. Als “Antisense“-Sonde wurde das Transkript bezeichnet, welches komplementär zum gesuchten RNA-Transkript war. Die Transkription der Gensonden mit <sup>35</sup>S-UTP erfolgte nach dem Protokoll von Milani et al<sup>59</sup>. Um ein besseres Eindringen der <sup>35</sup>S-markierten Sonden in das Gewebe zu erreichen, war es notwendig, die Gesamtlänge der Transkription auf durchschnittlich 150 Nukleotide zu reduzieren. Dazu wurde die RNA alkalisch hydrolysiert. Das in 50 µl gelöste Transkript wurde mit 50 µl Hydrolysepuffer (80mM NaHCO<sub>3</sub>, 120 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10mM DTT) versetzt und bei 60°C für eine nach Transkriptlänge vorgegebene Zeit inkubiert. Die Hydrolyse wurde durch Zusatz von 100 µl Neutralisationspuffer (200 mMNa-Acetat,1% Essigsäure, 10mM DTT) beendet. Nach Ethanolpräzipitation wurde das Transkript in DTT gelöst und bei -80°C gelagert. Die durchschnittlich erreichte Aktivität der Transkripte lag zwischen 1,3 und 2x 10<sup>6</sup> cpm/µl.

## 2.6 Chemikalien und Materialien

Chemikalienname	Hersteller
DMEM	Gibco BRL, Berlin
RPMI 1640	Gibco BRL, Berlin
PBS	Gibco BRL, Berlin
UltraCulture Medium	BioWhittaker, Verviers, Belgien
FKS trypsin/EDTA	Biochrom KG, Berlin
Penicillin, Streptomycin	Biochrom KG, Berlin
Oligo(dt) primer, Restriktionsenzyme	BRL, Bethesda, USA
<i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Omniscript Reverse Transkriptase Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Colorimetric Bradford protein assay	BioRad Laboratories, Hercules, USA
RNAzol <sup>TM</sup> B	Wak-Chemie Medical, Bad Soden
Aceton	Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
Äthanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
Dual Luciferase Reporter Assay Kit	Promega, Mannheim
Effectene Transfection Reagenz	Qiagen, Hilden, Deutschland
Hämatoxylin (HEMA)	Dako, Glostrup, Dänemark
Hybond-N Filter	Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig
Dithiotreitol (DTT)	Boehringer Mannheim GmbH
BSA Rinderserum	Behringwerke, Berlin
Fotoemulsion (LM-1)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Entwickler D 19	Kodak, Hamstead, UK
ATP, GTP, CTP, Ficoll, Dextransulfat	Pharmacia fine Chemical, Uppsala, Schweden
[ <sup>35</sup> S]-UTP	New England Nuclear-Du Pont, Dreireich
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	Amersham Pharmacia, Braunschweig

**Tabelle 4: Chemikalien und Materialien**

### **3 Methoden**

#### **3.1 Immunhistochemie**

Die immunhistochemischen Untersuchungen der chirurgisch resezierten, in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten CCC Gewebeproben wurde mittels der APAAP Methode durchgeführt. Serielle 5µm dünne Paraffingewebe-Schnitte wurden zunächst zweimal für 15 Minuten in Xylol entparaffiniert, dann in einer Alkoholreihe, rehydriert (je 10 Minuten in 100%, 96%, 70% und 50% Äthanol und Aqua bidest). Anschließend wurde eine Antigendemaskierung („Antigenretrieval“) mittels Wasserbadinkubation bei 95°C in Citratpuffer über 45 Minuten durchgeführt. Danach wurden die Präparate mit den jeweiligen Antikörper in folgenden Verdünnungen bei 4°C über Nacht inkubiert: anti-VEGF-Antikörper 1:200, anti-VEGFR-1-Antikörper 1:100, anti-VEGFR-2-Antikörper 1:200, anti-TGFβ-1-Antikörper 1:100, anti-TβRI- und anti-TβRII-Antikörper 1:200. Die Brückenantikörper (Kaninchen anti-Maus), sowie der APAAP-Komplex (Maus anti-Kaninchen) wurden jeweils zweimal in einer Konzentration von 1:50 für 60 Minuten bei Raumtemperatur verwendet. Die Entwicklung der alkalischen Phosphatase Reaktion führt zu eine Rotfärbung derjenigen Zellen, die das entsprechende Antigen exprimieren. Um die Spezifität des immunhistochemischen Signals zu verifizieren wurde erstens: der Primärantikörper solange verdünnt bis keine Reaktion mehr stattfand; zweitens: Kaninchen-Antikörper als Primärantikörper verwendet. Die Endothelzellfärbung wurde mittels des monoklonalen anti-CD-31-Antiköpers in einer Verdünnung von 1:40 durchgeführt. Die mikrovaskuläre Gefäßdichte, als Maß für den Vaskularisierungsgrad des Tumors wurde nach der von Weidner et al<sup>60</sup> beschriebenen Methode bestimmt. Zunächst wurde unter dem Lichtmikroskop subjektiv das Areal mit der höchsten Gefäßdichte ausgewählt. Daraufhin wurden die Gefäße in einem Gesichtsfeld (200-fache Vergrößerung) ausgezählt. Hierbei wurde jede sich rot färbende Endothelzelle oder jeder zusammenhängende Endothelzellverband, der deutlich separiert von anderen Endothelzellen, Tumorzellen und Bindegewebe zu identifizieren war, als ein Mikrogefäß gewertet. Die Angabe der mikrovaskulären Gefäßdichte (MVD) erfolgte als Anzahl der Gefäße, die in einem ausgesuchten 200-fach vergrößertem Gesichtsfeld identifiziert wurden. Je Gewebeprobe wurden zumindest drei Bestimmungen von jeweils zwei erfahrenen Untersuchern - ohne Kenntnis des Zählresultates - durchgeführt.

### 3.2 *in-situ* Hybridisierung

25 µl eines Hybridisierungsgemisches, das  $2 \times 10^5$  cpm /µl der  $^{35}\text{S}$ -markierten Sonde in einer Lösung aus 50 % Formamid, 12,5 % Dextransulfat, 10 mM Dithiothreitol, 10mM Tris HCl (pH 7,5), 10 mM  $\text{NaPO}_4$ , 0,3 M NaCl, 5mM EDTA pH 7,5, 0,002 % Ficoll 400, 0,002 % Polyvinylpyrrolidon, 0,002 % Rinderalbumin, 0,2 % w/v Hefe-tRNA enthielt, wurden auf den Gewebeschnitt aufgetragen und nach Abdeckung mit silikonisierten Deckgläschen 16 bis 18 Stunden in einer feuchten Kammer bei 50 °C hybridisiert. Es folgte ein Waschprozeß über 5 Stunden bei 52°C, zur Entfernung von Deckgläsern, Dextransulfat, tRNA und überschüssiger RNA Transkripte. Die Waschlösung wurde nach 1 Stunde gewechselt. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden die Objektträger mit 0,02 mg/ml RNase A in 10 mmol Tris HCl, 1mM EDTA, 0,5 M NaCl, pH 7,5 bei 37°C 30 Minuten gewaschen, gefolgt von einem weiteren Waschschritt bei gleicher Temperatur mit der gleichen Pufferlösung. Danach wurden die Schnitte jeweils 20 Minuten in  $2\times\text{SSC}$  und  $0,1\times\text{SSC}$  gewaschen. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte 2 Stunden luftgetrocknet. Die dehydrierten, luftgetrockneten Schnitte wurden in eine 1:1 mit Aqua dest. verdünnte, auf 42°C erwärmte, Amersham IL-5 Autoradiographielösung eingetaucht. Nach 30 Minuten Lufttrocknung wurden sie bis zur Entwicklung in mit Calciumcarbonat trockengehaltenen Kartellboxen gelagert. Die autoradiographierten Objektträger wurden bei Zimmertemperatur in Küvetten mit Kodak D 19 Entwicklerlösung 3 Minuten, 1%-iger Essigsäure 30 s und mit dem Kodakfixierbad für weitere 3 Minuten entwickelt. Danach wurden die Schnitte ausgiebig mit Leitungswasser gespült, ca. 1 Minute in Mayer-Hämalaun gegengefärbt und mit 50°C warmer Kaisers-Glycerin-Gelatine eingebettet. Zur Auswertung wurden die Körner pro Zellen gleichen Typs in jeweils 5 Gesichtsfeldern von  $0,625 \text{ mm}^2$  Größe ausgezählt. Als spezifisches positives Signal wurde definiert, wenn das Signal der Antisense-Probe über dem der Sense-Probe lag. Es wurden immer drei voneinander unabhängige Versuchsreihen durchgeführt.

### 3.3 Zellkulturen

Die humanen cholangiozellulären Zelllinien TFK-1 und EGI-1 wurden als subkonfluente Monolayerkulturen in ihren jeweiligen Kulturmedien (RPMI 1640 oder DMEM), versetzt mit 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, in Zellkulturflaschen oder Petrischalen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Mittels Trypanblaufärbung wurde eine Zellvitalität von 95% sichergestellt, bevor die Zellen für Experimente verwendet wurden. Die Experimente wurden in der logarithmischen Phase der Zellproliferation durchgeführt, in der Regel 24 Stunden nach Adhärenzzeit.

### 3.4 ELISA

Für die Bestimmung der VEGF Expression in den CCC Zelllinien wurden  $5 \times 10^4$  Zellen in 12-Loch-Platten über Nacht kultiviert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in serumfreies UltraCulture-Medium umgesetzt und für 24, 48, 72 und 96 Stunden mit 10 ng/ml TGFβ-1 inkubiert. Die so konditionierten Überstände wurden dann gesammelt, abzentrifugiert und bei -20°C bis zur Messung aufbewahrt. Die Zellen wurden in einem Lysepuffer (2 mM EDTA, 20 mM Tris, 150 mM NaCl<sub>2</sub>, 50 mM β-Glycerolphosphat, 0,5 NP40 1%, 1% Glycerin, 1 mM Natrium Orthovanate, 1mM DTT, 5 µg/ml Aprotinin, 10 mM Natriumfluorid, 2 µM Leupeptin, 2 mM Phenylmethylsulfonamid) aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 15000 g für 15 Minuten wurde die Proteinkonzentration kolorimetrisch mit Hilfe des Bradford-Protein-Assays bestimmt. Die Bestimmung der VEGF-Konzentration in Zellkulturüberständen und Zellysaten erfolgte mittels eines VEGF-spezifischen ELISA der Firma R&D Systems (Quantikine<sup>TM</sup>), entsprechend den Angaben des Herstellers. Die VEGF Konzentration wurde anschließend auf den gesamten Proteingehalt normalisiert.

Für die Bestimmung der TGFβ-1 Expression wurde entsprechend der Verfahrensweise der VEGF Bestimmung mittels eines kommerziellen TGFβ-1 ELISA der Firma R&D Systems (Quantikine<sup>TM</sup>) verfahren.



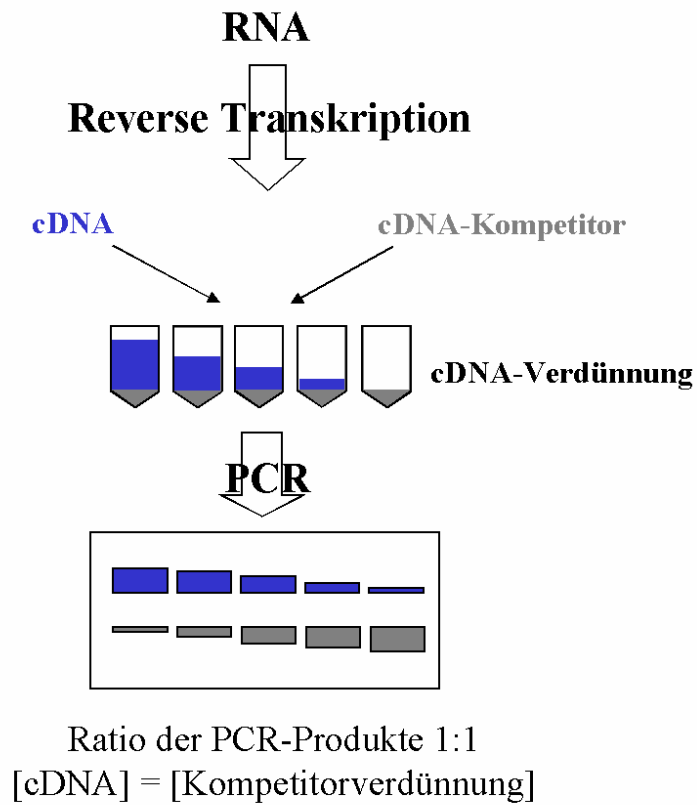
### 3.5 Polymerasekettenreaktion

#### 3.5.1 PCR der VEGF Splice-Varianten

Die RNA der beiden Zelllinien TFK-1 und EGI-1 wurde durch das kommerziell erhältliche RNAzol<sup>TM</sup>B Kit (Wak-Chemie Medical, Bad Soden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die reverse Transkription der isolierten RNA wurde in folgendem Ansatz durchgeführt: 2 µg totale RNA, 25 ng Oligo(dt)Primer, 1mM DTT, 6mM Mg<sup>2+</sup>, 500 µM der jeweiligen Desoxyribonukleinsäuren, 20 IE RNAsin und 5 IE muriner Leukämievirus reverser Transkriptase. Das jeweilige RT Produkt wurde dann durch PCR amplifiziert. Die VEGF Sense- (5'-CGAAGTGGTGAAGTTCATGGATG-3') und Antisense- (5'-TTCTGTATCAGTCTTTCCTGGT-3') VEGF-Primer wurden entsprechend bereits publizierter Sequenzen verwendet<sup>61</sup>. Diese Primer erkennen alle VEGF-Splice Varianten. cDNA's wurden mittels 1 IE *Taq*-DNA-Polymerase in folgendem Reaktionsansatz von 20µl amplifiziert: 10mM TrisHCL, 50mMKCL, 1,5mMMgCl<sub>2</sub>, 200 µM der jeweiligen Desoxyribonukleinsäuren und 40 pM des jeweiligen Primers (Reaktionsbedingungen: 40 Zyklen, Denaturierung bei 94°C für 1 Minute, Annealing bei 60°C für 1 Minute, Transkription bei 72°C für 1 Minute und zuletzt nochmalige Transkription bei 72°C für 10 Minuten). Jedes PCR Produkt (5µl ) wurde auf einem 1%-igem Agarosegel laufen gelassen und mit Ethidiumbromid visualisiert.

