

Relevanz des Transkriptionsfaktors Homeobox A9 für die endotheliale Funktion

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Thomas Jan Brühl
aus Döbeln

Frankfurt 2005
(DF1)

vom Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe – Universität
als Dissertation an Dissertation.

Dekan: Prof. Dr. Wittig

Gutachter: Prof. Dr. Starziski-Powitz und Prof. Dr. Dimmeler

Datum der Disputation: 07.03.2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2002 bis November 2005 in der Abteilung Molekulare Kardiologie der Medizinischen Klinik IV an der Universitätsklinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität durchgeführt und von Prof. S. Dimmeler betreut.

Frau Prof. Dr. Starzinski-Powitz danke ich für die Betreuung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Stefanie Dimmeler danke ich für die Überlassung des Themas, der hervorragenden und engagierten Betreuung dieser Arbeit, sowie den sehr guten Arbeitsbedingungen.

Herzlichen Dank schulde ich Dr. C. Urbich die mich im gesamten Verlauf dieser Arbeit betreut hat sowie Dr. Lothar Rössig und die geduldige und kompetente Einführung in das Labor sowie für die vielen anregenden Diskussionen.

Zusätzlich haben mir Dr. J. Haendeler, Dr. A. Aicher und Prof. Dr. C. Heeschen oft mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Darüber hinaus haben Andrea Knau, Melanie Näher, Iris Stügelmeier, Nicole Konecny, Florian Diehl zu einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Viola Fauth, die während dieser Arbeit unseren Sohn Felix zur Welt gebracht hat, für ihre wunderbare Freundschaft und Liebe. Die Geborgenheit in meiner Familie hat erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Veröffentlichungen

Rossig L, Urbich C, **Bruhl T**, Dernbach E, Heeschen C, Chavakis E, Sasaki K, Aicher D, Diehl F, Seeger F, Potente M, Aicher A, Zanetta L, Dejana E, Zeiher AM, Dimmeler S

Histone deacetylase activity is essential for the expression of HoxA9 and for endothelial commitment of progenitor cells.

J Exp Med. 2005 Jun 6;201(11):1825-35.

Urbich C, Knau A, Fichtlscherer S, Walter DH, **Bruhl T**, Potente M, Hofmann WK, de Vos S, Zeiher AM, Dimmeler S

FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells.

FASEB J. 2005 Jun;19(8):974-6.

Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Sasaki K, **Bruhl T**, Farhadi MR, Vajkoczy P, Hofmann WK, Peters C, Pennacchio LA, Abolmaali ND, Chavakis E, Reinheckel T, Zeiher AM, Dimmeler S.

Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization.

Nat Med. 2005 Feb;11(2):206-13.

Bruhl T, Urbich C, Aicher D, Acker-Palmer A, Zeiher AM, Dimmeler S.

Homeobox A9 transcriptionally regulates the EphB4 receptor to modulate endothelial cell migration and tube formation.

Circ Res. 2004 Apr 2;94(6):743-51.

Bruhl T, Heeschen C, Aicher A, Jadidi AS, Haendeler J, Hoffmann J, Schneider MD, Zeiher AM, Dimmeler S, Rossig L.

p21Cip1 levels differentially regulate turnover of mature endothelial cells, endothelial progenitor cells, and in vivo neovascularization.

Circ Res. 2004 Mar 19;94(5):686-92.

Für Felix

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	9
1.1 Das Blutgefäßsystem.....	9
1.2 Angiogenese und Vaskulogenese	10
1.3 Molekulare Mechanismen der Gefäßneubildung	13
1.4 Transkriptionelle Regulation der Blutgefäßneubildung	15
1.5 Homeobox – Transkriptionsfaktoren	19
1.6 Effekte von Homeobox-Transkriptionsfaktoren in Angiogenese und Vaskulogenese	22
1.7 Der Transkriptionsfaktor HoxA9.....	25
1.8 Fragestellung	29
2. Material und Methoden.....	30
2.1 Verwendete Organismen	30
2.2 Nährmedien	30
2.3 cDNA – Klonierung	31
2.4 Plasmidpräparation	31
2.5 Viruskonstruktion	31
2.6 Kultivieren von Endothelzellen.....	33
2.7 Kultivieren von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293)	33
2.8 Isolierung und Kultivierung von endothelialen Progenitorzellen.....	34
2.9 RNA-Isolierung	34
2.10 RT-PCR	35
2.11 Protein-Präparation aus Zellen	37
2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration	38
2.13 Immunpräzipitation.....	38
2.14 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).....	38
2.15 Transfer von Proteinen (Western Blot).....	39
2.16 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine.....	39
2.17 Immunocytochemischer Nachweis von Proteinen	41
2.18 Transfektion von Oligonukleotiden.....	41

Inhaltsverzeichnis

2.19 Transfektion von Plasmiden.....	42
2.20 Virustransduktion	42
2.21 Genotypisierung.....	43
2.22 Isolierung und Kultivierung reifer endothelialer Mäusezellen (Outgrowth – Assay).....	43
2.23 Isolierung und Kultivierung von murinen endothelialen Vorläuferzellen	45
2.24 Isolierung und Kultivierung von Allantois	46
2.25 Untersuchung der Apoptoserate reifer Endothelzellen	46
2.26 Untersuchung der Proliferationsrate mittels BrdU	47
2.27 Nachweis von endogenem NO mittels FACS-Analyse.....	48
2.28 CFU-Assay	49
2.29 Chromatin-Immunopräzipitation	50
2.30 Luciferase-Reportergen-Assay	51
2.31 Migrationsassay	53
2.32 In vitro – Matrigelassay	54
2.33 Hinterlauf-Ischämie	54
2.34 Blutbildbestimmung.....	55
2.35 Shear-Stress-Exposition	55
2.36 Statistik	56
3. Ergebnisse	57
3.1 Der vaskuläre Phänotyp HoxA9-defizienter Mäuse	57
3.1.1 Genotypisierung	57
3.1.2 HoxA9 ist essentiell für die postnatale Neovaskularisierung.....	58
3.2 Der Einfluss von HoxA9 auf die Angiogenese	59
3.2.1 Aortenoutgrowth - Assay	59
3.2.2 Einfluss von HoxA9 für die endotheliale Apoptose, Proliferation und Migration	60
3.2.3 Die Regulation reifer Endothelzellen durch HoxA9.....	62
3.3 Der Einfluss von HoxA9 auf die Vaskulogenese.....	68
3.3.1 HoxA9 reguliert die postnatale Differenzierung endothelialer Progenitorzellen	68
3.3.2 HoxA9 trägt zur funktionellen Integrität endothelialer Vorläuferzellen bei	70
3.4 Der Einfluss von HoxA9 auf die embryonale Angio- und Vaskulogenese ex vivo	74
3.5 Zielgene von HoxA9	74
3.5.1 Der EphB4-Rezeptor	74

Inhaltsverzeichnis

3.5.2 Das Integrin $\alpha_v\beta_3$	83
3.5.3 Die Endothelzellmarker eNOS, VEGFR-2 und VE-Cadherin	87
3.6 Die Bedeutung von HoxA9 für die Schubspannungs-induzierte Expression von eNOS, VEGF-R2 und VE-Cadherin	92
4. Diskussion	95
4.1 Funktionen von HoxA9.....	95
4.2 Zielgene von HoxA9	96
4.3 Funktion der Zielgene von HoxA9.....	100
4.4 Bedeutung von HoxA9 in vivo.....	106
4.5 Regulation von HoxA9	107
5. Zusammenfassung	110
6. Abkürzungsverzeichnis	112
7. Literaturverzeichnis	116

1. Einleitung

1.1 Das Blutgefäßsystem

Blutgefäße versorgen alle Gewebe eines Organismus mit Nährstoffen und Sauerstoff und transportieren Kohlendioxid und Stoffwechselprodukte wieder ab. Sie dienen außerdem dem Transport und der Verteilung von Hormonen und Enzymen. Für die Sicherstellung einer adäquaten Versorgung der Zellen aller Organe durch Diffusion und Konvektion ist das vaskuläre Netzwerk hierarchisch über den gesamten Organismus aufgebaut. Die vom Herzen wegführenden Gefäße, die Arterien und Arteriolen, verzweigen sich in Kapillaren. Postkapillar vereinigen sich diese Gefäße wieder zu Venuolen und Venen, welche die zum Herzen hinführenden Gefäße darstellen.

Die größeren Gefäße weisen alle einen gemeinsamen Bauplan auf. Die innerste Schicht, die Tunica intima, besteht aus flachen Endothelzellen, die einer Basalmembran aufsitzen. Daran schließt sich die Tunica media an, die je nach Gefäßtyp, vor allem glatte Muskulatur oder elastische Fasern enthält. Nach außen wird das Gefäß von der Tunica adventitia umgeben, die als dünne Schicht mit dem angrenzenden Gewebe in Verbindung steht. Sie enthält neben kollagenen und elastischen Fasern, Blutgefäße, die Vasa vasorum, und vegetative Nerven (Liebich, 1999; Klinke und Silbernagl, 2001; Jain 1987; Mulvany 1992). Die kleinsten Gefäße stellen die Kapillaren dar. Sie dienen dem Stoffaustausch und können entsprechend der Stoffwechselintensität stark verzweigte Netzwerke ausbilden. Kapillaren bestehen aus Endothelzellen, die von flachen Perizyten und einer Basallamina bedeckt sind. Aufgrund ihrer Lokalisation als Kontaktschicht zwischen dem strömenden Blut und der Gefäßwand erfüllen Endothelzellen wichtige Funktionen, die weit über die Auskleidung der Gefäße hinausgehen. Alle Veränderungen im strömenden Blut werden vom Endothel wahrgenommen und als Reaktion an die Gefäßwand weitergeleitet. Solche Veränderungen beinhalten mechanische Reize, Konzentration vasoaktiver Substanzen und metabolischer Faktoren. Damit greift das Endothel in die Gefäßregulation ein und übernimmt eine

Einleitung

Vielzahl von Funktionen, wie die Regulation des Gefäßtonus, der Beeinflussung der Homöostase von Thrombose und Fibrinolyse, der Permeabilität und der Interaktion mit Leukozyten (Furchgott und Zawadski, 1980; Cines et al, 1998; Dart und Chin-Dustin, 1999; Butcher, 1991; Cotran und Mayadas-Norton, 1998, Hartwell und Wagner, 1999). Schädigungen dieser inneren Schicht der Blutgefäße treten vor allem durch Wundverletzungen und im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose auf. Eine globale oder selektive Schädigung des Endothels hat weitreichende Auswirkungen auf die Durchblutung und Funktion der davon betroffenen Organe.