#### 3.5.2 Quantitative kompetitive RT-PCR

Um die Effekte von TGFβ-1 auf die VEGF-mRNA-Expression quantifizieren zu können, und somit zwischen transkriptioneller und posttranskriptioneller Induktion der VEGF Expression zu differenzieren, wurde mittels quantitativer-kompetitiver PCR die VEGF-mRNA-Expression zeit- und dosisabhängig nach Stimulation mit TGFβ-1 gemessen. Das Prinzip der quantitativen-kompetitiven RT-PCR beruht auf Ko-Amplifikation einer definierten Menge eines artifiziell hergestellten cDNA-Konstruktes (des sogenannten Kompetitors) mit seriellen Verdünnungen der zu untersuchenden cDNAs mittels eines spezifischen Primerpaares. Unter der Voraussetzung der identischen Amplifikationseffizienz der genspezifischen "wild-type" cDNA-Sequenz und des artifiziellen Kompetitor-konstruktes lässt sich durch densitometrischen Vergleich der beiden PCR-Produkte die Anzahl der genspezifischen Transkripte in dem ursprünglichen cDNA-Gemisch berechnen.



**Schema 1: quantitative-kompetitive RT-PCR**

Um eine möglichst gleiche Amplifikationseffizienz zu erreichen, wurden für die Amplifikation von VEGF<sub>165</sub> sowie des Kompetitor-Konstruktes jeweils gleiche Primerbindungsstellen verwendet und diese so ausgesucht, dass "wild-type"- sowie Kompetitor-Amplifikat in ihrer Länge maximal 20% Unterschied zeigen: Hierfür kamen folgende Primerpaare zur Anwendung:

	Primer (5'→3')	Lokalisation
β-Aktin	sense: TTCCTGGGCATGGAGTCCTGTGG	837 bis 859
	antisense: CGCCTAGAAGCATTGCGGTGG	1151 bis 1172
	mimic: TACCCTGGCATTGCCGACAGG	957 bis 977
VEGF <sub>165</sub>	sense: GCAAGACAAGAAAATCCCTGTGG	465 bis 488
	antisense: TTCTGTCGATGGTGATGGTGTGG	735 bis 757
	mimic: ATCCGCAGACGTGTAAATGTTCC	525 bis 548

**Tabelle 5: Primersequenzen für die quantitative kompetitive RT-PCR**

Die optimale Konzentration des Kompetitor-Konstruktes wurde experimentell in Vorversuchen festgelegt. Für das PCR-Produkt wurde das Primerpaar so gewählt, dass das PCR-Produkt mindestens eine Intron-Exon-Grenze überspannte, damit das Amplifikat der gewünschten Größe nur aus der in cDNA revers transkribierten mRNA, nicht aber aus genomischer DNA amplifiziert werden konnte. Bei der Verwendung eines cDNA-Kompetitors kann mittels kompetitiver PCR nur eine relative Bestimmung der mRNA-Expression im Verhältnis zu einem "house-keeping"-Gen erfolgen. Daher wurde zur Bestimmung der Menge der VEGF<sub>165</sub>-mRNA das β-Aktin-Gen als "house-keeping"-Gen parallel analysiert. Als Maß für die mRNA-Expression wurde schließlich das Verhältnis der VEGF spezifischen zu den β-Aktin spezifischen mRNA Transkripten angegeben. Nach reverser Transkription von 2 µg Gesamt-RNA aus den untersuchten Zellen wurden für die quantitative-kompetitive RT-PCR fünf serielle 1:3 Verdünnungen von den jeweiligen cDNAs und experimentell festgesetzte Mengen des jeweiligen Kompetitors mit dem ausgesuchten genspezifischen Primerpaar koamplifiziert. Die PCR-Reaktionen erfolgte für 30 Zyklen bei folgenden Amplifikationskonditionen: Denaturierung für 40 Sekunden bei 94°C, annealing für 60 Sekunden bei 63°C, Extension für 60 Sekunden bei 72°C und schließlich eine 7-minütige Extension bei 72°C. Je 15 µl pro PCR-Ansatz wurden in einem 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Hilfe von Ethidiumbromid visualisiert und densitometrisch ausgewertet. Bei einem densitometrischen Verhältnis von 1:1 der beiden Ko-Amplifikate ist die genspezifische cDNA-Konzentration gleich der zugesetzten Kompetitormenge. Mittels der so etablierten quantitativen-kompetitiven RT-PCR ließ sich nun in den cholangiozellulären Zelllinien die Zeit- und Dosisabhängigkeit der TGFβ-1 vermittelten Induktion auf die VEGF-mRNA-Expression untersuchen.

### 3.6 Transiente Transfektionen

24 Stunden vor Transfektion wurden jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät. Anschließend wurden mit dem Effectene Transfection Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers, je 2  $\mu\text{g}$  des jeweiligen VEGF-Deletionskonstruktes (siehe Kapitel Materialien) und 100 ng eines Renilla-Luziferase Plasmids kotransfiziert. Nach 24-stündiger Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 24 Stunden mit UltraCulture-Medium zur Regenerierung kultiviert. Danach folgte eine 24-stündige Inkubation mit TGF $\beta$ -1 und anschließend die Bestimmung der Luziferase Aktivität unter Verwendung des Luziferase Assay Systems der Firma Promega. Die Luziferase-Aktivität wurde durch Starten der Reaktion mit 100  $\mu\text{l}$  Luziferase-Assay-Substrat und Messung der Lumineszenz für 15 Sekunden mit Hilfe eines Luminometers (EG & G Berthold) quantifiziert. Dies diente der Normalisierung der Transfektionseffizienz. Die relative Luziferase-Aktivität errechnet sich aus dem Quotienten Reporter-gen-Luc-Aktivität/ Renilla-Luc-Aktivität (RLU).

### 3.7 EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

Diese Methode ermöglicht das Auffinden und die Quantifizierung DNA-bindender Moleküle mittels Bindung an eine radioaktiv markierte Sonde, da Protein-DNA-Komplexe im elektrischen Feld langsamer als reine DNA wandern. Zur Bestimmung der DNA Bindungsaktivität wurden nukleäre Proteinextrakte mit VEGF Oligonukleotiden, die die potentiellen Transkriptionsfaktorbindungssequenzen repräsentieren (hVEGF -88/-50), inkubiert. Folgende Oligonukleotide wurden mit [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig, Germany) durch eine T4 Polynukleotid Kinase Reaktion endständig markiert (5' ---> 3'): Sp1 consensus, attcgatcggggcggggc gagc; Sp1 mutant, attcgatcgggttcggggcgagc; AP2 consensus, gatcgaactgaccgcccg cggcccg; AP2 mutant, gatcgaactgaccgcttcggggcgt; Egr-1 consensus, ggatccagc gggggcgagcggggcgca; Egr-1 mutant, ggatccagctag ggcgagcggggcgca. Die DNA Bindungsreaktion mit den Kernextrakten wurde durchgeführt, indem 3  $\mu\text{g}$  Kernprotein mit 0,4 ng radioaktiv markierten Oligonukleotidproben und BSA, 60 mM KCl, 5 mM DTT, 1 mM ZnCl $_2$  und 10% Glycerol über 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Für die Konkurrenzexperimente wurden nicht markierte Oligonukleotide gleicher oder mutierter Sequenz (100-facher molarer Überschuss) 30 Minuten vor Zugabe der Probe zu der Reaktion hinzugefügt. Die Supershiftexperimente wurden durchgeführt indem jeweils 1  $\mu\text{l}$  anti-Sp1-, anti-Sp3-, anti-AP2- oder Egr-1-Antikörper 10 Minuten vor Zugabe der radioaktiv markierten

Proben mit den Kernproteinen inkubiert wurden. Der Protein-DNA-Komplex wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf 5% Polyacrylamid Gelen bei 200 V in 0,5x TBE elektrophoretisch getrennt. Die Gele wurden unter Vakuum getrocknet und bei -80°C unter Verwendung einer Verstärkerfolie (Kodak BioMax intensifying screen) entwickelt (Kodak BioMax MR-Film).

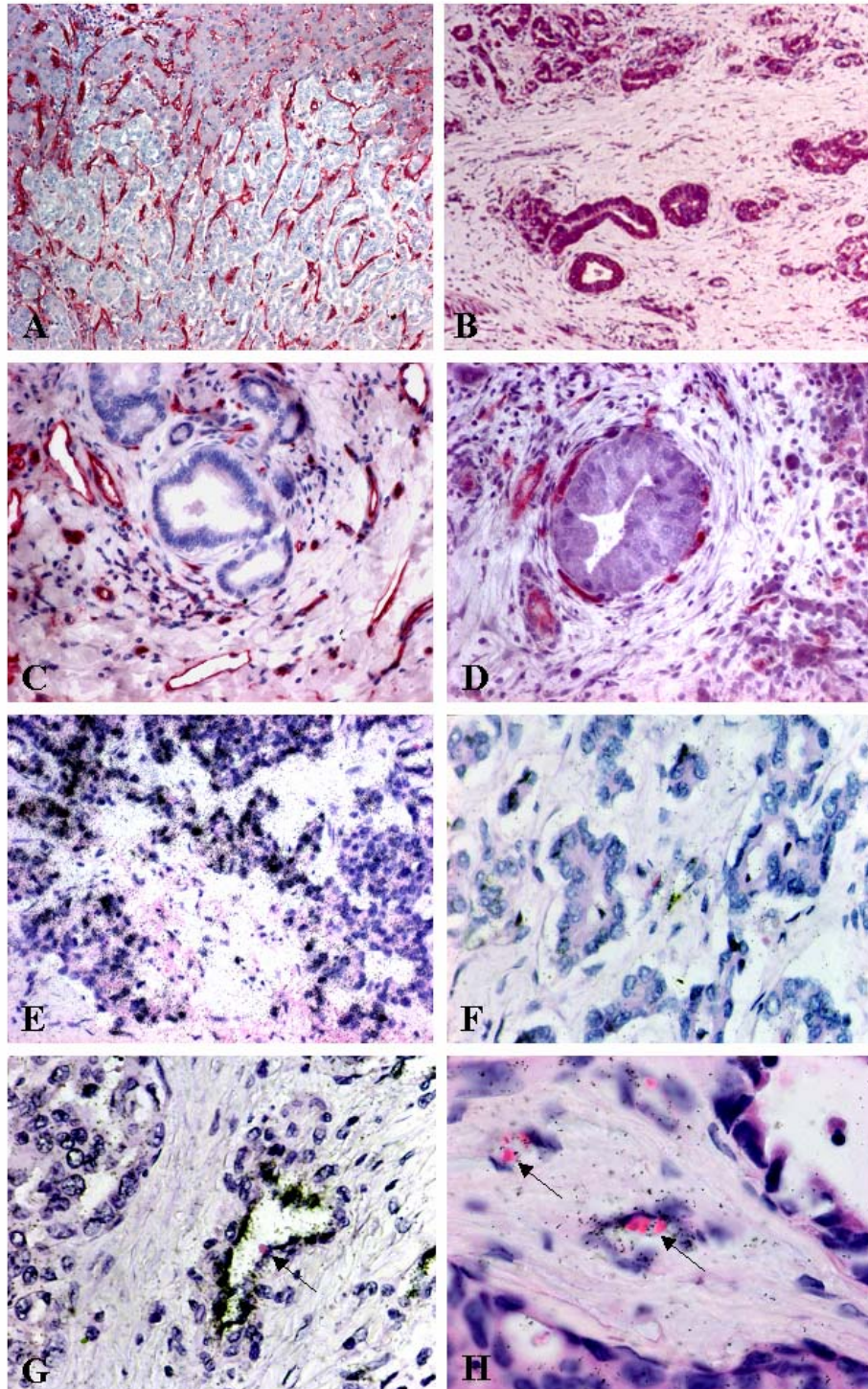
### **3.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte durch den “one-way analysis of variance“ Test (ANOVA) mittels GraphPad Statistical Software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Angegeben ist jeweils - soweit nicht gesondert erwähnt - der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression von VEGF und seinen Rezeptoren im humanen CCC

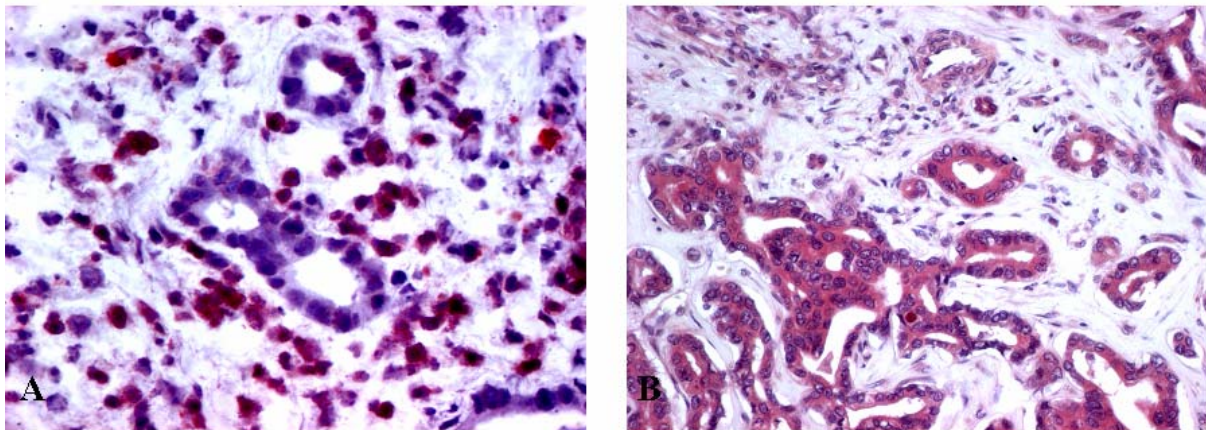
Zunächst wurde die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren in 19 Tumorproben von chirurgisch resezierten humanen CCCs untersucht. Mittels endothelzellspezifischer anti-CD31 Färbung, konnte eine deutliche Anzahl von Endothelien zwischen den Tumorzellverbänden nachgewiesen werden (Abb. 1A). Um den genauen Vaskularisierungsgrad der Tumorproben zu bestimmen, wurde die mikrovaskuläre Gefäßdichte (MVD) nach der Methode von Weidner et al<sup>60</sup> 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 <sup>35</sup>S-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 <sup>35</sup>S-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 $\beta$ -1 und seinen Rezeptoren im CCC

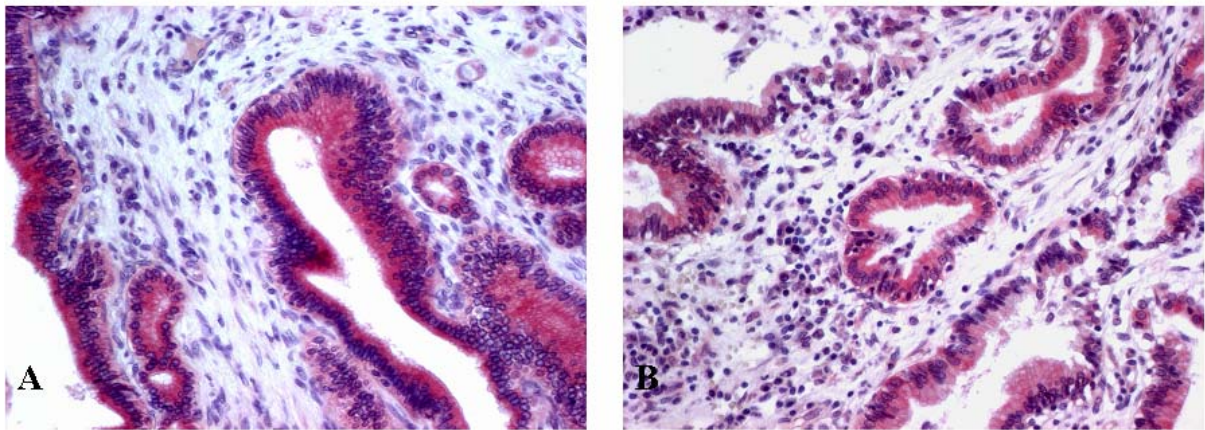
Um eine mögliche Interaktion von VEGF mit TGF $\beta$ -1 zu untersuchen, wurden nun die Expressionsmuster von TGF $\beta$ -1 und seinen Rezeptoren untersucht. Immunfärbungen mit einem polyklonalen anti-TGF $\beta$ -1 Antikörper zeigten, dass alle untersuchten CCC-Tumorproben TGF $\beta$ -1 exprimierten (19/19). Hierbei zeigten sich zwei verschiedenen Expressionsmuster: In 15 von 19 Präparaten wurde ein starkes TGF $\beta$ -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 $\beta$ -1 im humanen CCC.** Die Immunfärbungen mit TGF $\beta$ -1 Antikörpern zeigten zwei verschiedene Expressionsmuster: **(A)** Ein starkes TGF $\beta$ -1 Signal über Mesenchymzellen und ein schwaches Signal über Tumorzellen. **(B)** Starke TGF $\beta$ -1 Immunreaktivität über transformierten Zellen, kein Signal über umgebenden Mesenchymzellen. Vergrößerungen **(A)** 40x; **(B)** 20x.



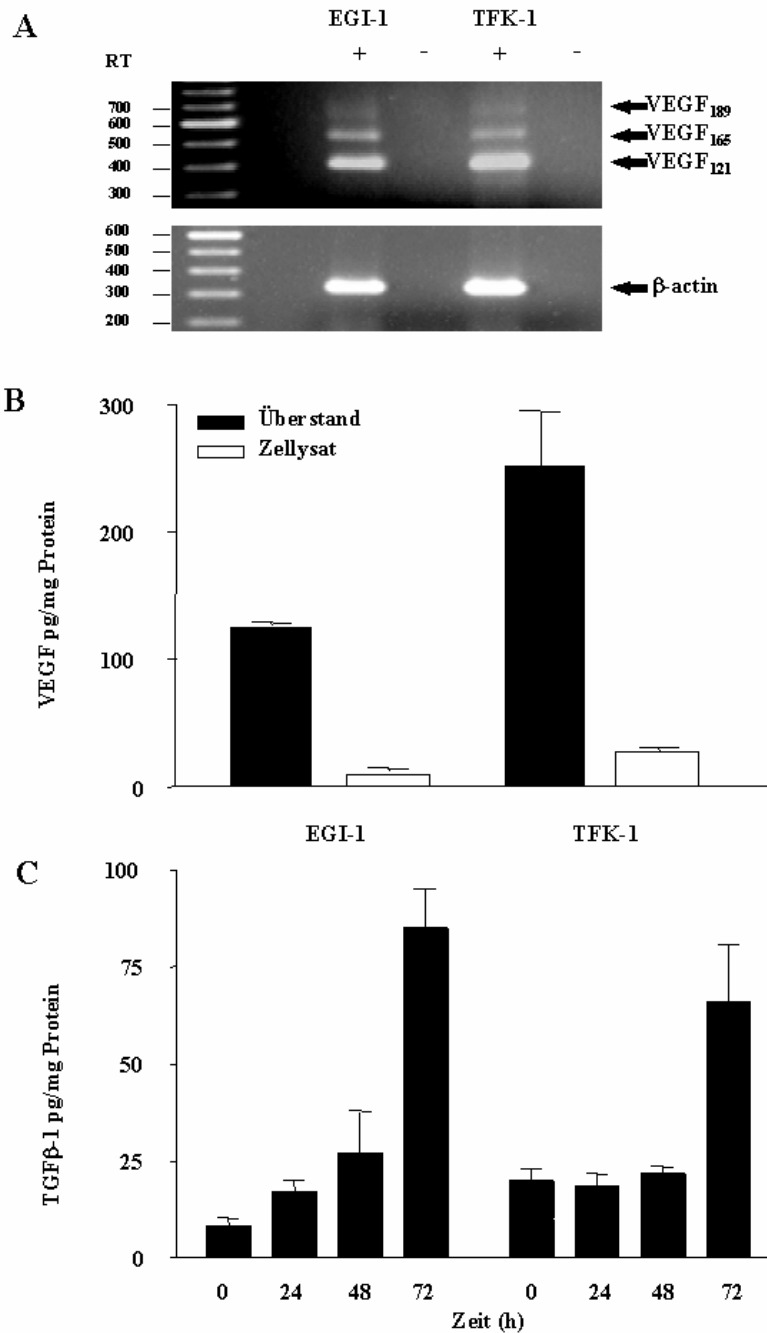
Die immunhistochemischen Untersuchungen der beiden TGF $\beta$ -1 Rezeptoren, T $\beta$ R-1 und T $\beta$ R-2, demonstrierten eine Expression der beiden Rezeptoren über Tumorzellen in allen untersuchten Tumorpräparaten (Abb. 3A,B). Diese Daten zeigten, dass die Mehrzahl der CCCs VEGF und TGF $\beta$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



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

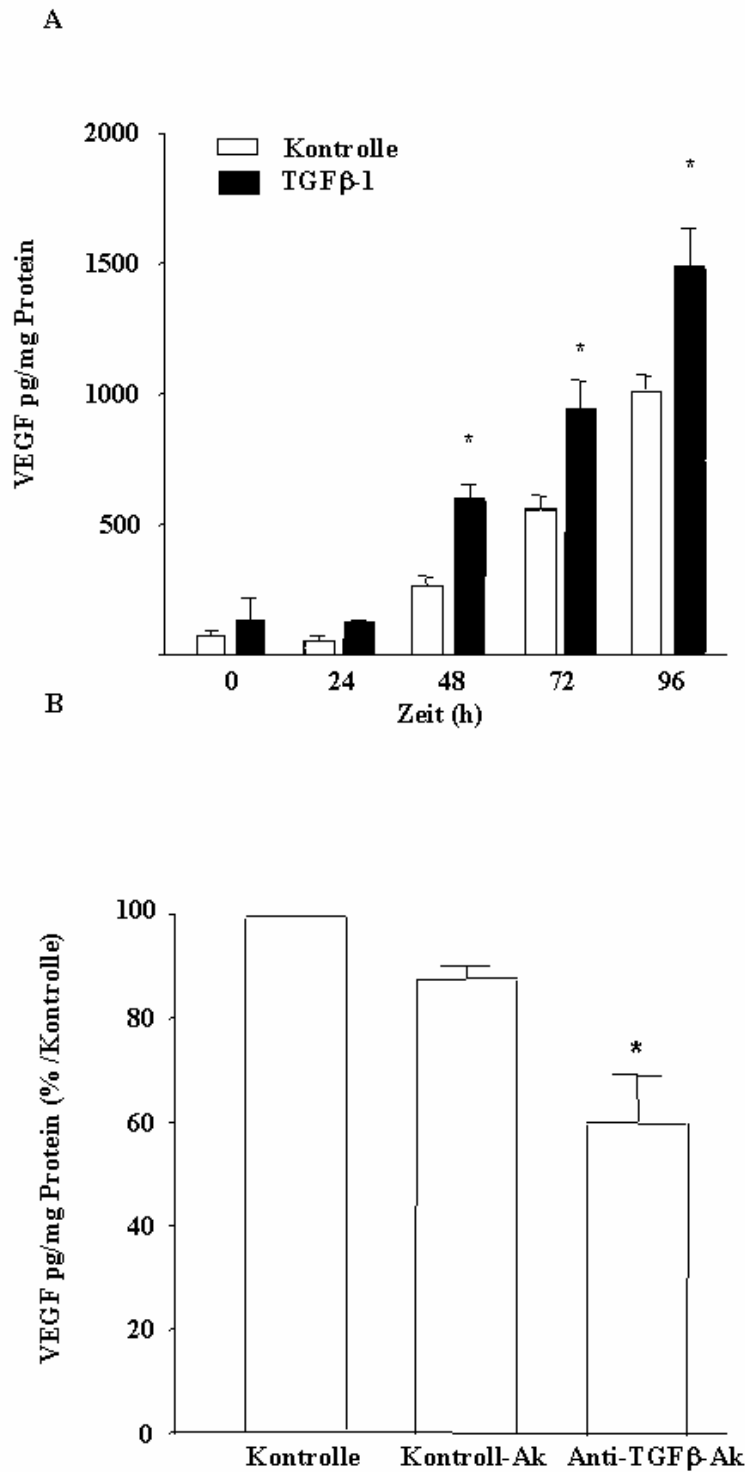
### 4.3 TGFβ-1 stimuliert VEGF in humanen CCC Zelllinien

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 VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> und VEGF<sub>189</sub> korrespondieren wurden amplifiziert (Abb. 4A). mRNA-Transkripte korrespondierend mit den VEGF Isoformen VEGF<sub>145</sub> und VEGF<sub>206</sub> 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<sub>121,165</sub> und VEGF<sub>189</sub> 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 $\beta$ -1 *in vivo* und *in vitro* legte die Möglichkeit einer autokrinen und/oder parakrinen VEGF Stimulation durch TGF $\beta$ -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 $\beta$ -1 zu einer Stimulation von VEGF Protein führte. TFK-1 Zellen wurden mit 10 ng/l TGF $\beta$ -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 $\beta$ -1 Stimulation beobachtet werden (Abb. 5A). Die VEGF Konzentration nahm von  $10 \pm 2$  pg/mg Protein auf  $1006 \pm 52$  pg/mg Protein nach 96 Stunden Inkubation zu. Eine signifikante Stimulation von VEGF durch TGF $\beta$ -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 $\beta$ -1 zu untersuchen, wie sie durch die Expressionsmuster von TGF $\beta$ -1 *in vivo* und *in vitro* nahegelegt wurde, sind im folgenden die Effekte eines neutralisierenden TGF $\beta$ -Antikörpers auf die VEGF Expression untersucht worden. TFK-1 Zellen sind über 96 Stunden mit neutralisierendem TGF $\beta$ -Antikörper inkubiert worden, um die Aktivität von endogenem TGF $\beta$ -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 $\beta$ -1 zu einer VEGF Stimulation führen kann.