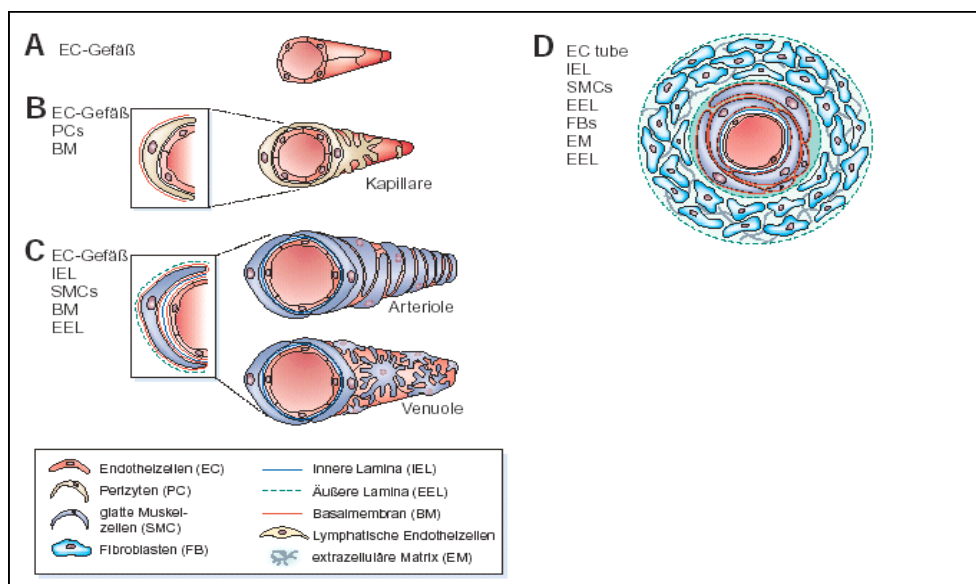


Abbildung: Aufbau und Struktur der verschiedenen Blutgefäße eines adulten Organismus A) naszierende Kapillaren bestehen nur aus einer Endothelzellschicht. Diese Struktur differenziert dann in die verschiedenen Blutgefäße B) Kapillaren C) Struktur von Venuolen und Arteriolen D) Aufbau aller größeren Gefäße im humanen Organismus (modifiziert nach Jain, 2003)

1.2 Angiogenese und Vaskulogenese

Während der Embryogenese treten verschiedene Arten der Bildung von neuen Gefäßen, die Angiogenese und Vaskulogenese auf. Bei der Vaskulogenese entstehen primäre Blutgefäße aus sich in situ differenzierenden Zellen, die dem

Angioblasten abstammen oder sich direkt aus pluripotenten Stammzellen bilden (Risau et al., 1988; Poole und Coffin, 1988). Mit dem Wachstum des Embryos kommt es zu einer weiteren Form der Gefäßneubildung. Hierbei entstehen neue Gefäße durch Sprossung aus bereits bestehenden Gefäßen. Dieser Prozess des Aufbaus neuer Kapillaren wird als Angiogenese bezeichnet (Folkman, 1984). Im Herzen, der Lunge und der Allantois werden während der Embryonalentwicklung Gefäße durch transkapilläre Pfeiler geteilt. Dieser Vorgang kann keinen der beiden Prozesse der Gefäßneubildung eindeutig zugeordnet werden, sondern stellt in bestimmten Punkten die Mitte zwischen diesen dar (van Groningen, 1991; Burri, 1992; Patan et al., 1996; Risau, 1997).

Im Allgemeinen ist die Bildung neuer Blutkapillaren, die das Gewebe durchziehen, im adulten Organismus abgeschlossen. Nach einer Ischämie, z.B. in Folge eines Infarktes, aber auch bei der Wundheilung, durch eine Gewebsverletzung und zum Wiederaufbau der Gebärmutterschleimhaut nach der Menstruation (Risau, 1997) ist die Entstehung neuer Gefäße notwendig. Die Endothelzellen der Gefäßwand spielen dabei eine entscheidende Rolle. Die im gesunden adulten Organismus einige Monate bis mehrere Jahre dauernde Proliferationsrate steigt auf wenige Tage an, was eine zeitlich begrenzte Kapillarneubildung bewirkt. Dieser Prozess der Neubildung von Kapillaren durch Aktivierung der Endothelzellen, deren Proliferation und Migration und abschließende Lumenbildung wird als physiologische Angiogenese (Folkman, 1984; Breier et al., 1997) bezeichnet. Störungen des Gleichgewichts, z. B. aufgrund eines Tumors, können durch ein erhöhtes oder ungenügendes Kapillarwachstum (pathologische Angiogenese) zu einer Vielzahl von Erkrankungen führen (Breier et al, 1997; Folkman et al, 1971; Plendl an Sinowatz, 1999).

Neben der Angiogenese aus bereits differenzierten Zellen, gibt es mit der Vaskulogenese eine zweite Art der Gefäßneubildung aus Stamm- bzw. Vorläuferzellen. Als Stammzellen werden definitionsgemäß solche Zellen bezeichnet, die nicht vollständig differenziert sind und die eine duale Fähigkeit zur assymetrischen Zellteilung besitzen. Dabei entstehen eine identische (zur Erhaltung der Replikationsfähigkeit) und eine differenzierte, spezialisierte Tochterzelle. Progenitor- oder Vorläuferzellen stellen den Übergang zwischen

Stammzellen und maturen Zellen dar, d.h. sie besitzen nicht mehr die gesamte Plastizität und Replikationsfähigkeit der Stammzellen, sind jedoch noch keine spezialisierten, ausdifferenzierten Zellen.

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass Zellen die aus dem peripheren Blutkreislauf isoliert wurden und antigene Determinanten von Angioblasten und hämatopoetischen Vorläuferzellen aufwiesen, sich *in vitro* zu Endothelzellen differenzieren ließen und in Lage waren kapillarähnliche Strukturen zu bilden (Asahara et al, 1997). Diese Zellen werden als endotheliale Vorläuferzellen (EPC) bezeichnet. Weitere Experimente legten in der Folge nahe, dass EPC an der Neovaskularisierung beteiligt sind (Lin et al., 2000; Kalka et al., 2000; Walter et al., 2002). In Anlehnung zur embryonalen Entwicklung des Gefäßsystems aus Angioblasten bezeichnet man die Entstehung neuer Gefäße aus endothelialen Vorläuferzellen als Vaskulogenese.

Ein dritter Mechanismus für das postnatale Wachstum von Gefäßen ist die Arteriogenese. Dabei entstehen größere Arterien aus einem bereits bestehenden Netz kleiner arterieller Verbindungen. Diese Art des Wachstums ist allerdings keine Neubildung von Gefäßen.

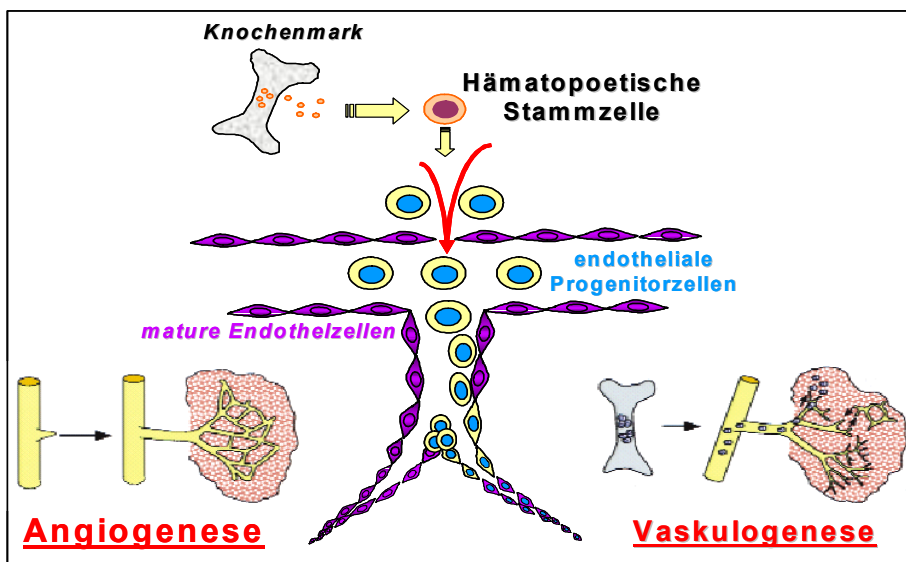


Abbildung: Angiogenese - mature Endothelzellen bilden neue Gefäße durch Migration und Proliferation; Vaskulogenese - vom Knochenmark abstammende im Blut zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen adhären im Gewebe, differenzieren und tragen zur Gefäßneubildung bei (modifiziert nach Carmeliet, 2000)

1.3 Molekulare Mechanismen der Gefäßneubildung

Die Bildung neuer Blutgefäße, durch Angiogenese und Vaskulogenese, benötigt eine Vielzahl an Prozessen. Dies schließt die Stabilisierung der gerade neu entstandenen Gefäße, die Bildung einer extrazellulären Matrix um das Gefäß herum oder die Spezialisierung der Gefäßwand für die Sicherstellung der zukünftigen Funktion des Gefäßes, mit ein. Diese Abläufe sind durch physiologische Prozesse, wie Blutdruck oder Sauerstoffversorgung sowie durch ein konzertiertes Netzwerk aus Liganden und Rezeptoren, die Zeit-, Raum- und Konzentrations-abhängig exprimiert werden, reguliert. Angiogenese beginnt meistens mit Stress, wie Hypoxie, wie er in Folge eines Infarkts, bei entzündlichen Prozessen oder durch einfaches Gewebewachstum vorkommt. Dadurch wird die Expression von Genen der beginnenden Angiogenese, wie die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS), der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), Angiopoetin-2 (Ang2) oder verschiedene Proteasen, angeregt. Bereits existierende Gefäße weiten sich als Antwort auf Stickstoffmonoxid (NO) ein Produkt der eNOS und werden durch die Ausschüttung von VEGF undicht. Die Basallamina und die extrazelluläre Matrix (ECM) degradieren durch die Aktivierung verschiedener Proteasen (z. B. Metalloproteasen MMP2, MMP3 und MMP9) bzw. der Hemmung der entsprechenden Proteaseinhibitoren (z.B. PAI1 oder TIMP). Die Endothelzellen der bestehenden Gefäße können dann durch Interaktion zwischen Integrinen und Matrix auswandern und als Antwort auf VEGF und andere mitogene Stimuli proliferieren. Ang2 schließlich erlaubt den ausgewanderten Endothelzellen, neue kleine Gefäße zu bilden (Pugh und Ratcliffe, 2003; Ferrara, 1999; Dvorak, 2000; Ausprunk und Folkman, 1977; Yancopoulos, 2000). Im nächsten Schritt der Angiogenese wird das gerade neu gebildete vaskuläre Netzwerk stabilisiert. In die Regulation dieser Stabilisierung sind vor allem vier Signalwege involviert. Der Thrombozyten-Wachstumsfaktor (PDGF) B wird, vermutlich als Antwort auf VEGF, vor allem von Endothelzellen sezerniert und erleichtert so die Rekrutierung von Zellen der Gefäßwand (Hellstrom et al., 2001). Unterstützt wird diese Rekrutierung von Gefäßwandzellen durch den zweiten sehr wichtigen Signaltransduktionsweg Sphingosine-1-phosphat (S1P) und dessen Rezeptor (EDG1), der direkt auf den

Gefäßwandzellen exprimiert wird. Ein ähnlicher vaskulärer Phänotyp von EDG1- und PDGF B - Knockout - Mäusen lässt eine Verbindung zwischen diesen beiden Signalwegen vermuten (Kluk und Hla, 2002). Alternativ dazu wird diskutiert ob der EDG1-Signalweg Einfluss auf die Matrixproduktion der Endothelzellen nimmt, die Endothelzellen - Gefäßwand - Interaktion beeinflusst oder mit der Gefäßreifung direkt interferiert (Cho et al., 2003). Die Faktoren Angiopoetin (Ang) -1 und Ang2 und deren Rezeptoren Tie1 und Tie2 sind als dritter wichtiger Signalweg in die Ausbildung und Stabilisierung der Gefäße involviert. Hauptwirkungspunkt für Ang1 und Ang2 sind vermutlich die Gefäßwand und die Endothelzellen. Ang1 stabilisiert die sprossenden Kapillaren und bewirkt deren Abdichtung, vermutlich indem es bei der Kommunikation zwischen Gefäßwand und Endothelzellen hilft. Die Funktion von Ang2 ist abhängig vom Kontext der Genexpression des Umfeldes. So unterstützt Ang2 bei gleichzeitiger Expression von VEGF die Kapillarsprossung, jedoch destabilisieren selbst größere Gefäße durch Ang2 bei Abwesenheit von VEGF (Uemura et al., 2002). Trotz der Erkenntnis, dass die Angiopoetine eine enorm wichtige Rolle bei der Angiogenese spielen, sind die Mechanismen, über die diese Faktoren wirken, noch weitgehend ungeklärt. Im vierten Signalweg regt der Transformationswachstumsfaktor β (TGF β) die Bildung einer ECM an, indem er die Differenzierung mesenchymaler Zellen in Gefäßwandzellen induziert. TGF β wird in fast allen Zellen eines Gefäßes exprimiert und kann konzentrationsabhängig sowohl pro- als auch antiangiogen wirken (Pepper, 1997; Gohongi et al., 1999). Neben diesen vier hier im Besonderen besprochenen Signalwegen, spielen noch viele andere Moleküle in diesem System eine wichtige Rolle. So zeigen verschiedene Arbeiten, dass für die hierarchische Struktur der Gefäße in ein arterielles und ein venöses System die Eph-Rezeptoren und deren Liganden die Ephrine entscheidende Funktionen übernehmen. Knockout-Mäusen denen der EphB4-Rezeptor oder der EphrinB2-Ligand fehlt sterben am Tag 10.5 aufgrund schwerer struktureller Defekte im kardiovaskulären System (Gerety et al., 1999). Außerdem konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass der VEGF-Rezeptor 2 (VEGF-R2) als einer der Rezeptoren für VEGF, während der Angiogenese nicht alleine die Funktion von Endothelzellen moduliert, sondern seine Wirkung im Zusammenhang mit anderen Adhäsionsmolekülen, wie dem vaskulären-

endothelialen (VE) – Cadherin (Carmeliet et al., 1999) oder den Integrinen $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ (Friedlander et al., 1995; Soldi et al., 1999), entfaltet. Eine Hemmung der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ mit blockierenden Antikörpern führte zu einer Inhibierung der in vivo Tumorangiogenese (Kumar et al., 2001). Neben diesen und anderen Rezeptoren, Wachstumsfaktoren oder Moleküle die wichtige Funktionen in der Regulation von Angiogenese und Vaskulogenese übernehmen, ist die transkriptionelle Regulation der verschiedenen Komponenten bei der Entstehung und Erhaltung eines vaskulären Netzwerkes von entscheidender Bedeutung.