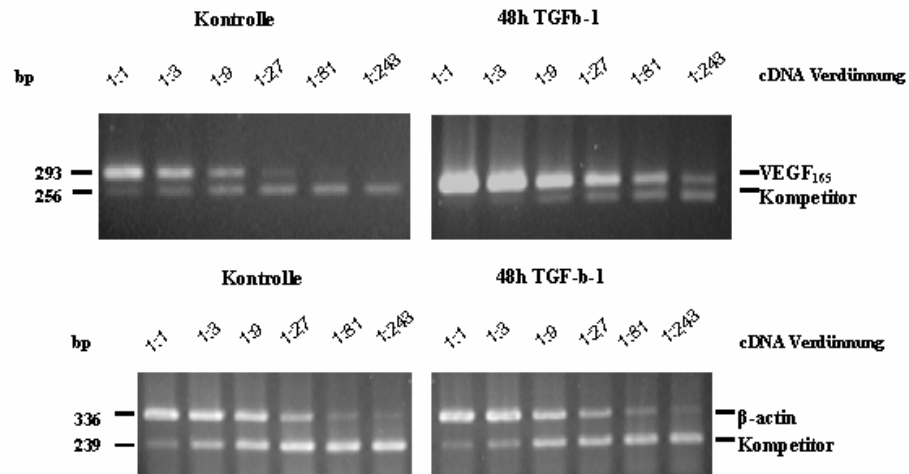


**Abbildung 5: VEGF Proteinexpression wird durch exogenes und endogenes TGFβ-1 reguliert.** (A) TFK-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml TGFβ-1 inkubiert. Zellkulturüberstände wurden asserviert und mittels VEGF-ELISA bestimmt. (B) Serumdepletierte TFK-1 Zellen wurden mit 50 ng/ml neutralisierendem TGFβ-1 Antikörper 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).

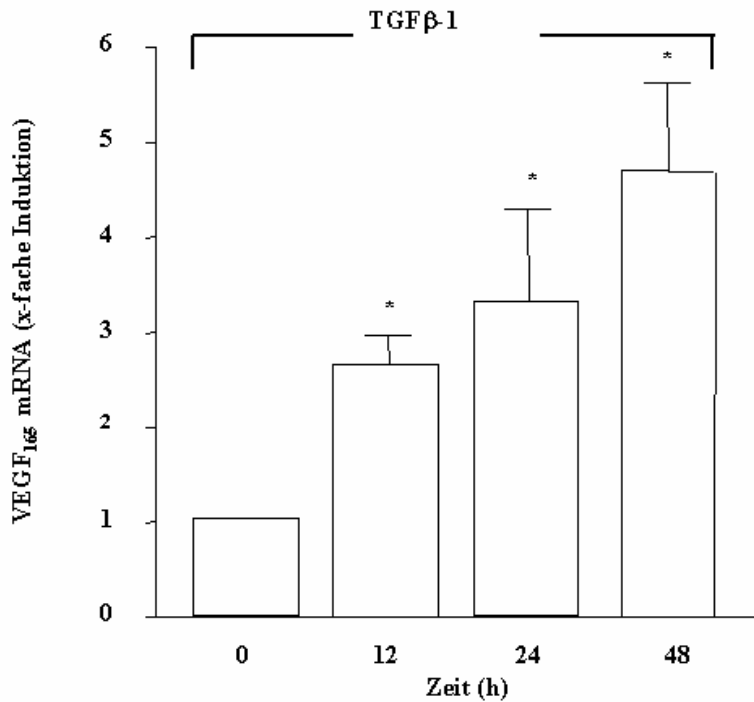
#### **4.4 Molekulare Mechanismen der TGF $\beta$ -1 induzierten VEGF Expression**

Um zu ermitteln, ob die Stimulation von VEGF durch TGF $\beta$ -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 $\beta$ -1 (10 ng/ml) extrahiert und mittels quantitativer kompetitiver RT-PCR untersucht. Nach TGF $\beta$ -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

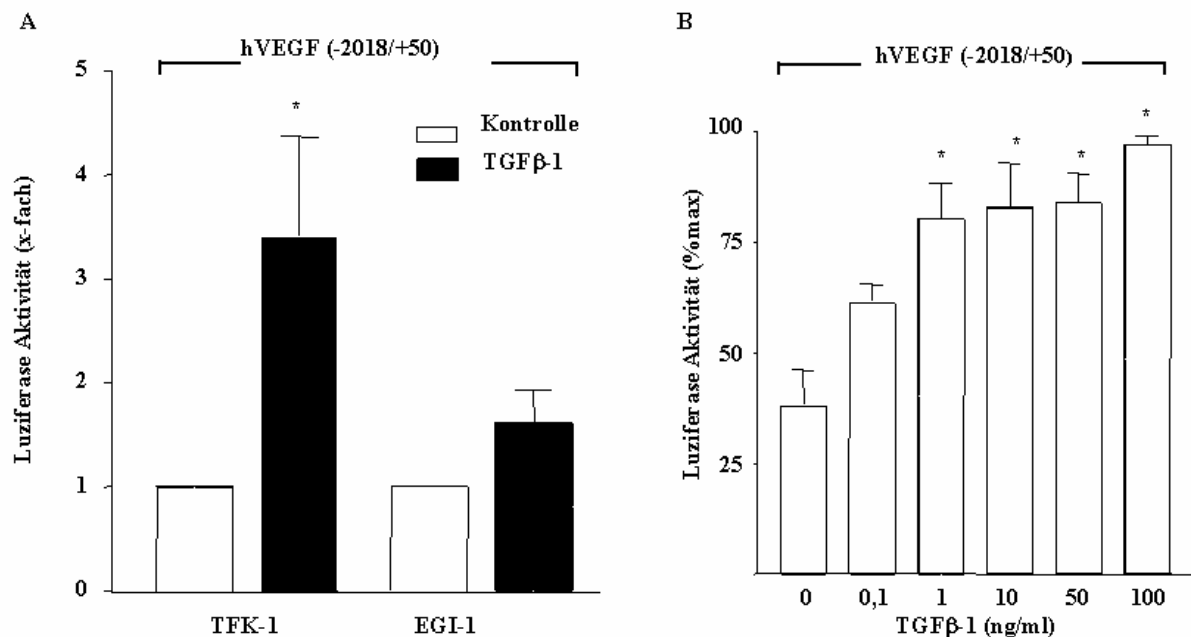


B



**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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -1 Effekte in den TFK-1 Zellen ausgeprägter nachzuweisen waren, wurden die Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der VEGF Promotoraktivität von TGF $\beta$ -1, an dieser Zelllinie durchgeführt. Es wurde eine dosisabhängige Zunahme der VEGF Promotoraktivität nach TGF $\beta$ -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 $\beta$ -1 durchgeführt.

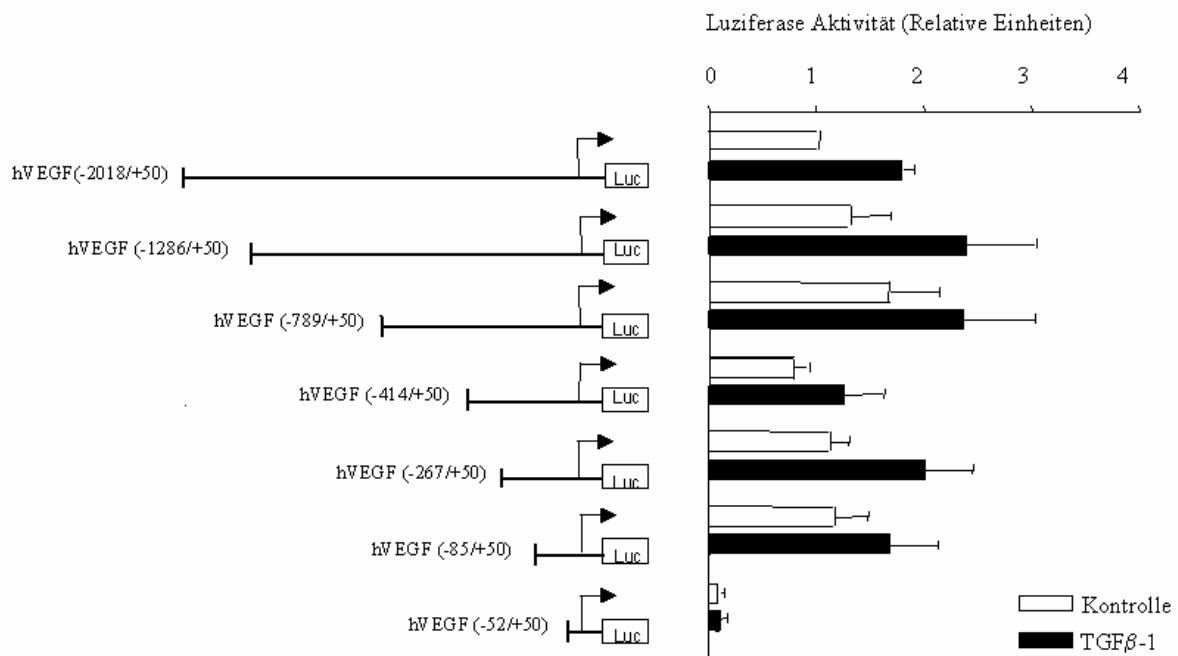


**Abbildung 7: TGF $\beta$ -1 transaktiviert den humanen VEGF Promotor.** (A) TFK-1 und EGI-1 Zellen wurden mit 2 $\mu$ g/ml hVEGF Promotorluziferase-Konstrukt und 100 ng/ml Renilla-Luziferaseexpressionskonstrukt kotransfiziert und mit 10 ng/ml TGF $\beta$ -1 unter serumfreien Bedingungen inkubiert. 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 $\beta$ -1 Konzentrationen. (Mittelwert  $\pm$  SEM, 5 unabhängige Experimente, x-facher Anstieg im Vergleich zur Kontrolle (A) oder % der Maximalstimulation (B)).



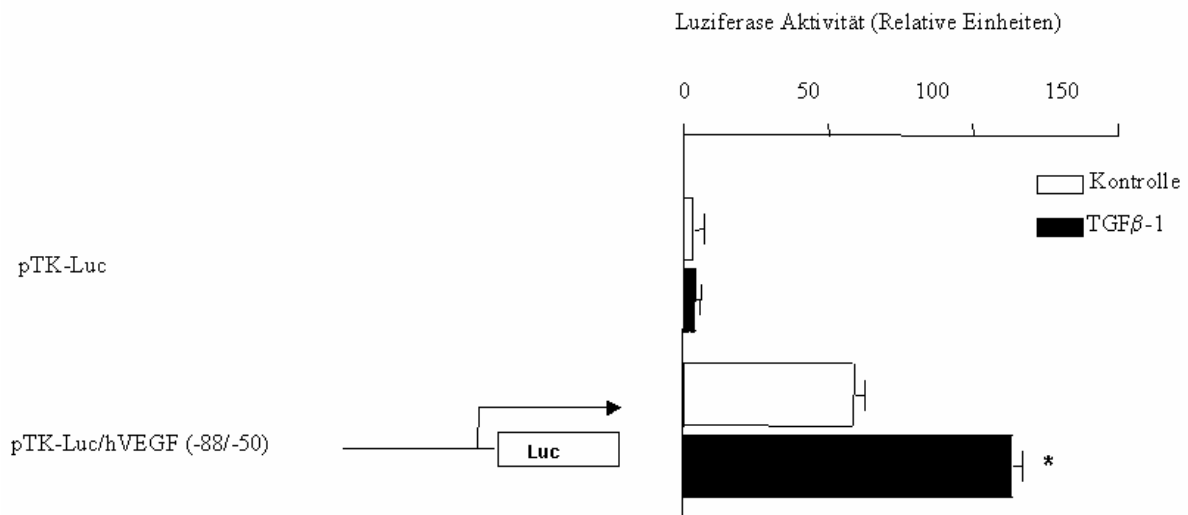
#### 4.5 TGFβ-1 responsive Elemente im VEGF Promotor

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.

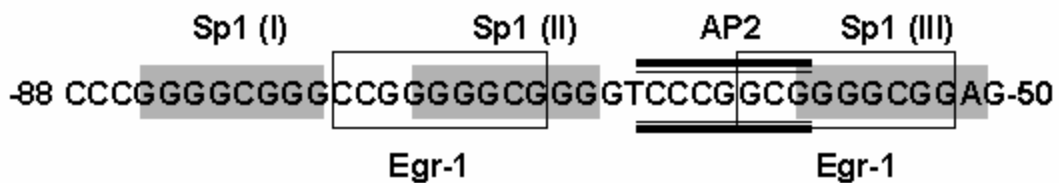
Um weiter zu belegen, dass der Abschnitt -85/-53 die TGF $\beta$ -1 Stimulation vermittelt, wurde ein heterologes Promotorsystem angewandt. Die hierfür verwendeten Konstrukte enthalten ein dem Luciferasereporter gen vorgeschalteten enhancerlosen Thymidinkinase Promotor (pTK-Luc). Mit dem "leeren" pTK-Luc transfizierte Zellen zeigten kaum basale Promotoraktivität und keine TGF $\beta$ -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 $\beta$ -1 einen zweifachen Anstieg der Reporter genaktivität (Abb. 9) und demonstrierte so eine TGF $\beta$ -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 Serumzug und TGF $\beta$ -1 Inkubation erfolgte die Bestimmung der Luziferaseaktivität. Die angegebenen Luziferaseaktivitäten stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden, dar (\* $p < 0,05$ ).

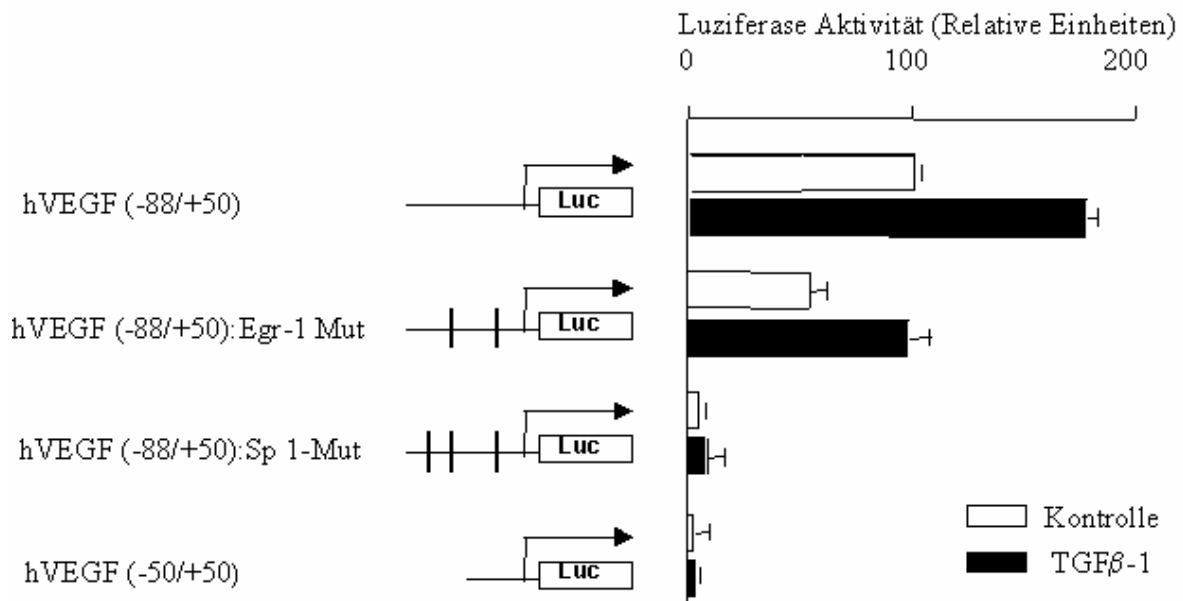
#### 4.6 Sp1 Bindungssequenzen im VEGF Promotor sind essentiell für TGFβ-1 Responsivität

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 verhindern<sup>57</sup>. 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 deletieren<sup>58</sup> (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.

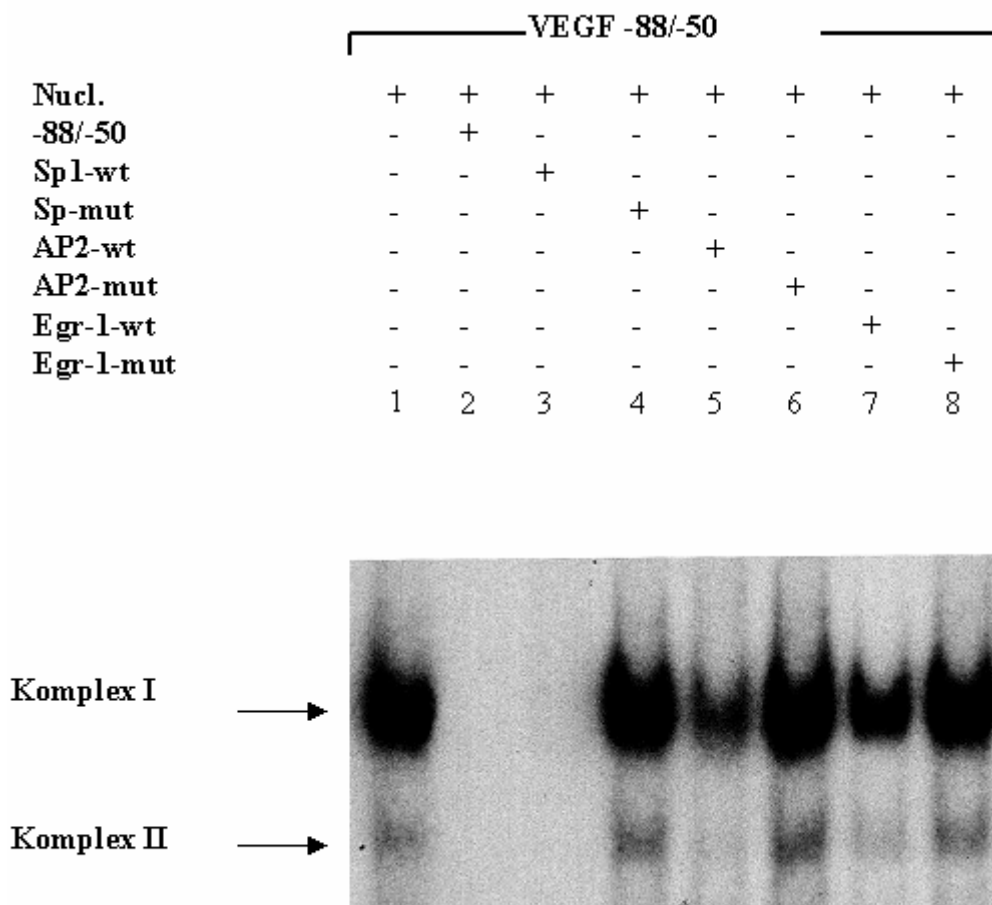


**Abbildung 11: Deletionsanalyse, Sp1 Bindungssequenz III ist notwendig für TGFβ-1 vermittelte VEGF Sensitivität.** Aus dem hVEGF -88/-50 Reporterergenkonstrukt wurden Promotorsequenzen generiert, welche zu dargestelltem Verlust von Sp1 Bindungssequenzen führten. Nach Transfektion (2 µg Konstrukt, Serumentzug und TGFβ-1 Inkubation wurde die Luciferaseaktivität gemessen. (Mittelwert ± 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. <sup>32</sup>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-

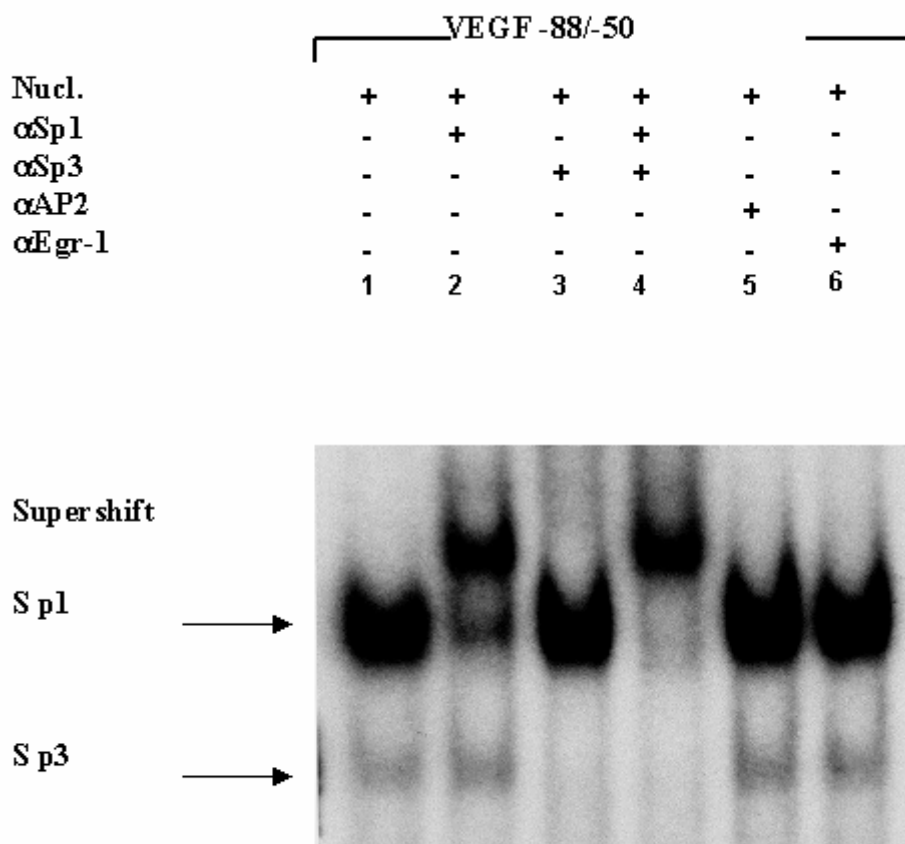
1 und AP2 (Schema 2). Die DNA-Kernprotein Komplexformation konnte durch Kompetition mit nicht-markierten AP2 und Egr-1 Oligonukleotiden reduziert werden und war nicht beeinträchtigt durch Kompetition mit mutierten AP2 und Egr-2 Bindungssequenzen (Abb. 12, Banden 5-8). Diese Ergebnisse wiesen daraufhin, 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 kann<sup>62</sup>. 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.



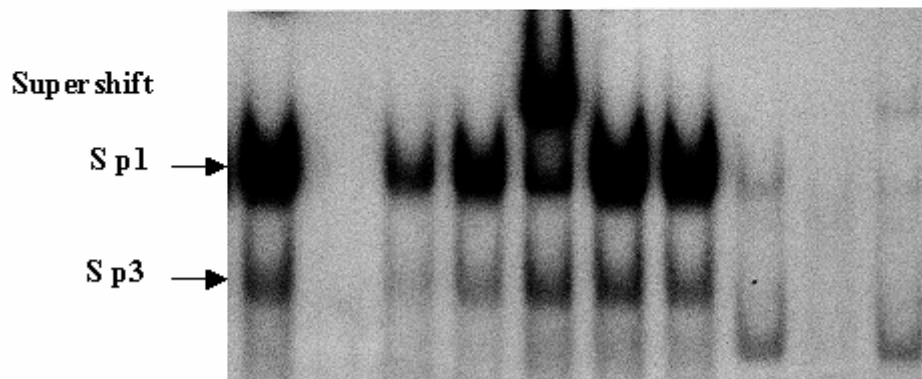
**Abbildung 13: Supershiftexperimente zur Identifikation der Transkriptionsfaktoren.** Die angegebenen Antikörper wurden den nukleären Extrakten von TFK-1 Zellen und radioaktiv markiertem hVEGF -88/-50 Oligonukleotid hinzugefügt.