1.4 Transkriptionelle Regulation der Blutgefäßneubildung

Zelltypen eines vielzelligen Organismus entwickeln sich unterschiedlich, weil sie verschiedene Genexpressionsmuster aufweisen. Das heißt, sie synthetisieren verschiedene mRNA und Proteine, die jede Zelle im Organismus dazu befähigt die ihr anvertrauten Aufgaben zu übernehmen. Es gibt viele Schritte auf dem Weg von der DNA zum fertigen, funktionellen Protein, die reguliert werden können. So wird im ersten Schritt, der Transkriptionskontrolle, überwacht und reguliert, wann und wie oft ein Gen transkribiert wird. Weitere Stufen der Expressionskontrolle bei Eukaryonten sind die Regulation des RNA-Processings, -Transports und der mRNA-Stabilität, sowie der Translation, der Protein-Aktivität und -Stabilität.

Während die Signalwege, die der Bildung eines vaskulären Netzwerkes durch Wachstumsfaktoren, Zytokinen und deren Rezeptoren zugrunde liegen, ausführlich untersucht worden sind, ist wenig über die Details der daraufhin aktivierten Transkriptionsfaktoren bekannt. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Faktoren, die die oben beschriebenen Signalwege initiieren. Dies steht im Kontrast zur Regulation anderer Entwicklungsprozesse wie der Hämatopoese oder Myogenese, wo bereits verschiedene zell- und gewebespezifische Transkriptionsfaktoren identifiziert werden konnten. Ein Grund für diese Diskrepanz könnte darin liegen, dass der Verlust oder Defekt von Genen die die Gefäßbildung betreffen, häufig schon pränatal zum Tod führt. Trotzdem konnten in den letzten Jahren eine Reihe

von Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, denen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Angiogenese und Vaskulogenese zukommt.

Untersuchungen an transgenen Mäusen, in denen das Gen der β -Galaktosidase (lacZ) hinter ein endothel-spezifisches Gen, wie Tie1, Tie 2 oder VEGF-R2 generiert wurde, ermöglichten einen ersten Einblick in die transkriptionelle Kontrolle der vaskulären Entwicklung. So konnte unter anderem festgestellt werden, dass der Tie1-Promotor allein ausreicht um die lacZ-Expression endothel-spezifisch anzuregen (Ilijin et al., 1999). Im Gegensatz dazu benötigen die Promotoren von Tie2 und VEGF-R2, für eine endothel-spezifische Expression, ein im Gen liegendes Enhancer-Element (Schlaeger et al., 1997; Kappel et al., 2000). DNA-Bindungsstudien konnten zeigen, dass die spezifische Regulation von Tie1, von Ets-Faktoren, wie NERF oder ELF-1, und von Transkriptionsfaktoren der AP-2 - Familie abhängig ist. Die endothel-spezifische Expression von VEGF-R2 und Tie2 dagegen ist von mehreren Ets-Faktoren (Ets-1 und -2 sowie NERF und ELF-1), von SCL/Tal-1 und verschiedenen GATA-Faktoren reguliert (Wakiya et al., 1996; Dube et al., 1999; Dube et al., 2001). In-situ - Hybridisierung für einen weiteren Ets-Transkriptionsfaktor Fli-1 zeigten eine Anreicherung in sich entwickelten neuen Gefäßen in Zebrafischen (Brown et al., 2000). Fli-1 defiziente Mäuse sterben embryonal nach der Ausbildung des ersten vaskulären Netzwerkes an schweren inneren Blutungen. Diese und andere Experimente legen nahe, dass für die zell- und gewebespezifische Expression von Genen verschiedene Transkriptionsfaktoren verantwortlich sind. Neben der spezifischen Wirkung, gibt es natürlich Bereiche in denen sich die Funktion von Transkriptionsfaktoren überlappt. So wurden die Proteine SCL/Tal-1 ursprünglich streng mit der Hämatopoese in Verbindung gebracht. Der Genverlust für diese Faktoren führte bei Mäusen zu einem vollständigen Verlust der Erythropoese (Shivdasani et al., 1995). Jedoch zeigte sich bei konditionalen Knockout-Mäusen bei denen die SCL/Tal-1-Expression spezifisch für hämatopoetische Zelllinien erhalten blieb, ein Defekt der Angiogenese im Dottersack (Visvader et al., 1998). Weiterhin spricht der gemeinsame Ursprung von hämatopoetischen wie auch endothelialen Zellen im Embryo aus den Hämangioblasten für eine konservierte und überlappende

Einleitung

Regulation beider Zellarten auch auf transkriptioneller Ebene (Kennedy et al., 1997; Choi et al., 1998).

Tabelle: Überblick über wichtige Transkriptionsfaktoren für Angiogenese und Vaskulogenese (modifiziert nach Oettgen, 2001)

Transkriptionsfaktor	Familie	Funktion
AML-1	CBF	Angiogenese
ELF-1	Ets (wHTH)	Tie2 – Regulation
Ets-1	Ets (wHTH)	Angiogenese
Fli-1	Ets (wHTH)	Tie2 – Regulation Gefäßentwicklung
NERF2	Ets (wHTH)	Tie2 – Regulation
TEL	Ets (wHTH)	Dottersackangiogenese
MEF2C	MADS - Box	Gefäßentwicklung Differenzierung glatter Muskelzellen
Smad5	MADS - Box	Differenzierung glatter Muskelzellen Angiogenese
SCL/Tal-1	basic HLH	Gefäßentwicklung
dHAND	bHLH	Differenzierung glatter Muskelzellen
Tfeb	bHLH-Zip	Plazentavaskularisierung
Fra1	basic Zip	Endothelzeldifferenzierung VEGF-R2 – Regulation
COUP-TFII	Kernrezeptor	Dottersackangiogenese Ang2 - Regulation

Zusätzlich zur grundsätzlichen Bedeutung von Transkriptionsfaktoren für die Entstehung eines vaskulären Netzwerkes, zeigen verschiedene Studien auch deren Bedeutung für die einzelnen Schritte bei der Bildung eines Gefäßes. Dies schließt die Initiierung der Angiogenese, die Differenzierung hin zu Endothelzellen oder glatten Muskelzellen genauso mit ein, wie die Modulation eines ersten Gefäßes aus einzelnen Endothelzellen. So führt ein gezielter Genverlust von Fra1, einem der ersten Gene die im Hämangioblasten aktiv werden, zu einer

Einleitung

signifikanten Verringerung von ausgereiften Endothelzellen, und dem Tod des Embryos am Tag E10.0 was Rückschlüsse auf dessen Bedeutung für die endotheliale Differenzierung zulässt (Schreiber et al., 2000). Mit dem Beginn der Angiogenese proliferieren Endothelzellen, wandern vom bestehenden Gefäß weg und bilden erste primitive kleine Gefäße. Der Transkriptionsfaktor HESR1 wird während dieser Prozesse in erhöhtem Maße exprimiert. Überexpression dieses Faktors führt zu einer verringerten Synthese von VEGF-R2, was zur Reduktion der VEGF-induzierten Proliferation der Endothelzellen führt. Andererseits bewirkt eine Behandlung mit Oligonukleotiden gegen HESR1 eine Hemmung der primitiven Gefäßbildung (Henderson et al., 2001). Sprossende und entstehende Kapillaren benötigen für ihren dauerhaften Erhalt eine stabilisierende Hülle. Dafür setzen die Endothelzellen PDGF und TGF β frei und bewirken so eine Differenzierung mesenchymaler Zellen in glatte Muskelzellen. Studien an Smad5-defizienten Mäusen zeigen embryonal stark vergrößerte Blutgefäße mit einer verringerten Anzahl an glatten Muskelzellen. Der Verlust von Smad5, ein Transkriptionsfaktor der MADS-Box-Familie, resultiert in einer erhöhten Apoptose mesenchymaler Zellen sowie einer Verschlechterung der Differenzierung solcher Zellen in glatte Muskelzellen (Yang et al., 1999).

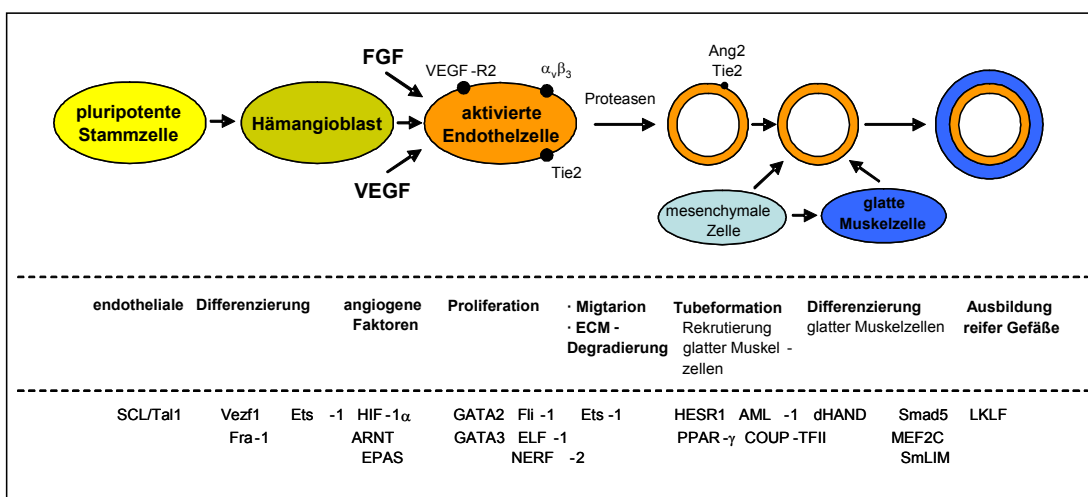


Abbildung: Rolle verschiedener Transkriptionsfaktoren während der verschiedenen Stadien der Entwicklung eines vaskulären Netzwerkes (modifiziert nach Oettgen, 2001)

1.5 Homeobox – Transkriptionsfaktoren

In den letzten Jahren rückte eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren in den Blickpunkt des Interesses der genetischen Kontrolle im adulten Organismus, die vorher nur für die Regulation frühester morphologischer Entwicklungsprozesse bekannt waren, die Homeobox - Gene.

Homeobox-Gene wurden erstmals in *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo sie zum Teil zu bizarren Störungen im strukturellen Aufbau der adulten Fliege führen (Lewis, 1978). In den darauf folgenden Jahren wurden solche Gene in nahezu allen eukaryontischen Organismen gefunden (Levine et al., 1984; Akam, 1989). Proteine aus dieser Familie besitzen alle eine stark konservierte Sequenz von 183 Nukleotiden, welche für eine DNA-Bindungsdomäne von 63 Aminosäuren mit einem Helix-Loop-Helix - Motiv, der Homeodomäne, kodieren (Gehring et al., 1986; Scott et al., 1989; Gehring et al., 1994).