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. <sup>32</sup>P 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 kompetitiv 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.

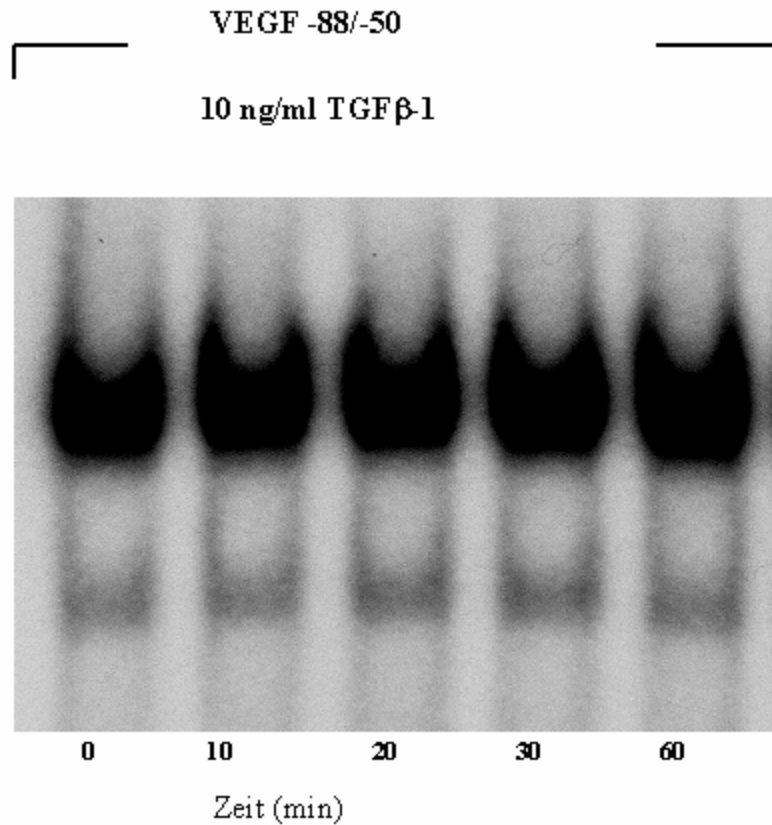


	Sp1				AP2			AP2		
Nucl.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sp1	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
AP2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Egr-1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ Sp1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
$\alpha$ AP2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
$\alpha$ Egr-1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



**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 $\beta$ -1 auf die Bindung der Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden EMSAs nach Inkubation von TFK-1 Zellen mit TGF $\beta$ -1 über unterschiedliche Zeiträume durchgeführt. Es zeigten sich keine Veränderungen der DNA-Proteinkomplexformation (Abb. 15).

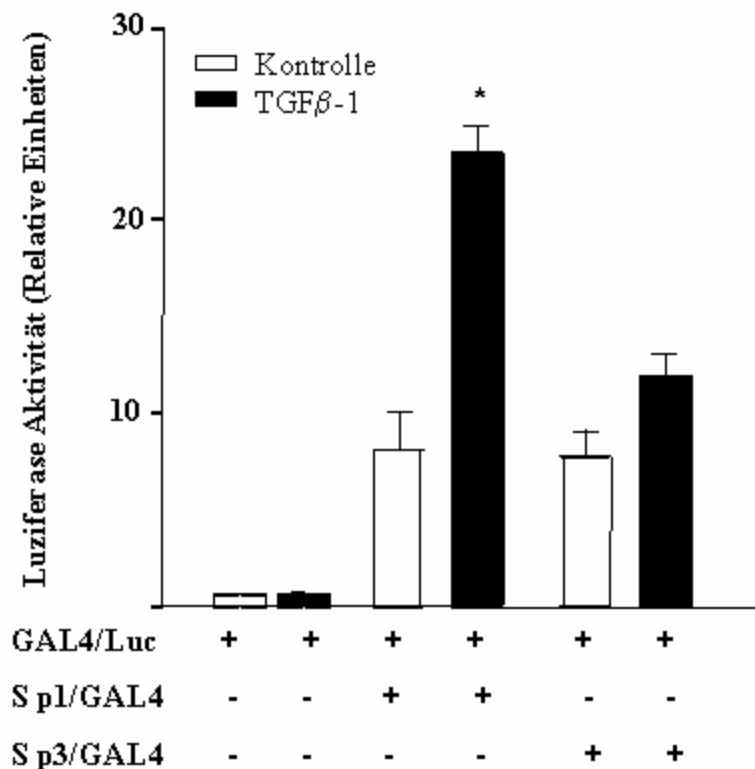


**Abbildung 15:** TFK-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml TGFβ-1 über 10, 20, 30 und 60 Minuten vor der Kernproteinextraktion stimuliert. Die Kernproteine wurden daraufhin mit <sup>32</sup>P markierten HVEGF -88/-50 Oligonukleotiden inkubiert. Gezeigt werden in allen EMSA Abbildungen repräsentative Autoradiographieresultate 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 TGFβ-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 TGFβ-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 TGFβ-1 induzierte transkriptionelle Aktivierung des humanen VEGF Promotors vermittelt.



**Abbildung 16: TGFβ-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 TGFβ-1 inkubiert oder unbehandelt gelassen, nach 24 Stunden geerntet und auf die Luziferaseaktivität untersucht (Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Versuchen; \* p<0,05).

## 5 Diskussion

Eine mögliche Ursache für den malignen Phänotypus des humanen CCCs kann durch die Beobachtung begründet sein, dass Tumorwachstum und Metastasierungsverhalten entscheidend von der Induktion der Tumorangiogenese abhängen<sup>63;64</sup>. Über die für den “angiogenic switch“ verantwortlichen und an der malignen Transformation von humanen Cholangiozyten beteiligten Faktoren ist bisher wenig bekannt. Diese Arbeit sollte erstmalig Faktoren identifizieren, die an der Tumorangiogenese des CCCs beteiligt sind.

Die Bestimmung der mikrovaskulären Gefäßdichte (MVD) ist ein wertvoller prognostischer Parameter bei verschiedenen soliden Malignomen<sup>65</sup> war, in CCCs bisher aber noch nicht untersucht worden. Unter Verwendung eines endothelspezifischen Antikörpers wurden Gefäße in Arealen mit einer hohen Gefäßdichte, sogenannten “hot spots“<sup>60</sup>, gezählt und eine mittlere MVD von  $126 \pm 45$  Gefäßen/ $0,74 \text{mm}^2$  (n=19) ermittelt. Dieser Wert liegt ungefähr in dem Bereich der mit derselben Methode bestimmten MVD von Tumoren, die als gut vaskularisiert gelten, wie zum Beispiel Mammakarzinomen ( $101 \pm 49$ ) oder Prostatakarzinomen ( $77 \pm 32$ )<sup>60</sup> und weist auf einen hohen Anteil tumorassoziierter Angiogenese im humanen CCC hin.

In Anbetracht des hohen Vaskularisierungsgrades des CCCs schien die Charakterisierung des VEGF/VEGF-Rezeptorsystems interessant, da VEGF eine zentrale Rolle für die Regulation der Tumorneoangiogenese spielt und der VEGF Signaltransduktionsweg derzeit eines der vielversprechendsten Ziele für einen antiangiogenen Therapieansatz darstellt<sup>66</sup>. Zwei immunhistochemische Studien haben bisher die VEGF Expression im humanen CCC untersucht und kamen zu divergierenden Ergebnissen<sup>37;38</sup>. Die vorliegende Untersuchung konnte in allen 19 untersuchten CCCs eine VEGF Proteinexpression nachweisen. Diese Daten stimmen mit den Untersuchungen von Kawahara et al<sup>37</sup> überein, die eine VEGF Immunoreaktivität in 100 % der CCCs demonstrierten. Im Gegensatz hierzu wiesen Hida et al<sup>38</sup> VEGF in 31% der untersuchten CCCs nach.

Immunhistochemische Untersuchungen können nicht zwischen intrazellulärem und rezeptorgebundenem VEGF diskriminieren und somit auch nicht zum Nachweis des zellulären Ursprungs des Zytokins dienen. Aus diesem Grund wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt und nachgewiesen, dass exklusiv cholangiozelluläre Tumorzellen den zellulären Ursprung von VEGF *in vivo* darstellen. Es fiel eine besondere Akzentuierung der VEGF-mRNA Expression im Bereich perinekrotischer Tumorzellareale auf. Dies wurde bereits in

anderen soliden Tumoren, wie dem hepatozellulären Karzinom<sup>27</sup>, dem Kolonkarzinom<sup>67</sup> und humanen Gliomen<sup>68</sup> beobachtet. Eine vermehrte VEGF Expression in Tumorbereichen mit einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck könnte auf eine mögliche Rolle von lokaler Hypoxie als Stimulanz für die Induktion der VEGF Expression hinweisen<sup>24</sup>.

Die Wirkungen von VEGF werden in parakriner Weise über die beiden Thyrosinkinaserzeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 vermittelt. Die Expression dieser Rezeptoren im CCC ist bisher noch nicht untersucht worden. Mittels Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung wurde die Expression von VEGFR-1 in 15 von 19 und VEGFR-2 in 10 von 19 Tumorproben nachgewiesen. VEGF Rezeptor mRNA und Protein wurden nur über Endothelzellen exprimiert. Die VEGF Rezeptoren werden von Endothelien in nicht transformierten Geweben nicht exprimiert, während es im Rahmen der Tumorneoangiogenese zu einer Expression beider Rezeptoren kommt<sup>67-69</sup>. Diese Beobachtung legt die Vermutung, dass nicht nur VEGF, sondern auch seine Rezeptoren im Rahmen der malignen Transformation des CCC hochreguliert sind.

Es wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen Faktoren, die das VEGF-Gen aktivieren, in unterschiedlichen Zellsystemen beschrieben, die möglicherweise auch im CCC zu einer VEGF Aktivierung führen: (i) Tumorphypoxie, wie durch die verstärkte VEGF-mRNA Expression im Bereich perinekrotischer Tumorzellareale in vorgelegter Studie belegt; (ii) genetische Veränderungen, wie zum Beispiel *K-ras* aktivierende Mutationen und Expression von mutiertem p53, beides Alterationen, die im CCC beschrieben sind<sup>70,71</sup> (iii) schließlich können sowohl verschiedene Zytokine wie EGF, PDGF, IL-6, TGF $\beta$ -1, als auch oxidativer Stress zu einer Induktion von VEGF führen<sup>19,21,58</sup>. Unter diesen Faktoren spielt TGF $\beta$ -1 eine hervorgehobene Rolle im Rahmen von Lebererkrankungen und wirkt in der Leber als Regulator von Zellproliferation<sup>72</sup>, Matrixsynthese<sup>73</sup> und Apoptose<sup>74</sup>. Kürzlich konnten Yokomuro et al<sup>49</sup> zeigen, dass es in CCC Zelllinien zu einem Verlust der TGF $\beta$ -1 vermittelten mitoinhibitorischen und proapoptischen Effekte kommt, was auf die Rolle von TGF $\beta$ -1 im Rahmen der malignen Transformation des CCCs hindeutet. Es ist bekannt, dass bei anderen gastrointestinalen Malignomen, wie zum Beispiel Pankreaskarzinomen<sup>47</sup> und Kolonkarzinomen<sup>48</sup> inaktivierende Mutationen im Bereich der TGF $\beta$ -1 Signaltransduktionskaskade zu malignen Transformation der genannten Gewebe beitragen. Die Stimulation von VEGF stellt einen weiteren möglichen Mechanismus der TGF $\beta$ -1 induzierten

Tumorgenese dar<sup>52;54;56</sup>. Daher wurden die Untersuchungen auf die möglich funktionelle Interaktion zwischen TGF $\beta$ -1 und VEGF im CCC beschränkt.

In einer vorherigen Studie wurden Mesenchymzellen als zellulärer Ursprung von TGF $\beta$ -1 in der Leber benannt<sup>75</sup>. Die vorliegende Arbeit zeigte TGF $\beta$ -1 Immunreaktivität über Mesenchymzellen in 15 von 19 und über Tumorzellen in 4 von 19 Tumorproben. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen anderer Arbeiten, wobei Vogelbruch et al<sup>76</sup> TGF $\beta$ -1 Immunreaktivität über Mesenchymzellen in 25 von 30 CCCs und Chen et al<sup>77</sup> Immunreaktivität überwiegend über Tumorzellen selbst, nachweisen konnten. Die Expressionsmuster der TGF $\beta$ -1 Rezeptoren sind bisher nicht untersucht worden. Die vorgelegte Arbeit zeigte eine starke Immunreaktivität beider TGF $\beta$ -1 Rezeptoren über Tumorzellen in allen untersuchten CCCs. Diese Beobachtung legt nahe, dass Tumorzellen als Ziel einer möglichen TGF $\beta$ -1 Wirkung dienen. Über vorausgegangene Arbeiten hinausgehend konnte somit erstmalig die Expression von VEGF, TGF $\beta$ -1 und der jeweiligen Rezeptoren im CCC nachgewiesen werden.

Um die Hypothese einer parakrinen und/oder autokrinen Interaktion der beiden Zytokine zu überprüfen wurde ein *in vitro* Zellsystem bestehend aus den beiden CCC Zelllinien TFK-1 und EGI-1 etabliert. Mittels RT-PCR, sowie VEGF und TGF $\beta$ -1 spezifischen ELISAs konnte in Übereinstimmung mit den *in vivo* Daten eine Koexpression der beiden Zytokine demonstriert werden. Beide Zelllinien exprimierten 3 von 5 bekannten VEGF Isoformen (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> und VEGF<sub>189</sub>) und sezernierten sowohl VEGF als auch TGF $\beta$ -1 in die Zellkulturüberstände. Desweiteren führte Inkubation mit TGF $\beta$ -1 zu einem signifikanten, zeitabhängigen Anstieg der VEGF Proteinkonzentration. Diese Ergebnissen stimmen mit Arbeiten an humanen Osteoblasten<sup>55</sup> und humanen Keratinozyten<sup>56</sup> überein. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass die Antagonisierung von TGF $\beta$ -1 mit einem neutralisierenden TGF $\beta$ -1 Antikörper zu einer Inhibition der VEGF Expression führt. Damit konnte erstmalig eine autokrine und parakrine Regulation der VEGF Expression durch TGF $\beta$ -1 nachgewiesen werden. Die biologische Bedeutung dieser Beobachtung wird durch eine Arbeit unterstützt, die eine Inhibition der Angiogenese durch neutralisierenden TGF $\beta$ -1 Antikörper, in einem "Angiogenesis disc system" beschreibt<sup>78</sup>.

Obwohl die stimulatorischen Effekte von TGF $\beta$ -1 auf die Expression von VEGF in einer Reihe von *in vitro* Systemen beschrieben worden sind<sup>21;52;55;79</sup>, bleiben die molekularen

Mechanismen, die zu einer Stimulation führen, weitgehend ungeklärt. Einzig Chua et al<sup>54</sup> beschreiben eine transkriptionelle Aktivierung des VEGF Gens durch TGFβ-1 in murinen MC3T3-E1 Osteoblasten. Um die molekularen Mechanismen der TGFβ-1 induzierten VEGF Stimulation in CCC Zellen zu untersuchen, wurde zunächst durch quantitative kompetitive RT-PCR gezeigt, dass TGFβ-1 die VEGF Expression vor der Translation der mRNA, also nicht zum Beispiel durch posttranslationale mRNA Prozessierung, zu regulieren scheint. Andere Arbeiten legen eine transiente Zunahme der VEGF-mRNA Konzentration in murinen Osteoblasten und Adenokarzinomzellen der Lunge<sup>21;54</sup> (über maximal 6 Stunden) nahe. Im Gegensatz dazu zeigt die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Kinetik der VEGF-mRNA Induktion durch TGFβ-1 in CCC Zellen eine kontinuierliche Zunahme der VEGF-mRNA Konzentration über 48 Stunden.

Durch Transaktivierungsexperimente mit einem humanen VEGF-Reportergenkonstrukt konnte eine dosisabhängige Aktivierung des VEGF-Promotors in CCC Zellen nachgewiesen werden. 5' Deletionsanalysen identifizierten die -85 bis -53 Sequenz des humanen VEGF Promotors als notwendig für die basale Promotoraktivität und die TGFβ-1 Sensivität. Interessanterweise wird diese GC-reiche Sequenz in mehreren Arbeiten als entscheidend für die basale und regulative VEGF Promotoraktivität beschrieben, wie zum Beispiel (i) die PDGF vermittelte Stimulation in NIH3T3 Zellen<sup>57</sup>, (ii) die p42/p44 MAP Kinase vermittelte Stimulation in Fibroblasten<sup>80</sup>, (iii) die p73 vermittelte Inhibition in Leukämiezellen<sup>81</sup> und (iv) die Hypoxie vermittelte Induktion in Magenkarzinomzellen<sup>58</sup>.

Der -85 bis -50 Abschnitt des VEGF-Promotors enthält keine Smad bindenden Sequenzen, jedoch drei potentielle Sp1/3, zwei potentielle Egr-1 und eine potentielle AP2 Transkriptionsfaktorbindungssequenzen, die sich teilweise überlappen (Abbildung 8A). Durch Mutationsanalysen dieser Sequenzen konnte gezeigt werden, dass nur die Sp1/3 bindenden Sequenzen erforderlich für die TGFβ-1 Wirkungen sind. Weiterhin konnte in den Supershiftexperimenten demonstriert werden, dass zwar Sp1 an AP2 Bindungssequenzen, der Transkriptionsfaktor AP2 aber nicht an die mögliche AP2-Bindungssequenz bindet. Diese Ergebnisse befinden sich in guter Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, die zeigen konnten, dass Sp1 mit AP2- Bindungssequenz interagieren kann<sup>58;82</sup>.

Die biologische Wirkung von TGFβ-1 wird vornehmlich durch die Familie der Smad-Transkriptionsfaktoren vermittelt. Smad-Proteine binden direkt an DNA-Regionen die TCGTAGAC-Sequenzen, sogenannte Smad bindende Elemente (SBE), enthalten<sup>83-85</sup>. Kürzlich

wurde erstmals beschrieben, dass auch Sp1 bindende DNA-Sequenzen TGF $\beta$ -1 sensibel reagieren können<sup>86</sup>. Entscheidend scheint hierbei die Interaktion von Smads mit Sp1, ohne dass die Smad Proteine direkt an DNA binden<sup>87-89</sup>. Dieser Wirkmechanismus ist für "klassische" TGF $\beta$ -1 Zielgene wie p21<sup>87</sup>, p15<sup>88</sup> und die Expression von  $\alpha$ 2(I) Kollagen<sup>89</sup> beschrieben worden. Der genaue molekulare Mechanismus, der zu der Interaktion zwischen Sp1 und Smads führt, ist bisher noch nicht bekannt. Es sind allerdings folgende Möglichkeiten denkbar: Smad's könnten (i) eine Oligodimerisierung von Sp1 induzieren, welche zu einer höheren Affinität an die Transkriptionsfaktorbindungssequenzen führt; (ii) zu einer Rekrutierung von weiteren Faktoren (p300 oder c-jun) führen, die Sp1 stabilisieren oder die transkriptionelle Aktivität von Sp1 erhöhen<sup>43</sup> oder (iii) über Phosphorylierung beziehungsweise Acetylierung die Aktivität von Sp1 steigern<sup>87</sup>. Derzeit ist nicht bekannt, welcher dieser Mechanismen entscheidend für die TGF $\beta$ -1 vermittelte Stimulation von VEGF ist. Die EMSA Analysen haben jedoch gezeigt, dass es nach TGF $\beta$ -1 Behandlung zu keiner Veränderung der Sp1-DNA und der Sp3-DNA Komplexe gekommen ist. Es scheint demnach unwahrscheinlich, dass eine Veränderung der Affinität der Sp-Transkriptionsfaktoren zu einer TGF $\beta$ -1 vermittelten Transaktivierung führt. Daraufhin wurde die transaktivierende Wirkung von TGF $\beta$ -1 auf Sp1- und Sp3-Gal4 Fusionsproteine untersucht. Es zeigte sich, dass Sp1/Gal4-, nicht aber Sp3/Gal4-Fusionsproteine eine TGF $\beta$ -1 vermittelte Gal4 Reportergenkonstrukt-Sensitivität induzierten. Demnach scheint Sp1 und nicht Sp3 durch TGF $\beta$ -1 aktiviert zu werden.

Es konnte so erstmalig gezeigt werden, dass TGF $\beta$ -1 einen proangiogenen Faktor (VEGF) transkriptionell, Sp1 vermittelt, reguliert. Es bleibt allerdings unklar und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, welche der beschriebenen molekularen Modifikationen des Transkriptionsfaktors Sp1 verantwortlich für die TGF $\beta$ -1 vermittelte Transaktivierung des VEGF Promotors sind.



## **6 Zusammenfassung**

Die molekularen Mechanismen der Tumorangiogenese im humanen cholangiozellulären Karzinom (CCC) sind bisher unzureichend verstanden. Die vorgelegte Arbeit beschreibt das CCC als stark vaskularisierten Tumor und identifiziert durch den Nachweis der Koexpression von VEGF, TGF $\beta$ -1 und den jeweiligen Rezeptoren, diese als mögliche Faktoren für die Induktion der Tumorangiogenese im CCC. Es konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta$ -1 die VEGF Gentranskription in malignen Gallengangszellen auf prätranslationaler Ebenen in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors Sp1 stimuliert. Dieser Mechanismus kann zum "angiogenic switch" und zur malignen Transformation des CCCs führen. Es wurde erstmalig gezeigt, dass TGF $\beta$ -1 außer den "klassischen" TGF $\beta$ -1 Zielgenen (p15, p21 und  $\alpha$ 2(I)-Kollagen) den proangiogenen Faktor VEGF, Sp1 abhängig, regulieren kann. Des weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Antagonisierung von endogenem TGF $\beta$ -1 durch einen neutralisierenden TGF $\beta$ -1 Antikörper die VEGF Expression inhibiert. Hierdurch wurde erstmalig eine autokrine und parakrine Regulation der TGF $\beta$ -1 vermittelten VEGF Expression beschrieben.

## 7 **Abbildungsverzeichnis**

Schema 1: quantitative-kompetitive RT-PCR	17
Schema 2: Transkriptionsfaktorbindungssequenzen hVEGF -88/-50.	35
Abbildung 1: Expression von VEGF und seinen Rezeptoren im CCC	23
Abbildung 2: Expression von TGF $\beta$ -1 im CCC	24
Abbildung 3: Expression der TGF $\beta$ -1 Rezeptoren im CCC	25
Abbildung 4: Expression von VEGF und TGF $\beta$ -1 in humanen CCC Zelllinien	27
Abbildung 5: VEGF Proteinexpression wird durch exogenes und endogenes TGF $\beta$ -1 reguliert	29
Abbildung 6: TGF $\beta$ -1 stimuliert VEGF-mRNA Expression	31
Abbildung 7: TGF $\beta$ -1 transaktiviert den humanen VEGF Promotor	32
Abbildung 8: TGF $\beta$ -1 responsive Elemente im VEGF Promotor	33
Abbildung 9: Vektor unabhängige Regulation der hVEGF -88/-50 Sequenz	34
Abbildung 10: Mutationsanalyse, Sp1 Bindungssequenzen im VEGF Promotor sind essentiell für TGF $\beta$ -1 Responsivität	36
Abbildung 11: Deletionsanalyse, Sp1 Bindungssequenz III ist notwendig für TGF $\beta$ -1 vermittelte VEGF Sensitivität	37
Abbildung 12: Sp1 und/oder AP2 binden an hVEGF -88/-50	38
Abbildung 13: Supershiftexperimente zur Identifikation der Transkriptionsfaktoren	39
Abbildung 14: Sp1 kann an Ap2 Konsensus Sequenzen binden	41
Abbildung 15: TFK-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml TGF $\beta$ -1 über 10, 20, 30 und 60 Minuten vor der Kernproteinextraktion stimuliert	42

Abbildung 16: TGF $\beta$ -1 stimuliert Sp1 abhängig die Transaktivierung des VEGF Promotors. 43

Tabelle 1: Zelllinien 10

Tabelle 2: DNA Konstrukte und Reportergenplasmide 11

Tabelle 3: Plasmide und Herstellung der RNA-Sonden 12

Tabelle 4: Chemikalien und Materialien 13

Tabelle 5: Primersequenzen für die quantitative kompetitive RT-PCR 19

## 8 Literaturverzeichnis

1. de Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, Gunderson LL, Nagorney DM. Biliary tract cancers. *N Engl J Med.* 1999;341:1368-1378.
2. Nakeeb A, Pitt HA, Sohn TA, Coleman J, Abrams RA, Piantadosi S, Hruban RH, Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL. Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors. *Ann Surg.* 1996;224:463-473.
3. Farley DR, Weaver AL, Nagorney DM. "Natural history" of unresected cholangiocarcinoma: patient outcome after noncurative intervention. *Mayo Clin Proc.* 1995;70:425-429.
4. Ahrendt SA, Nakeeb A, Pitt HA. Cholangiocarcinoma. *Clin Liver Dis.* 2001;5:191-218.
5. Saaristo A, Karpanen T, Alitalo K. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene.* 2000;19:6122-6129.
6. Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med.* 1995;333:1757-1763.
7. Folkman J. New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur J Cancer.* 1996;32A:2534-2539.
8. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis.* 2000;21:505-515.
9. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407:249-257.
10. Bergers G, Hanahan D, Coussens LM. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *Int J Dev Biol.* 1998;42:995-1002.
11. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
12. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86:353-364.
13. Hanahan D, Christofori G, Naik P, Arbeit J. Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer.* 1996;32A:2386-2393.
14. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999;237:1-30.
15. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999;13:9-22.
16. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol.* 1999;9:211-220.

17. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*. 1991;5:1806-1814.
18. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*. 1991;266:11947-11954.
19. Goldman CK, Kim J, Wong WL, King V, Brock T, Gillespie GY. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell*. 1993;4:121-133.
20. Finkenzeller G, Marme D, Weich HA, Hug H. Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C. *Cancer Res*. 1992;52:4821-4823.
21. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*. 1994;269:6271-6274.
22. Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:3609-3614.
23. Kolch W, Martiny-Baron G, Kieser A, Marme D. Regulation of the expression of the VEGF/VPS and its receptors: role in tumor angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 1995;36:139-155.
24. Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem*. 1995;270:19761-19766.
25. Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo KT, Yeo TK, Allende R, Folkman J, D'Amore PA. Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol Med*. 1995;1:182-193.
26. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Greenwald JA, Spector JA, Gittes GK, Longaker MT. VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278:C853-C860.
27. von Marschall Z, Cramer T, Hocker M, Finkenzeller G, Wiedenmann B, Rosewicz S. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2001;48:87-96.
28. Ferrara N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 1995;36:127-137.

29. Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R, Giordano F, Johnson RS. Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion To recruit and expand tumor vasculature. *Mol Cell Biol.* 2000;20:7282-7291.
30. Mustonen T, Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol.* 1995;129:895-898.
31. Millauer B, Longhi MP, Plate KH, Shawver LK, Risau W, Ullrich A, Strawn LM. Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res.* 1996;56:1615-1620.
32. Siemeister G, Schirner M, Weindel K, Reusch P, Menrad A, Marme D, Martiny-Baron G. Two independent mechanisms essential for tumor angiogenesis: inhibition of human melanoma xenograft growth by interfering with either the vascular endothelial growth factor receptor pathway or the Tie-2 pathway. *Cancer Res.* 1999;59:3185-3191.
33. Vitaliti A, Wittmer M, Steiner R, Wyder L, Neri D, Klemenz R. Inhibition of tumor angiogenesis by a single-chain antibody directed against vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 2000;60:4311-4314.
34. Brekken RA, Overholser JP, Stastny VA, Waltenberger J, Minna JD, Thorpe PE. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res.* 2000;60:5117-5124.
35. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature.* 1993;362:841-844.
36. Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med.* 1999;5:1359-1364.
37. Kawahara N, Ono M, Taguchi K, Okamoto M, Shimada M, Takenaka K, Hayashi K, Mosher DF, Sugimachi K, Tsuneyoshi M, Kuwano M. Enhanced expression of thrombospondin-1 and hypovascularity in human cholangiocarcinoma. *Hepatology.* 1998;28:1512-1517.
38. Hida Y, Morita T, Fujita M, Miyasaka Y, Horita S, Fujioka Y, Nagashima K, Katoh H. Vascular endothelial growth factor expression is an independent negative predictor in extrahepatic biliary tract carcinomas. *Anticancer Res.* 1999;19:2257-2260.
39. Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 2000;103:295-309.
40. Blobel GA, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000;342:1350-1358.
41. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell.* 1998;93:1159-1170.

42. Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol.* 1990;110:1361-1367.
43. Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell.* 1998;95:737-740.
44. Attisano L, Wrana JL. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12:235-243.
45. Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J.* 1999;13:2105-2124.
46. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 2000;19:1745-1754.
47. Goggins M, Shekher M, Turnacioglu K, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1998;58:5329-5332.
48. Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, Rajput A, Thiagalingam S, Lutterbaugh JD, Neumann A, Brattain MG, Chang J, Kim SJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JK, Markowitz S. Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* 1999;59:320-324.
49. Yokomuro S, Tsuji H, Lunz JG, III, Sakamoto T, Ezure T, Murase N, Demetris AJ. Growth control of human biliary epithelial cells by interleukin 6, hepatocyte growth factor, transforming growth factor beta1, and activin A: comparison of a cholangiocarcinoma cell line with primary cultures of non-neoplastic biliary epithelial cells. *Hepatology.* 2000;32:26-35.
50. Gold LI. The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog.* 1999;10:303-360.
51. DeCoteau JF, Knaus PI, Yankelev H, Reis MD, Lowsky R, Lodish HF, Kadin ME. Loss of functional cell surface transforming growth factor beta (TGF-beta) type 1 receptor correlates with insensitivity to TGF-beta in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:5877-5881.
52. Dolecki GJ, Connolly DT. Effects of a variety of cytokines and inducing agents on vascular permeability factor mRNA levels in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;180:572-578.
53. Koochekpour S, Merzak A, Pilkington GJ. Vascular endothelial growth factor production is stimulated by gangliosides and TGF-beta isoforms in human glioma cells in vitro. *Cancer Lett.* 1996;102:209-215.
54. Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Mechanism of transforming growth factor-beta1-induced expression of vascular endothelial growth factor in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1497:69-76.

55. Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Dudziak ME, Greenwald JA, Luchs JS, Spector JA, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT. Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol.* 1999;277:C628-C637.
56. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem.* 1995;270:12607-12613.
57. Finkenzeller G, Sparacio A, Technau A, Marme D, Siemeister G. Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene.* 1997;15:669-676.
58. Schafer G. Oxidative stress regulates the Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) gene in gastric carcinoma cells through Sp1- and Sp3- dependent activation of a GC-rich response element. Cramer, T., Rosewicz, S., Wiedenmann, B., and Hocker, M. Manuscript submitted . 2002.
59. Milani S, Herbst H, Schuppan D, Hahn EG, Stein H. In situ hybridization for procollagen types I, III and IV mRNA in normal and fibrotic rat liver: evidence for predominant expression in nonparenchymal liver cells. *Hepatology.* 1989;10:84-92.
60. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324:1-8.
61. Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, Yamamoto M, Ohkawa K, Ito Y, Sasaki Y, Yamaguchi Y, Nakase H, Noda K, Enomoto N, Arai K, Yamada Y, Yoshihara H, Tujimura T, Kawano K, Yoshikawa K, Kamada T. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56:3004-3009.
62. Hagen G, Muller S, Beato M, Suske G. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:5519-5525.
63. Li CY, Shan S, Cao Y, Dewhirst MW. Role of incipient angiogenesis in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2000;19:7-11.
64. Weidner N. Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol.* 1998;184:119-122.
65. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36:169-180.
66. Plate KH. From angiogenesis to lymphangiogenesis. *Nat Med.* 2001;7:151-152.
67. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 1993;53:4727-4735.



68. 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;359:845-848.
69. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res*. 1995;55:3964-3968.
70. Reeves ME, DeMatteo RP. Genes and viruses in hepatobiliary neoplasia. *Semin Surg Oncol*. 2000;19:84-93.
71. Jonas S, Springmeier G, Tauber R, Wiedenmann B, Lobeck H, Gessner R, Kreft B, Kling N, Moelling K, Neuhaus P. p53 mutagenesis in Klatskin tumors. *Hum Pathol*. 1998;29:955-960.
72. Grande JP. Role of transforming growth factor-beta in tissue injury and repair. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997;214:27-40.
73. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. 1994;331:1286-1292.
74. Oberhammer F, Bursch W, Parzefall W, Breit P, Erber E, Stadler M, Schulte-Hermann R. Effect of transforming growth factor beta on cell death of cultured rat hepatocytes. *Cancer Res*. 1991;51:2478-2485.
75. De Bleser PJ, Niki T, Xu G, Rogiers V, Geerts A. Localization and cellular sources of activins in normal and fibrotic rat liver. *Hepatology*. 1997;26:905-912.
76. Vogelbruch M, Wellmann A, Maschek H, Schafer MK, Flemming P, Georgii A. Transforming growth factor beta 1 in human liver tumors. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1995;79:132-136.
77. Chen Y, Sasatomi E, Satoh T, Miyazaki K, Tokunaga O. Abnormal distribution of collagen type IV in extrahepatic bile duct carcinoma. *Pathol Int*. 2000;50:884-890.
78. Fajardo LF, Prionas SD, Kwan HH, Kowalski J, Allison AC. Transforming growth factor beta1 induces angiogenesis in vivo with a threshold pattern. *Lab Invest*. 1996;74:600-608.
79. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation*. 1994;90:649-652.
80. Milanini J, Vinals F, Pouyssegur J, Pages G. p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *J Biol Chem*. 1998;273:18165-18172.
81. Salimath B, Marme D, Finkenzeller G. Expression of the vascular endothelial growth factor gene is inhibited by p73. *Oncogene*. 2000;19:3470-3476.
82. Tu ZJ, Pan W, Gong Z, Kiang DT. Involving AP-2 transcription factor in connexin 26 up-regulation during pregnancy and lactation. *Mol Reprod Dev*. 2001;59:17-24.

83. Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J, Pavletich NP. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell*. 1998;94:585-594.
84. Labbe E, Silvestri C, Hoodless PA, Wrana JL, Attisano L. Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol Cell*. 1998;2:109-120.
85. Kusanagi K, Inoue H, Ishidou Y, Mishima HK, Kawabata M, Miyazono K. Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad-binding element. *Mol Biol Cell*. 2000;11:555-565.
86. Li JM, Datto MB, Shen X, Hu PP, Yu Y, Wang XF. Sp1, but not Sp3, functions to mediate promoter activation by TGF-beta through canonical Sp1 binding sites. *Nucleic Acids Res*. 1998;26:2449-2456.
87. Pardali K, Kurisaki A, Moren A, Ten Dijke P, Kardassis D, Moustakas A. Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. 2000;275:29244-29256.
88. Feng XH, Lin X, Derynck R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J*. 2000;19:5178-5193.
89. Poncelet AC, Schnaper HW. Sp1 and Smad proteins cooperate to mediate transforming growth factor-beta 1-induced alpha 2(I) collagen expression in human glomerular mesangial cells. *J Biol Chem*. 2001;276:6983-6992.

## **9 Danksagung**

Mein Dank gilt zunächst Herrn Professor Dr. Sven Jonas für die Überlassung des Themas sowie die intensive Förderung meiner wissenschaftlichen Aktivitäten.

Herrn Professor Dr. Peter Neuhaus gebührt mein Dank für die klinische Ausbildung und die Unterstützung meiner experimentellen Arbeit an der Klinik für Allgemein- Visceral- und Transplantationchirurgie der Charité –Campus Virchow Klinikum.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rosewicz und Herren Dr. Thorsten Cramer, ohne deren Kooperation diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, sowie allen weiteren Mitarbeitern des Labors, die mit Rat und Tat jederzeit behilflich waren.

Und schließlich danke ich meiner Familie, auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte.

## **10 Lebenslauf**

Geburt: 4. September 1969 in Kiel

Eltern: Roswitha Iversen-Benckert und Andreas Benckert

Familienstand: ledig

1989 Abitur am Gymnasium Elmschenhagen in Kiel

1989-1991 Studium der Philosophie und Romanistik an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

1991-1998 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin; Studienaufenthalte in New York, New Orleans und Edinburgh;

1993-1996 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie der FU Berlin

1998 III. Staatsexamen

seit September 1998 zunächst "Arzt im Praktikum" und seit Februar 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Abteilung für Allgemein-Visceral- u. Transplantationschirurgie, Leiter Prof. Dr. Neuhaus, Charité, Campus Virchow Klinikum, Berlin

Berlin, den 12. Juli 2005

Christoph Benckert

## 11 Publikationsverzeichnis

1. Benckert C, Jonas S, Thelen A, Spinelli A, Schumacher G, Heise M et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis: prognostic parameters. *Transplant Proc* 2005; 37(4):1693-1694.
2. Jonas S, Thelen A, Benckert C, Neuhaus P. Surgical resection of colorectal metastases. *Front Radiat Ther Oncol* 2004; 38:94-99.
3. Wagner K, Peters M, Scholz A, Benckert C, Ruderisch HS, Wiedenmann B et al. Activin A stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology* 2004; 126(7):1828-1843.
4. Neuhaus P, Jonas S, Settmacher U, Thelen A, Benckert C, Lopez-Hanninen E et al. Surgical management of proximal bile duct cancer: extended right lobe resection increases resectability and radicality. *Langenbecks Arch Surg* 2003; 388(3):194-200.
5. Benckert C, Jonas S, Cramer T, Von Marschall Z, Schafer G, Peters M et al. Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2003; 63(5):1083-1092.
6. Schon MR, Heil W, Benckert C, Matthes M, Akkoc N, Kollmar O et al. Influence of cold and warm ischemia on amino acid profiles after liver transplantation. *Transplant Proc* 1998; 30(5):2314-2316.

## **12 Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Christoph Benckert erkläre, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema „Molekulare Charakterisierung der Effekte des transformierenden Wachstumsfaktors TGF $\beta$ -1 auf die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF im humanen cholangiozellulären Karzinom“ selbst verfaßt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 12. Juli 2005

Christoph Benckert