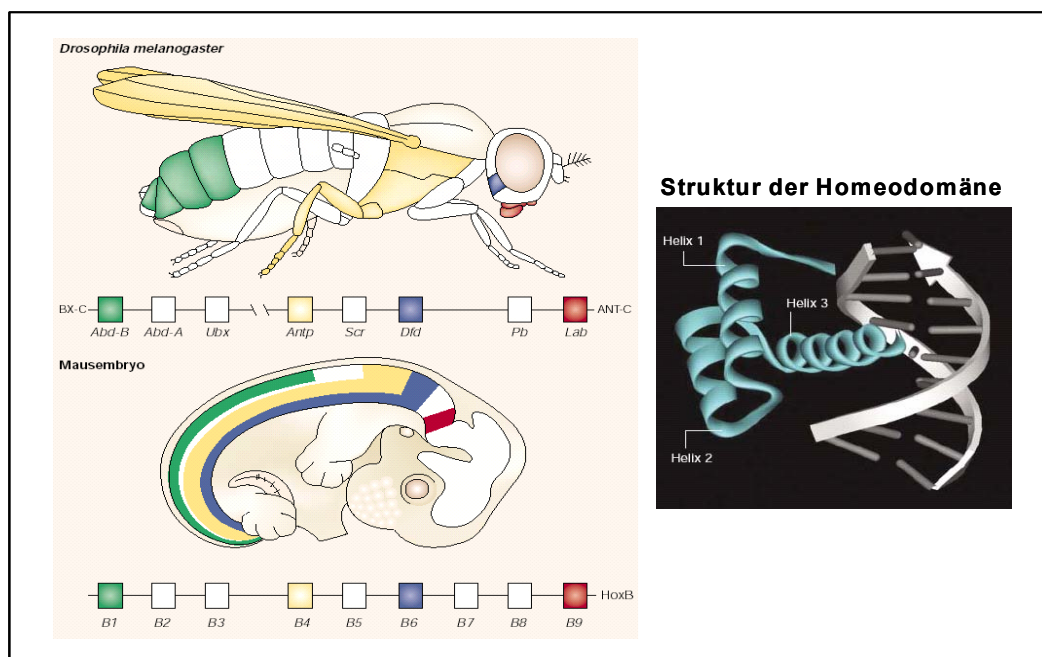


Abbildung: Homeobox-Gene sind in fast allen eukaryontischen Organismen nachgewiesen worden und der Grundaufbau in den einzelnen Homeobox-Komplexen blieb evolutionär erhalten (links). Die Struktur der DNA-Bindungsdomäne (Homeodomäne) weist ein Helix-Loop-Helix – Motiv auf (rechts). Nach Abate-Shen, 2002

Einleitung

Homeobox-Gene sind auf Grund der Struktur ihrer Homeodomäne in verschiedene Subgruppen und Familien unterteilt. Die größte und wichtigste Gruppe, die *Drosophila Antennapedia* (Antp) besitzen neben ihrer eigentlichen Homeodomäne noch eine kurze Konsensussequenz, die so genannte Hexapeptidsequenz, die die Interaktion mit anderen Homeoboxproteinen ermöglicht. Solche Antp-Proteine werden bei Säugern und anderen Vertebraten auch als Klasse1-Homeobox-Gene bezeichnet (Acampora et al., 1989). Mammalia-Klasse1-Homeobox-Gene sind in vier Komplexen, den Hox-Loci A - D, organisiert, wobei jede Gruppe auf einem anderen Chromosom liegt. Erstaunlicherweise scheint jeder der vier Komplexe das Äquivalent eines vollständigen Insekten-Homeobox-Komplexes (HOM-C) zu entsprechen. Die Anordnung und Organisation innerhalb jeder dieser Gruppen stimmt im Wesentlichen mit der eines HOM-C überein. Auch das Expressionsmuster in Embryonen von Säugern entlang der Spinalachse und entlang der Proximal-Distalachse ist kollinear mit dem Expressionsmuster bei Insekten (Duboule und Dollé, 1989; McGinnis und Krumlauf, 1992; Lawrence und Morata, 1994). Diese Daten lassen darauf schließen, dass die vier Säugerkomplexe evolutionär durch Duplikationen eines einzelnen primordialen Komplexes entstanden sind und dessen Grundorganisation erhalten haben. Die Komplexe HoxA - D sind weiterhin auf Basis ihrer Sequenzhomologien zueinander in Subgruppen unterteilt, durch die 13 verschiedene paraloge Gruppen definiert worden sind (Apiou et al., 1996).

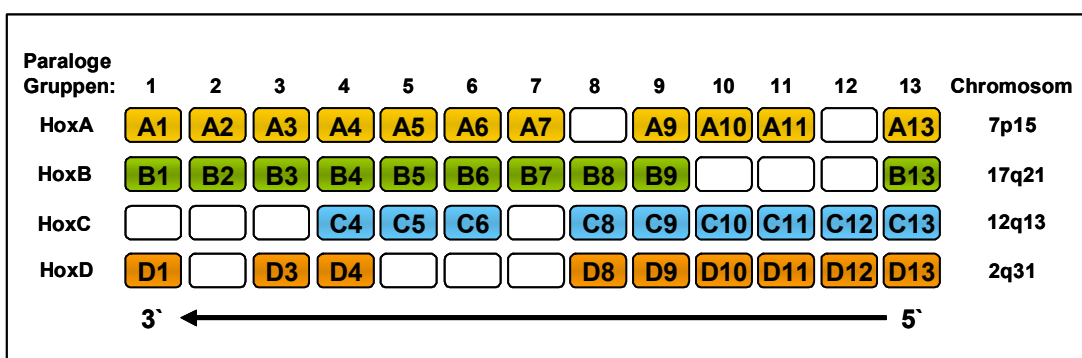


Abbildung: schematische Darstellung des chromosomalen Arrangements aller Gene der Hox-Familie (nach Magli et al., 1997)

Da Homeobox-Proteine den Bauplan des Organismus während der Embryogenese entlang der verschiedenen Achsen festlegen, ist eine zeitliche und räumliche Kontrolle dieser Proteine von essentieller Bedeutung. Wie diese Kontrolle auf molekularer Ebene jedoch stattfindet, ist im Einzelnen noch nicht genau bekannt. Es gibt Hinweise, dass Hox-Gene durch Retinol (Vitamin A₁) und vermutlich durch bestimmte Wachstumsfaktoren, wie TGF β , Aktivin oder bFGF aktiviert werden. So wurde bei embryonalen Karzinomzellen, deren Differenzierung durch Retinsäure induziert worden war, eine sequenzielle Aktivierung der Hox-Gene von 3' nach 5' beobachtet (Simeone et al., 1990; Simeone et al., 1991). Außerdem können Hox-Gene durch ihre eigenen Genprodukte autoreguliert oder durch andere Homeobox-Proteine kontrolliert werden (Popperl et al., 1992; Arcioni et al., 1992; Popperl et al., 1995). Für das MLL-Gen, ein Homeobox-Protein mit Homologien zum *Trithorax*-Protein bei *Drosophila* konnte eine sowohl zeitliche als auch räumlich begrenzte positive Regulation verschiedenster Hox-Gene gezeigt werden (Ziemin van der Poel et al., 1991; Ernst et al., 2004). Die Wichtigkeit der Homeobox-Genen bei der Entwicklung zukommt, wird durch die Tatsache unterstrichen, dass MLL-Knockout-Mäuse aufgrund einer stark veränderten Hox-Genexpressionsmusters entlang der anterior-posterior-Achse schon frühzeitig embryonal sterben (Yu et al., 1995). Im Gegensatz dazu können Transkriptionsfaktoren der Polycomb-Familie die Expression verschiedener Hox-Gene negativ beeinflussen (Muller et al., 1995; Luo et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit der Regulation für Transkriptionsfaktoren besteht in der epigenetischen Kontrolle der DNA. Tatsächlich gibt es Hinweise auf einen Einfluss von Histonacetylasen bzw. Histondeacetylasen auf die Aktivität und das Expressionsmuster von Hox-Proteinen (Chariot et al., 1999; Shen et al., 2001; Rossig et al., 2005).

Untersuchungen an unterschiedlichen Tumoren im adulten Organismus zeigten eine, häufig mit der Tumorgenese einhergehende, Dysregulation der unterschiedlichsten Hox-Proteine und führten schließlich zu der Überzeugung, dass Hox-Proteine nicht nur embryonal, sondern auch im postnatalen und adulten Organismus eine wichtige Rolle für die Identität und Integrität der verschiedenen Zellen haben (Peverali et al., 1990; Cillo et al., 1992; Cillo et al., 2001; Tiberio et al., 1994).

1.6 Effekte von Homeobox-Transkriptionsfaktoren in Angiogenese und Vaskulogenese

Zusätzlich zur transkriptionellen Kontrolle von Rezeptoren, Wachstumsfaktoren und Zytokinen der Angiogenese und Vaskulogenese ist es für den Organismus wichtig die transkriptionelle Antwort darauf sicherzustellen und zu regulieren. Eine gewebe- und zellspezifische Expression, physiologisches Wachstum und die Differenzierung werden auf transkriptioneller Ebene von Transkriptionsfaktoren sichergestellt. Solche übergeordneten Transkriptionsfaktoren müssen befähigt sein, multifunktionell in verschiedene Signalwege einzugreifen. Hox-Transkriptionsfaktoren haben bei Vertebraten pleiotrope Effekte auf alle wichtigen Prozesse, wie sie auch bei der Angiogenese vorkommen. Dies schließt Proliferation und Migration genauso wie Zelldifferenzierung und -dedifferenzierung mit ein (Alonso Varona et al., 1996; Cillo et al., 1999, Cillo et al., 1996; Garcia-Fernandez und Holland, 1996; Lorentz et al., 1997). Für eine funktionierende Gefäßneubildung müssen glatte Muskelzellen sowie Endothelzellen eine gewisse Plastizität aufweisen. Diese Tatsache macht Hox-Proteine daher zu idealen Kandidaten für die finale transkriptionelle Kontrolle der Zelldifferenzierung und bei der Gestaltung eines vaskulären Netzwerkes.

Während der Embryogenese werden zahlreiche Mitglieder der Hox-Familie im kardiovaskulären System exprimiert und in den meisten Fällen bleibt diese Expression auch nach der Geburt erhalten (Gorski et al., 1994; Patel et al., 1992; Miano et al., 1996). Hinweise auf die funktionelle Relevanz von Hox-Genen für die vaskuläre Entwicklung kamen von verschiedenen Knockout-Mäusen. So sterben zum Beispiel Mäuse mit einem HoxA3-Genverlust pränatal an multiplen Defekten des kardiovaskulären Systems. Neben Missbildungen der Herzwand, haben solche Tiere einen anhaltenden offenen Ductus arteriosus Botalli, Verengungen der Aortenklappe und Aorten mit schwach entwickelter und dünn ausgeprägter Gefäßwand. Neben diesen kardiovaskulären Defekten weisen HoxA3 - Knockoutmäuse weitere Fehlbildungen in anderen Funktionen und Geweben auf. Man muss auf der anderen Seite betonen, dass solche schweren Schäden bei Mäusen mit einem Genverlust in der Hox-Familie eine Ausnahme sind. Meist sind

die Phänotypen und Ausprägungen milder, da es durch die Duplikationen in den verschiedenen Hox-Clustern meist zu redundanten Funktionen der paralogen Hox-Gene kommt. Daher ist es häufig sinnvoll, die verschiedenen Gene einer paralogen Subfamilie gleichzeitig auszuschalten, damit kompensatorischen Funktionen der anderen Gene zu unterbinden und so den Hox-Genen eine Funktion, unter anderem in glatten Gefäßmuskelzellen oder Endothelzellen, zuzuweisen.

Glatte Gefäßmuskelzellen exprimieren eine Reihe von unterschiedlichen Hox-Transkriptionsfaktoren sowohl im fötalen als auch im adulten Organismus (Patel et al., 1992; Miano et al., 1996). Von besonderem Interesse ist dabei HoxB7. So differenzierten C3H10T1/2-Zellen, eine multipotente Zelllinie, nach Überexpression von HoxB7 in glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC). Damit einhergehend war eine erhöhte Proliferation, eine Induktion einer Gefäßmuskelzellen-Morphologie und eine Hochregulation der Expression früher Marker der Gefäßmuskelentwicklung, wie SM22 α und Calponin. Weiterhin erhöhte HoxB7 die bFGF-Sekretion in Brust- und Melanomatumoren und verminderte die Wachstumsfaktorabhängigkeit solcher Tumore. Diese Beobachtungen lassen einen Einfluss von HoxB7 bei der Bildung vaskulärer Strukturen, der Expansion glatter Gefäßmuskelzellen sowie bei der Differenzierung immaturer Myozyten hin zu einer reiferen Form von Muskelzellen vermuten (Bostrom et al., 2000; Care et al.; 1996).

In Endothelzellen konnten unterschiedliche Hox-Gene der Cluster HoxA, HoxB und HoxD nachgewiesen werden (Belotti et al., 1998; Boudreau et al., 1997; Myers et al., 2000). Für verschiedene dieser Hox-Gene wurde ein direkter oder potentieller Einfluss auf die Regulation von Endothelzellen in Hinblick auf deren angiogenen Funktionen gezeigt. Diese Regulation betrifft nahezu alle Teilbereiche der Angiogenese, aber auch der Vaskulogenese und konnte als pro- und als antiangiogener Einfluss nachgewiesen werden.

So werden verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie L-CAM und N-CAM durch verschiedene Hox-Proteine reguliert (Jones et al., 1992; Goomer et al. 1994; Chuong, 1993). Auch für die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ konnte eine Regulation durch HoxD3 gezeigt werden (Boudreau et al., 1997; Boudreau und Varner, 2004). Die essentielle Rolle von HoxD3 für die Angiogenese manifestiert sich auch darin, dass

es durch angiogene Stimuli, wie dem Wachstumsfaktor bFGF oder dem extrazellulären Matrixprotein Del-1 aktiviert werden kann. Im Anschluss an eine Aktivierung oder erhöhte Proteinexpression von HoxD3 wurde neben der Regulation der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ auch eine erhöhte Proteinsynthese des angiogenen Mediators Urokinase - Plasminogen - Aktivator (uPA) beobachtet (Boudreau et al., 1997). Weitere Zielgene oder Interaktionspartner von Hox-Proteinen sind unterschiedliche Proteine wie das Matrixprotein Osteopontin (OPN) oder Transkriptionsfaktoren wie Smad1 und Smad4 (Shi et al., 1999; Shi et al., 2000). Außerdem wurden auch Ephrine oder Eph-Rezeptoren als mögliche Zielgene diskutiert (Myers et al. 2000; Chen and Ruley, 1998). Hox-Gene wirken nicht nur als Aktivatoren der Angiogenese, wie HoxB3, das für eine kapillare Morphogenese und Kapillarsprossung und Migration verantwortlich ist, sondern auch als Repressoren, wie HoxA10, das den seneszenten und nicht-angiogenen Phänotyp von Endothelzellen erhält.

Neben der Proliferation und Migration von murenen EC, spielt auch die von EPCs vermittelte Vaskulogenese eine wichtige Rolle in der postnatalen Neovaskularisierung. Verschiedene Arbeiten zeigen eine wesentliche Rolle von Hox-Genen für die Differenzierung in hämatopoetischen Stammzellen (HSC). In adulten Organismen induziert HoxB4 *in vitro* die Differenzierung früher Stammzellen zu definierten HSCs, fördert die Expansion solcher Stammzellen *ex vivo* und verstärkt auch *in vivo* das regenerative Potential von HSCs hin zur einer verbesserten Hämatopoese (Kyba et al. 2002; Antonchuk et al. 2002). Neben HoxB4 greifen noch eine Vielzahl anderer Hox-Gene in dieses System der hämatopoetischen Differenzierung und Erhaltung des Stammzellpools ein. Unter anderem fördert HoxB7 die Stammzellproliferation, während HoxA5 oder HoxB6 die myeloide Differenzierung hemmt. Die endotheliale Differenzierung von multipotenten Stammzellen wird dagegen von HoxB5 begünstigt (Carè et al., 1996; Fuller et al., 1999; Fischbach et al., 2005; Wu et al., 2003). Aufgrund seiner Expression in Endothelzellen sowie in hämatopoetischen Zellen und damit seiner potentiellen Rolle für Angiogenese und Vaskulogenese war der Transkriptionsfaktor HoxA9 zentraler Punkt der Untersuchungen in dieser Arbeit.

Tabelle: Homeobox-Proteine in Angiogenese und Vaskulogenese

Gen	Funktion/Beobachtung
Angiogenese	
HoxA3	HoxA3-Knockoutmäusen haben letale kardiovaskuläre Defekte
HoxB7	Induziert die VSMC-Differenzierung von C3H10T1/2-Zellen
HoxA/B/D - Cluster	Expression in Endothelzellen
HoxD9	Reguliert die Expression von L-CAM
HoxB9/B8/C6	Regulieren die Aktivität des N-CAM - Promotors
HoxD3	Induziert die Expression der Integrine $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ und des uPA Induziert einen angiogenen Phänotyp
HoxB3	Fördert die Kapillarmorphologie von EC sowie die Angiogenese Ist essentiell für die Expression von EphrinA1
HoxA9	Interagiert mit Smad4 Inhibiert die BMP-induzierte Aktivierung des OPN-Promotors
HoxC8	Interagiert mit Smad1 Inhibiert die BMP-induzierte Aktivierung des OPN-Promotors
HoxA1/B1	Aktiviert die Aktivität des EphA2-Promotors
HoxA10	Erhält den seneszenten und nicht-angiogenen Phänotyp von EC
Vaskulogenese	
HoxB4	Fördert die Differenzierung früher HSCs Verstärkt das regenerative Potential von HSCs Reguliert die Stammzellexpansion
HoxB7	Fördert die Stammzellproliferation
HoxB5	Fördert die endotheliale Differenzierung
HoxA5/B6	regulieren die myeloide Differenzierung und HSC-Expansion
HoxA9	reguliert die Stammzellexpansion kann AML oder MLL induzieren reguliert die Differenzierung und Proliferation von HSC

1.7 Der Transkriptionsfaktor HoxA9

Das HoxA9 - Gen besteht aus drei Exons die für zwei verschiedene funktionelle Proteine kodieren. Das für die Homeodomäne kodierende Exon teilen sich beide

Proteine, während die beiden anderen Exons auf eines der beiden Isoformen beschränkt sind (Borrow et al, 1996; Kim et al., 1998). Ein Protein (HoxA9-A) wird ausschließlich während der fötalen und embryonalen Entwicklung exprimiert, während die zweite Isoform (HoxA9-B) in multiplen Geweben und Zellen im embryonalen sowie adulten Organismus exprimiert wird. Als einziges bekanntes Gen der Hox-Familie ist von HoxA9 eine endothel-spezifische Spliceform (HoxA9EC) beschrieben worden (Patel et al, 1999) und ist deshalb in den Focus dieser Arbeit gerückt. Zusätzlich dazu sind es vor allem stark durchblutete Organe, wie Lunge, Niere, Milz, Herz oder Leber, in denen HoxA9 exprimiert wird (Borrow et al, 1996; Kim et al., 1998).

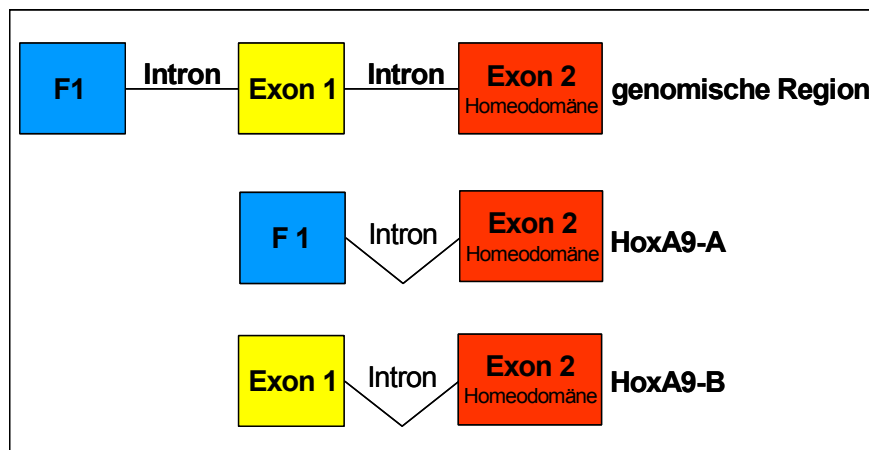


Abbildung: Die verschiedenen humanen Isoformen von HoxA9

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass HoxA9 durch angiogene Stimuli, wie zum Beispiel $TGF\beta$ und $TNF\alpha$ reguliert werden kann (Shi et al., 2001; Patel et al., 1999). Darüber hinaus wird HoxA9 über verschiedene Kofaktoren reguliert. So bildet HoxA9 mit anderen Homeobox-Proteinen verschiedene Heterodi- und -trimere. Die wichtigsten dabei sind Proteine der Pbx-Familie, namentlich Pbx1 und Pbx2 sowie der Transkriptionsfaktor Meis1 (Shen et al, 1999; Kroon et al., 1998; LaRonde et al., 2003). Zusätzlich zu der Regulation durch verschiedene Kofaktoren oder Wachstumsfaktoren lässt der HoxA9-Kernimport nach Thrombopoetin-Stimulation in hämatopoetischen Stammzellen sowie die verminderte Aktivität von HoxA9 nach

Phosphorylierung durch die Proteinkinase C weitere Regulationsmöglichkeiten des Proteins vermuten (Kiritto et al., 2004; Vijapurkar et al., 2004).

Die hauptsächlich, bisher beschriebenen Untersuchungen an HoxA9 betreffen vor allem die Bedeutung des Proteins in der Hämatopoese, da HoxA9 dort als starkes Protoonkogen wirkt. So führt die Überexpression von HoxA9 in Knochenmarkzellen von Mäusen innerhalb von 3 bis 10 Wochen, aufgrund einer Translokation im Genom und darauf folgender Expression eines onkogenen Fusionsproteins HoxA9-Nup98, zu einer schweren akuten myeloiden Leukämie (AML) (Thorsteinsdottir et al., 2002). Außerdem ist HoxA9 ein Zielgen des Mixed-Lineage-Leukemia (MLL) - Gens sowie von verschiedenen MLL-Fusionsproteinen, die zu einer verstärkten Expression von HoxA9 und in Folge dessen zu einer anderen Form der Leukämie, der Mixed-Lineage-Leukemia (MLL) führen kann, die mit einer Hemmung der Differenzierung in der Hämatopoese sowie der Meis1-induzierten Caspase-abhängige Apoptose einhergeht (Ferrando et al., 2003; Armstrong et al., 2002; Yeoh et al., 2002; Zeisig et al., 2004; Wermuth und Buchberg, 2005). Diese Daten sprechen für eine distinkte Rolle von HoxA9 bei der Erhaltung und Differenzierung von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen in die verschiedenen Linien des hämatopoetischen Systems. Diese These wird erhärtet durch Untersuchungen, bei denen gezeigt wurde, dass Überexpression von HoxA9 die Differenzierung primärer Knochenmarkzellen oder der myeloiden Differenzierung multipotenter HSC als Antwort auf G-CSF hemmt (Calvo et al., 2001; Fujino et al., 2001; Kroon et al., 1998).

Der embryonale Phänotyp HoxA9-defizienter Mäuse weist strukturelle Defekte der unteren Rippenbögen auf. Neben diesen Fehlern beim Skelettaufbau sind keine weiteren Mängel in der embryonalen Entwicklung bei einem Verlust von HoxA9 gezeigt worden (Fromental-Ramain et al., 1996). Während des postnatalen Stadiums dagegen konnten mannigfaltige Störungen bei einer Dysregulation von HoxA9 nachgewiesen werden. So haben adulte HoxA9-defiziente Mäuse eine gestörte T-Zellentwicklung sowie eine erhöhte Apoptoserate in primitiven Thymozyten (Izon et al., 1998), sowie Defekte der myeloiden, erythroiden und lymphoiden Hämatopoese (Lawrence et al., 1997). Eine erhöhte HoxA9-Expression im Knochenmark von Mäusen führte innerhalb von 3 - 10 Monaten zu einer

akuten myeloiden Leukämie (AML) sowie zu einer Expansion von unreifen Progenitorzellen, der den oft beobachtete Zusammenhang zwischen einer AML und einer gesteigerten HoxA9-Produktion bestätigte (Thorsteinsdottir et al., 2002). Daneben sind noch Störungen der Differenzierung von B-Lymphozyten und einer veränderten Granulopoese bekannt (Thorsteinsdottir et al., 2002; Fujino et al., 2001).

Erstaunlicherweise haben Knockout-Mäuse für Meis1, einen bekannten Kofaktor von HoxA9, einen gestörten angiogenen Phänotyp, was einen Hinweis auf eine Rolle von HoxA9, für die embryonale Angiogenese geben könnte (Hisa et al., 2004). HoxA9 ist außerdem essentiell für die embryonale hämatopoetische Differenzierung sowie die pränatale Stammzellexpansion (Thorsteinsdottir et al., 2002; Davidson et al., 2003). Die Mechanismen bei der postnatalen Vaskulogenese wird die embryonale Entwicklung des Hämangioblasten zum Teil nachvollzogen wird, woraus sich die Hypothese einer partiellen Kontrolle der Vaskulogenese durch HoxA9 auch im adulten Organismus ableiten lässt.

1.8 Fragestellung

Verletzungen oder atherosklerotische Erkrankungen des Endothels können Durchblutungsstörungen und in Folge dessen zu schweren funktionellen Störungen im adulten Organismus führen. Dabei auftretendes ischämisches Gewebe muss, durch Angiogenese und Vaskulogenese, wieder an das Gefäßsystem angebunden werden.

Homeobox-Gene (Hox) sind Transkriptionsfaktoren die während der Embryonalentwicklung an der Organogenese und der Entwicklung des kardiovaskulären Systems beteiligt sind. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass Homeobox-Proteine an der transkriptionellen Regulation von Genen der Angiogenese auch im adulten Organismus beteiligt sind. HoxA9 wird sowohl in Endothelzellen als auch in hämatopoetischen Zellen exprimiert und ist so ein Kandidat für die transkriptionelle Regulation der postnatalen Angiogenese und Vaskulogenese.

Ziel der Arbeit war es, die funktionelle Bedeutung von HoxA9 für die Gefäßneubildung im adulten Organismus zu untersuchen. Dazu wurden folgende Fragen untersucht:

1. Der Einfluss von HoxA9 auf essentielle Funktionen der Angiogenese und Vaskulogenese. Im Speziellen wurden dafür die Proliferation, Migration, Apoptose maturer Endothelzellen sowie die Expansionsfähigkeit endothelialer Vorläuferzellen untersucht.
2. Identifizierung von HoxA9-regulierten Zielgenen in Endothelzellen mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden.
3. Untersuchung der physiologischen Relevanz von HoxA9 bei HoxA9-defizienten Mäusen.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Organismen

Als Hintergrundmausstamm für Wildtyp, homozygote (HoxA9^{-/-}) und heterozygote (HoxA9^{+/-}) Mäuse wurden Tiere von Stamm C57-black/6N verwendet (die Tiere wurden von H. Jeffrey Lawrence, MD, Veterans Affairs Medical Center, St. San Francisco und Mario R. Capecchi, MD, Howard Hughes Medical Institute, Salt Lake City freundlicherweise zu Verfügung gestellt).

Tab.2-1 Verwendete Zellen

Zellen	Anmerkung
HUVEC	Humane venöse Nabelschnurendothelzellen (Fa. Clonetics®)
HEK293	Humane embryonale, mit Adenovirus 5 transformierte, Nierenzellen

2.2 Nährmedien

Tab. 2-2 Zellkulturmedien

Medium	Zusätze
Endothelial Cell Basal Medium (EBM) (Fa. Clonetics) zur Kultivierung arterieller muriner Endothelzellen sowie HUVEC	10% Fötale Kälberserum (FCS, Boehringer), hEGF (10 µg/ml), Hydrocortison (1 µg/ml), Bovine brain extract (3 µg/ml), Gentamicin Sulfat (50 µg/ml), Amphotericin-B (50 µg/ml) (alle Invitrogen)
EBM zur Kultivierung endothelialer Progenitorzellen	20 % FCS, hEGF (10 µg/ml), Hydrocortison (1 µg/ml), Bovine brain extract (3 µg/ml), Gentamicin Sulfat (50 µg/ml), Amphotericin-B (50 µg/ml)
RPMI 1640 - Medium mit Glutamax (Fa. Gibco) zur Isolierung arterieller muriner Endothelzellen	10% FCS, 1 mM Na-Pyruvat, 10 mM HEPES, nonessential Aminosäuren (stock 100 x), Penicillin/Streptomycin U/500 ml Medium (alle Invitrogen)
RPMI 1640 – Medium mit Glutamax zur Isolierung mononukleärer Zellen der Milz von	10% FCS, Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) 1U/500ml Medium, 50 µM Mercaptoethanol

Material und Methoden

Mäusen	
DMEM 4500 Glucose with Glutamax zur Kultivierung von Allantois sowie HEK293-Zellen	10% hitzeinaktiviertes FCS, Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) 500 U/ml Medium

2.3 cDNA – Klonierung

Die Plasmide HoxA9 wt (Transkriptvariante 1: Accession BC006537) und eine HoxA9-Mutante ohne Homeodomäne (Δ aa: 206 - 272) wurden durch RT-PCR (PCR-Thermocycler - Perkin Elmer) aus HUVEC-RNA amplifiziert und mit Hilfe der Schnittstellen EcoR V und Hind III in pcDNA 3.1. myc/His Version B (-) mit CMV-Promotor (Invitrogen) kloniert.

2.4 Plasmidpräparation

Sämtliche Plasmidpräparationen wurden mit Maxipräparations-Kits der Fa. Qiagen durchgeführt. Dafür wurde eine entsprechende Bakterienkultur über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert, anschließend 15 min bei 2000g zentrifugiert und das entstandene Pellet mit einem zum Kit gehörenden Puffer lysiert. Im Folgenden wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Konzentration und Reinheit der erhaltenen DNA wurde photometrisch bestimmt. Als saubere DNA wurde ein Quotient $OD_{260nm}/OD_{280nm} = 1,6 - 1,8$ angesehen.

2.5 Viruskonstruktion

HoxA9 wt (Transkriptvariante 1) wurde aus HUVEC-RNA durch RT-PCR amplifiziert und mit den Schnittstellen Not I und EcoR V in den Shuttle-Vektor pAdTrack-CMV kloniert. Das aufgereinigte Plasmid wurde im folgenden mit Pme I linearisiert und mit dem linearisierten Plasmid eine Transformation des E. coli – Bakterienstamm BJ5183 durchgeführt. Dieser Bakterienstamm ist stabil mit dem

adenoviralen Backbone-Vektor pADEasy-1, der eine Ampicillin-Resistenz besitzt, transformiert. Die rekombinante Integration des linearisierten pAdEasy-CMV-Vektors in den pADEasy-1-Vektor wurde durch die dann vorhandene Kanamycin-Resistenz selektioniert und durch Visualisierung der Größenverhältnisse im Agarosegel bestätigt. Abschließend wurden die, mit Pac I linearisierten Rekombinanten mit dem Genetrans II – System (Mobitec) in HEK293-Zellen transfiziert und nach 7-10 Tagen der fertige Virus mit einem Adeno-X-Virus-Purification-Kit (BD Biosciences) aufgereinigt.

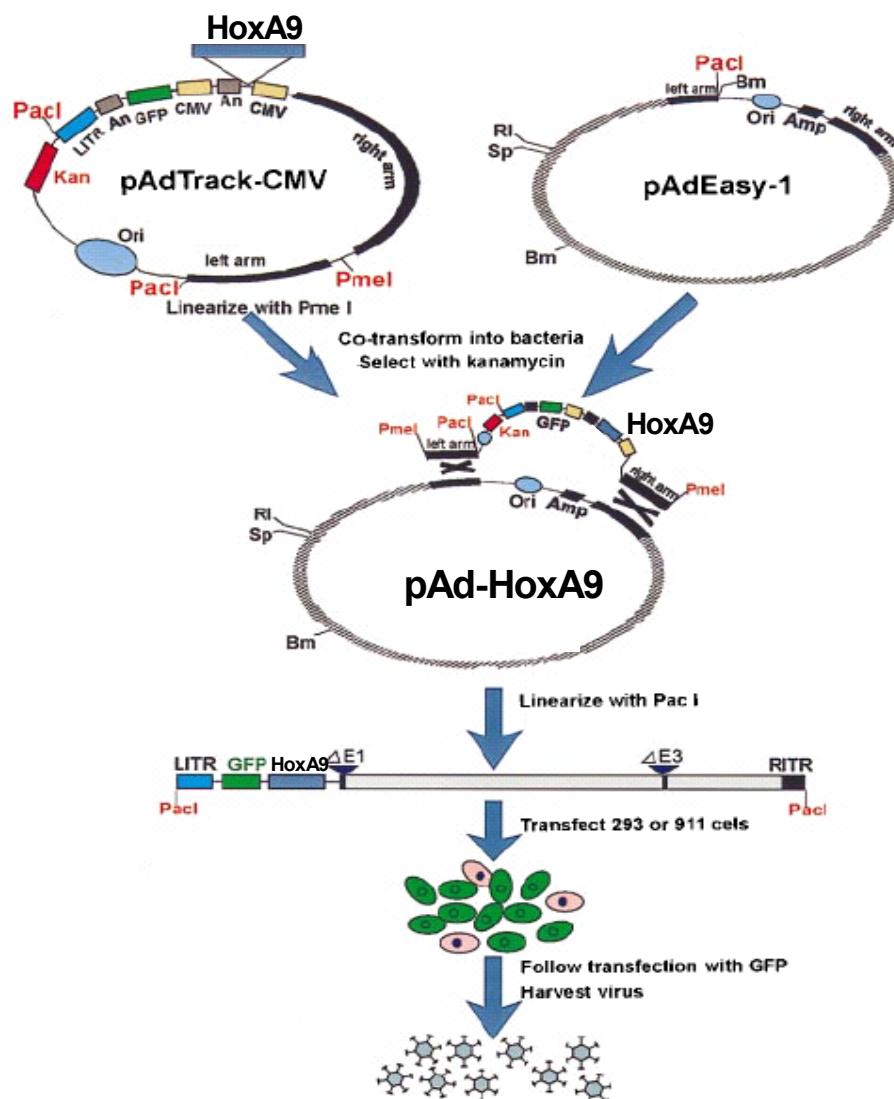


Abb.: Schematische Darstellung des pAd-Easy-Systems zur Herstellung des HoxA9-Adenovirus (modifiziert nach He et al., 1998)

2.6 Kultivieren von Endothelzellen

Humane venöse Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) wurden in EBM-Vollmedium in T 75-Zellkulturflaschen (Greiner) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit bis zur 3. Passage kultiviert. Für das Passagieren der Zellen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 7 ml Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS w/o Ca + Mg, Gibco) gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA (Boehringer Mannheim) bis zum Abrunden der Zellen inkubiert. Nach Entfernen des Trypsins, wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Greiner) in 10 ml Medium abgelöst und zur Zellerhaltung in T 75-Zellkulturflaschen ausgebracht und kultiviert.

Zur Durchführung der Versuche wurde die Zellzahl bestimmt und je nach Versuchsansatz $3,5 - 4,5 \times 10^5$ Zellen in 6 cm-Zellkulturschalen (Greiner) ausgebracht und für 18 h kultiviert.

Für die Kultivierung arterieller muriner Endothelzellen wurde der gleiche Ansatz wie für HUVEC verwendet, jedoch wurden die Zellkulturschalen vorher 30 min mit 1% Fibronectin (Sigma) in PBS inkubiert.

2.7 Kultivieren von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293)

HEK293-Zellen wurden in DMEM 4500 in T 75 - Zellkulturflaschen (Greiner) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für die Herstellung des Vollmediums wurde zuvor das Komplementsystem des fötalen Kälberserums für 20 min bei 56°C inaktiviert. Für das Passagieren der Zellen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 7 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA (Boehringer) bis zum Abrunden der Zellen inkubiert. Das Trypsin wurde dann mit 7 ml RPMI-Vollmedium inaktiviert, gemischt, anschließend 1:10 in T 75 - Zellkulturflaschen ausgebracht.

2.8 Isolierung und Kultivierung von endothelialen Progenitorzellen

Die Isolierung von endothelialen Progenitorzellen (EPC) aus dem peripheren Blut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation nach Vasa et al. (Vasa et al., 2001). Dabei wurden 15 ml Ficoll (Biochrom AG) mit 25 ml, zuvor 1:2 mit PBS verdünntem Blut überschichtet und mit 800 g für 20 min bei 21°C ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation stellten sich die mononukleären Zellen (MNC) als dünne Interphase zwischen den Schichten dar. Zwischenzeitlich wurde eine 24-well Platte mit Fibronectin (10 ng/ ml PBS, Fa. Sigma) für mind. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Fibronectin wurde unmittelbar vor dem Ausbringen der Zellen das Fibronectin abgesaugt. Die mononukleären Zellen wurden mit einer 5 ml Pipette (Greiner) entnommen, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, mit PBS vollständig aufgefüllt, anschließend 10 min mit 800 g und 21°C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde bis zur vollständigen Klarheit des Überstandes wiederholt und anschließend 4×10^6 Zellen auf die mit Fibronectin beschichtete 24-well Platte ausgebracht und für 4 Tage bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit ohne weiteren Mediumwechsel kultiviert. Nach 4 Tagen wurden die adhärennten Zellen mit 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanide Perchlorate - konjugiertem acetylierten Low-density-Lipoprotein (Dil-Ac-LDL, Harbor Bio-Products) gefärbt. Zur genaueren Verifizierung des endothelialen Phänotyps wurden die Zellen zusätzlich mit FITC-markiertem Lektin von *Ulex europaeus* (Sigma), einem Endothelzellmarker charakterisiert. Die Auszählung der EPC erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss).

2.9 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus HUVEC erfolgte mit Trizol-Reagenz (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden die Zellen einer 6 cm - Zellkulturschalen mit 1 ml Trizol-Reagenz lysiert, nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zugesetzt, gut vermischt und für 15 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Der entstandene klare Überstand wurde

entnommen, mit 10 µg Glycogen (Invitrogen) sowie 500 µl Isopropanol gemischt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Der Mix wurde anschließend für 15 min, bei 20000 g und 4°C zentrifugiert und das entstandene Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen. Abschließend wurde das getrocknete Pellet in 20-50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

2.10 RT-PCR

Die isolierte mRNA wurde in einer konventionellen semiquantitativen RT-PCR oder in einer quantitativen RT-PCR eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2-3 zusammengefasst. Für die semiquantitative Analyse wurden 3 µg RNA mit Hilfe eines RT-PCR-Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben und anschließend in einer die Standard- PCR eingesetzt.

Eine Probe setzte sich zusammen aus

- 1 µl cDNA (Maximalkonzentration 250 ng DNA/µl)
- 0,25 µl dNTP (10mM, Invitrogen)
- 3 µl 10 x PCR-Puffer (Platinum Taq Polymerase Reaction Buffer, Invitrogen)
- 1,2 µl MgCl₂ (50 mM)
- 125 ng je Primer
- 0,25 µl Platinum Taq Polymerase (1,4 U; Invitrogen)
- Die gesamte Probe wurde dann auf 30 µl mit H₂O aufgefüllt

Die Höhe der Annealing-Temperatur lag bei 58,5°C. Die Zahl der Zyklen unterschied sich je Versuch und Gen und lag zwischen 18-40 Zyklen. Die Expression wurde als Ratio zwischen der Menge von GAPDH (als Gleichladungskontrolle) und der Menge des jeweiligen zu untersuchenden Genes angegeben. Für die quantitative Analyse wurde eine RT-PCR mit Hilfe eines one-step-RT-PCR-Kit (Roche Diagnostics) in einem Lightcycler - „real-time“ – Thermocycler (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte mit einer Bindungstemperatur von 61°C bei 40 Zyklen. Die Höhe der Genexpression wurde anhand einer Standardkurve eines IL-10 – Primermixes (Roche Diagnostics) mit Hilfe einer Instrumentensoftware (Roche

Diagnostics) errechnet. Die Spezifität der Amplifikation wurde mit einer Schmelzpunktkurve bestätigt.

Tab. 2-3 Oligonukleotide für RT-PCR

Oligonukleotide für semiquantitative RT-PCR		
Oligonukleotide	Sequenz	Spezifität
eNOS-forward	5`-ccc atc gat ccc aat aac-3`	human/Maus
eNOS-reverse	5`-ggg tct ggc tgg tag cgg aag g-3`	human/Maus
VEGF-R ₂ -forward	5`-caa caa agt cgg gag agg ag-3`	human
VEGF-R ₂ -reverse	5`-atg acg atg gac aag tag cc-3`	human
VE-Cadherin-forward	5`-agg tat gag atc gtg gtg gaa gc-3`	human
VE-Cadherin-reverse	5`-tgg atg tat tca taa tcc aga ggc-3`	human
CD31-forward	5`-gct gtt ggt gga agg agt gc-3`	human
CD31-reverse	5`-gaa gtt ggc tgg agg tgc tc-3`	human
vWF-forward	5`-tct ggc tga ggg agg taa aa-3`	human
vWF-reverse	5`-ggc att gag aac ctc atg gt-3`	human
HoxA9-forward	5`-gta cat gcg ctc ctg gct gga g-3`	human
HoxA9-reverse	5`-ctg gag gag aac cac aag cat ag-3`	human
GAPDH-forward	5`-tca cca tct tcc agg agc gag atc-3`	human/Maus
GAPDH-reverse	5`-gag acc acc tgg tgc tca gtg tag-3`	human/Maus
VEGF-R ₂ -forward	5`-ggg aac tga aga cag gct act tg-3`	Maus
VEGF-R ₂ -reverse	5`-gat gct cca agg tca gga agt cc-3`	Maus
HoxA9-forward	5`-gcc cgg tgc gct ctc ctt cgc-3`	Maus
HoxA9-reverse	5`-cat cct gcg gtt ctg gaa cca g-3`	Maus
Oligonukleotide für quantitative RT-PCR (Light Cycler)		
eNOS-forward	5`-acc tga caa ccc caa gac cta-3`	human
eNOS-reverse	5`-aaa agc tct ggg tgc gta tg-3`	human
VEGF-R ₂ -forward	5`-tat gac aac aca gca gga atc a-3`	human
VEGF-R ₂ -reverse	5`-cac cat tcc acc aaa aga tg-3`	human
VE-Cadherin-forward	5`-aaa aca cct cac ttc ccc at-3`	human
VE-Cadherin-reverse	5`-ggg ttt cac cag tgt cct tgt-3`	human

Material und Methoden

CD31-forward	5`-ctg ctg acc ctt ctg ctc tg-3`	human
CD31-reverse	5`-taa aac agc acg tca tcc tta tag a-3`	human
vWF-forward	5`-cga cat gga gga tgc cgt-3`	human
vWF-reverse	5`-act cat tga tga ggc agg ggt-3`	human
HoxA9-forward	5`-ccc atc gat ccc aat aac-3`	human
HoxA9-reverse	5`-cgt ctt ttg ctc ggt ct-3`	human
GAPDH-forward	5`-ttg gta tcg tgg aag gac tca-3`	human
GAPDH-reverse	5`-tgt cat cat att tgg cag gtt t-3`	human
eNOS-forward	5`-cac att tgg caa tgg gga tc-3`	Maus
eNOS-reverse	5`-tgc act gtc tgt gtt gct aga ctc-3`	Maus
VEGF-R ₂ -forward	5`-gtc atc tcc ttc cat gtg atc-3`	Maus
VEGF-R ₂ -reverse	5`-ctg gtt cca gtc agg ct-3`	Maus
VE-Cadherin-forward	5`-acc taa agt gtg tga gaa tgc-3`	Maus
VE-Cadherin-reverse	5`-ctg gtt cca gtc agg ct-3`	Maus
HoxA9-forward	5`-aca ctt tgt ccc tga ctg act atg-3`	Maus
HoxA9-reverse	5`-cgg tcc cgt gtg agg ta-3`	Maus
GAPDH-forward	5`-aat ggt gaa ggt cgg tgt ga-3`	Maus
GAPDH-reverse	5`-ctg gaa gat ggt gat ggg c-3`	Maus

2.11 Protein-Präparation aus Zellen

Die Zellen ($4,0 \times 10^5$ Zellen/Kulturschale) wurden auf Eis mit PBS (4°C) gewaschen, abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und für 15 min in 200 µl Lysispuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM Na₃VO₄; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA, 1 % Triton; 2,5 mM Na-Pyrophosphat, 1 mM β-Glycerolphosphat; 1 mM PMSF; 1 µg/ml Leupeptin) auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (20000 g, 4°C, 15 min) und die Proteinkonzentration im Überstand nach Bradford bestimmt.

2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinproben (je 2 μ l) wurden mit 798 μ l H₂O und 200 μ l Protein-Färbereagenz (Biorad) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Als Referenz wurden 798 μ l H₂O mit 200 μ l Protein-Färbereagenz sowie 2 μ l Lysispuffer verwendet. Die Messung der Absorption des entstandenen Protein-Farbstoffkomplexes erfolgte im Spektralphotometer bei $\lambda = 595$ nm. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Rinderserumalbumin (BSA)-Eichkurve errechnet.

2.13 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden Zellextrakte nach Zellyse verwendet (siehe Kapitel 2.11). Dabei wurden 500 μ g Gesamtprotein (1 μ g/ μ l Konzentration) und 2-5 μ g Antikörper über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach Zugabe von 25 μ l Protein A/G plus Agarose (SantaCruz) wurden die Proben für weitere 2 h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert, anschließend 3 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit Lysispuffer wurden die Proben mit 4 x Probenpuffer (250 mM Tris pH 6,8; 8% SDS(v/v); 40% Glycerin (v/v); 0,04% Bromphenolblau (w/v); 200 mM DTT) 5 min bei 100°C gekocht und in einem SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt.

2.14 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die zu analysierenden Proteine wurden in 4 x Probenpuffer 5 min bei 100°C gekocht und durch SDS-PAGE in einem Gel mit 8-12% SDS-Anteil (abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins) der Größe nach aufgetrennt. Mit Hilfe des so genannten Laemmli-Systems wurden die Proteinproben zunächst in einer Sammelgelschicht (1 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4% Acrylamid) konzentriert und anschliessend im Trenngel (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 8-12% Acrylamid) separiert.

Verwendet wurde das Gelelektrophoresesystem Mini Protean II der Fa. Biorad. Nach der Polymerisation des Gels wurden die Proteinproben geladen und bei 100 V, 2 h lang getrennt. Als Laufpuffer wurde 0,25 M Tris, 0,69 M Glycin und 1% SDS verwendet.

2.15 Transfer von Proteinen (Western Blot)

Der Western Blot ermöglicht den Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Membran. Dabei werden die Proteine durch eine quer zum Gel verlaufende Elektrophorese auf die Membran übertragen, immobilisiert. Für den Transfer der Proteine wurden Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen (Immobilon-P, Millipore) verwendet. Zur Vorbehandlung wurden die PVDF-Membran 10 sec in Methanol inkubiert und anschließend 2 min gewässert. Das Gel, die vorbehandelte Membran und 6 Whatman 3MM Papiere wurden in Transferpuffer (0,05 M Tris; 0,038 M Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol) äquilibriert und luftblasenfrei zwischen zwei „scotch pads“ aufgebaut und vertikal in die mit Transferpuffer und einer Eiskammer gefüllte Wet-Blot-Kammer (Biorad) eingehängt. Der Proteintransfer erfolgte 1,5 h bei konstant 20 W.

2.16 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Die Detektion der auf Membranen immobilisierten Proteine erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper. Hierfür wurden die durch elektrophoretischen Proteintransfer (Western Blot) hergestellten Membranen zuerst mit 3% Rinderserumalbumin (BSA, Merck) oder 3% Magermilchpulver (MP, Töpfer) in TBS /Tween (50 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 0,1% Tween-20) 2 h blockiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu besetzen. Danach wurde die Membran mit einem spezifischen Antikörper (Tabelle 2-5), der an das zu untersuchende Protein bindet, über Nacht bei 4°C inkubiert. Sämtliche Antikörper wurden entweder in TBS/Tween mit Milchpulver oder BSA verdünnt. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurde die Membran 3 x 15 min mit

TBS/Tween gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit einem Peroxidase-konjugierten IgG-Zweitantikörper (Tabelle 2-5) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran (je 15 min) wurde die gebundene Peroxidase mittels des ECL-Systems (Amersham) detektiert und auf Chemilumineszenz-Filmen (ECL-Hyperfilm, Amersham) nachgewiesen. Nach Belichtung erfolgte die Entwicklung der Filme in einem AGFA Curix 60. Die Inkubationen der Membran mit Blockierungsreagenzien bzw. des Zweitantikörpers sowie alle Waschschritte wurden auf einem Schüttelinkubator der Fa. IKA-Labortechnik durchgeführt.

Tab. 2-4 Antikörper für immunologischen Nachweis im Westernblot

Erstantikörper	Hersteller	Blockierung	Einsatz	Zweitantikörper	Einsatz
Tubulin	Dianova	3 % BSA	1:4000 3 % BSA	Anti-mouse	1:6000 3 % BSA
Aktin	Sigma	3% BSA	1:3000 3 % BSA	Anti-mouse	1:6000 3 % BSA
ERK 1/2	Cell Signaling	3% BSA	1:1000 3 % BSA	Anti-mouse	1:6000 3 % BSA
HoxA9 (A-20)	Santa Cruz	3 % MP	1:400 3 % MP	Anti-goat	1:6000 3 % MP
EphB4 (H-200)	Santa Cruz	3 % MP	1:400 3 % MP	Anti-rabbit	1:4000 3 % MP
eNOS	BD Biosciences	3 % BSA	1:3000 3 % BSA	Anti-mouse	1:6000 3 % BSA
VEGF-R₂	R&D Systems	3 % MP	1:600 3 % MP	Anti-goat	1:6000 3 % MP
VE-Cadherin	Santa Cruz	3 % MP	1:400 3 % MP	Anti-mouse	1:6000 3 % MP
Integrin α_v	BD Biosciences	3 % BSA	1:1000 3 % BSA	Anti-mouse	1:6000 3 % BSA
Integrin β_3	BD Biosciences	3 % MP	1:1000 3 % MP	Anti-mouse	1:6000 3 % MP
c-myc	Santa Cruz	3 % MP	1:250 3 % MP	Anti-mouse	1:6000 3 % MP

2.17 Immuncytochemischer Nachweis von Proteinen

Zum Nachweis von Proteinen in Zellen wurde ein immuncytochemischer Nachweis durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehyd (in PBS) fixiert. Nach Permeabilisierung und Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen mit 0,25 % Triton-X-100 und 1% BSA für je 15 min bei Raumtemperatur wurden alle Zellen mit einem spezifischen Antikörper, der das zu untersuchende Protein bindet, in der Verdünnung 1:50 (in PBS) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 1 h mit einem RhodaminRedX- oder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-konjugiertem Zweitantikörper (Jackson Immunoresearch) in einer Verdünnung 1:200 (in PBS) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit 4,6 Diamino-2-Phenylindol (DAPI) für 1 min inkubiert und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Präparate mit Fluoromount Medium (Dako) eingebettet. Die Visualisierung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop und digitaler Kamera der Fa. Zeiss (Axiovert 100, AxioCam, Axiovision Software). Für den Nachweis von CD31 bei kultivierten Allantois wurde ein mit Phycoerythrin (PE) - direkt konjugierter Antikörper verwendet. Im Übrigen wurde nach dem Protokoll der oben beschriebenen Immuncytochemie vorgegangen.

2.18 Transfektion von Oligonukleotiden

Für ein Knock-Down von HoxA9 sowie EphB4 in HUVEC wurden Zellen ($3,5 \times 10^5$ Zellen/ 6 cm Kulturschale) mit 360 pmol siRNA gegen HoxA9 (5'- ugc uga gaa uga gag cgg c - 3') oder EphB4 (5'- gug ugu gaa gug cag cgu g - 3') transfiziert. Dafür wurde die siRNA mit 200 µl Transfektionspuffer B sowie 176 µl EBM mit 24 µl Genetrans-II-Transfektions-Reagenz (Genetrans-II-Transfektions-Kit, Fa. Mobitec) gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Mischungen miteinander versetzt und für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 3 ml EBM ohne Zusätze zugegeben und den vorher mit PBS gewaschenen Zellen zugesetzt (6 cm Kulturschale mit 70% konfluenten

HUVEC). Nach 4 h erfolgte dann ein Mediumwechsel mit EBM-Vollmedium. Anschließend wurden die Zellen für mind. 36 h kultiviert. Der Effekt des „Knock-Down“ war im Westernblot nach 36 h bis max. 96 h nachweisbar. Als Kontrolle wurde siRNA mit willkürlichen Sequenzen aus denselben Basenpaaren wie die spezifische siRNA verwendet (HoxA9 „scrambled“ - Kontrolle: 5` - agc gug uag cua gca gag g - 3`; EphB4 „scrambled“ - Kontrolle: 5` - ggu agc gga uuc gag ggu u-3`).

2.19 Transfektion von Plasmiden

Für die Transfektion mit Plasmiden wurden 3 µg Plasmid mit 20 µl Superfect (Invitrogen) und 150 µl serumfreien EBM - Medium für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zusammen mit 1,2 ml EBM - Vollmedium den Zellen zugesetzt und für 3 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel mit 3 ml EBM-Vollmedium und die Zellen wurden für weitere 18 - 24 h kultiviert.

2.20 Virustransduktion

Für die Transduktion mononukleärer Zellen des Blutes (PBMNC) mit dem HoxA9- bzw. dem lacZ-Virus wurde eine Mischung aus Adenovirus, 10 µl Antennapedia-Peptid (RQIAIWFQNRMMKWA; 2.5 mM; Biosyntan) und 100 µl Optimem (Invitrogen) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 20 x 10⁶ PBMNC in 2,5 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS und 500 U/ml Penicillin/Streptomycin gemischt. Nach 24 h Kultivierung bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen für 10 min bei 800 g zentrifugiert, je 4 x 10⁶ PBMNC in 1 ml EBM-Vollmedium für EPC resuspendiert, in eine Fibronectin-beschichtete 24-well-Platte (siehe Kap. 2.8) ausgebracht und für weitere 3 Tage kultiviert. Die differenzierten EPC wurden in der schon beschriebenen Weise gefärbt und ausgezählt (Kap.2.8).

2.21 Genotypisierung

Zur Überprüfung des Genotyps der verwendeten Mäuse wurden die Schwanzenden der Tiere mit einem Lysispuffer des DNeasy-Kits (Qiagen) bei 55°C auf einem Schüttelheizblock über Nacht lysiert. Im Folgenden wurde zur Gewinnung der DNA nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Der Genotyp wurde anschließend mittels PCR ermittelt, wobei in einer Reaktion 3 verschiedene Primer zur gleichzeitigen Ermittlung aller 3 Genotypen verwendet wurden. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2-6 aufgelistet. Eine Probe zur Genotypisierung setzte sich zusammen aus:

- 2 µl isolierte DNA
- 0,25 µl dNTP (10mM; Fa. Invitrogen))
- 3 µl 10 x PCR-Puffer (Platinum Taq Polymerase Reaction Buffer; Invitrogen)
- 0,9 µl MgCl₂ (50 mM)
- 125 ng je Primer
- 0,25 µl Platinum Taq Polymerase (1,4 U; Invitrogen)
- Die gesamte Probe wurde dann auf 30 µl mit H₂O aufgefüllt.

Die Höhe der Annealing-Temperatur lag bei 65°C und die Zahl der Zyklen bei 30.

Tab. 2-5 Oligonukleotide für Genotypisierung der HoxA9-Mäuse

Oligonukleotide	Sequenz
forward Primer Wildtyp	5` - cgc tgg aac tgg aga agg agt ttc tg - 3`
reverse Primer Wildtyp	5` - atc ctg cgg ttc tgg aac cag atc - 3`
reverse Primer Neomycinkasette	5` - tct atc gcc ttc ttg acg agt tc - 3`

2.22 Isolierung und Kultivierung maturaer endothelialer Mäusezellen (Outgrowth – Assay)

Die Isolierung endothelialer Mäusezellen erfolgte nach einem Protokoll von Hoffmann et al. (Hoffmann et al., 2001) aus den Aorten von 10 - 16 Wochen alten

Material und Methoden

Mäusen beiderlei Geschlechts. Für die Untersuchungen wurden alle drei möglichen Genotypen untersucht, d.h. Wildtyp, HoxA9^{+/-} und HoxA9^{-/-} Mäuse.

- Kollagenstammlösung: 2,5 mg Kollagen Typ III acid soluble (Sigma)/ ml 0,013 M HCl (4 °C) am Abend vor den Versuchen frisch herstellen
- Matrixlösung herstellen:
 - 1,8 ml Kollagenstammlösung
 - 600 µl 5 x DMEM (4°C)
 - 450 µl 0,026 M NaOH (4°C)
 - 30 µl 100 x Pen / Strep
 - 15 µl 200 x Gentamycin (Geneticin, Fa. Sigma)
- vortexen und mit NaOH auf einen pH - Wert von 7,0 einstellen
- 500 µl der Matrixlösung je Platte einer 24-Loch-Platte ausbringen
- über Nacht im Brutschrank bei 37 °C auspolymerisieren
- Matrix mit 1 ml RPMI-Medium und 100 µl Endothelial cell growth supplement (ECGS – Fa. Calbiochem) für mind. 2 h bei 37 °C im Brutschrank äquilibrieren
- Aorta thoracalis entnehmen und das heraus gelöste Gefäß unter dem Binokular von Fett- und Geweberesten säubern und mit PBS blutfrei spülen
- Aorta semisteril der Länge nach aufschneiden und in annähernd drei gleich große Teile zerschneiden
- Aorta mit der Gefäßinnenseite in die mit der Kollagenmatrix ausgekleideten 24-Loch-Platten auflegen

Die Aorten wurden für 48 Stunden in RPMI 1640 mit 100 µg/ml ECGS kultiviert. Nach zwei Tagen wurde Medium mit EBM-Vollmedium plus 10% FCS und 500 U/ml Penicillin/Streptomycin vertauscht. Die weitere Kultivierung erfolgte ausschließlich in EBM-Vollmedium. Nach 4-6 Tagen, nachdem die Endothelzellen in die Matrix ausgewachsen waren und vor Beginn des nachfolgenden Auswachsens von Fibroblasten (d.h. zum frühest möglichen Zeitpunkt), wurden die

Aorten entfernt und die Kollagenmatrix mit 500 µl Kollagenase pan plus (Serva Electrophoresis; 2,4 U/ml in HBSS/ 10mM HEPES) verdaut. Nach einer Inkubation von 45 min bei 37 °C wurden die lysierten Matrices in 10 ml EBM überführt und 10 min mit 800 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml EBM resuspendiert und in eine, mit Fibronectin beschichtete (Kap. 2.8), 24-Loch Platte ausgebracht. Die weitere Kultivierung erfolgte nach dem in Kapitel 2.6 beschriebenen Protokoll.

2.23 Isolierung und Kultivierung von murinen endothelialen Vorläuferzellen

Die Isolierung endothelialer Vorläuferzellen erfolgte aus den Milzen von 10 - 16 Wochen alten Mäusen beiderlei Geschlechts. Für die Untersuchungen wurden alle drei möglichen Genotypen untersucht, d.h. Wildtyp, HoxA9^{+/-} und HoxA9^{-/-} Mäuse. Die Isolierung endothelialer Vorläuferzellen (EPC) erfolgte mit denselben Tieren, die auch für die Isolierung vollständig differenzierter Endothelzellen verwendet wurden.

- Milz entnehmen
- Fett und Gewebereste von der Milz entfernen
- Milz zusammen mit 7 ml RPMI 1640 vorsichtig pürieren
- Trennung der mononukleären Zellen von nicht- (z. B. Erythrozyten) bzw. polynukleären (z. B. Granulozyten) Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation:
 - 5 ml Ficoll separating solution, Density 1,077 (Biochrom) in einem 15 ml Plastikröhrchen (Greiner) vorlegen
 - Ficoll mit dem pürierten Gewebe überschichten
 - Zentrifugation ohne Bremse: 800 x g, 10 min, 21 °C
 - Interphase mit den mononukleären Zellen zwischen Ficoll und Medium entnehmen, in ein neues 15 ml Plastikröhrchen überführen und mit PBS auf ein Endvolumen von 15 ml auffüllen
 - Zentrifugation: 460 x g, 10 min, 21 °C

- Zellpellet in 1 ml EBM resuspendieren

Es wurden je 4×10^6 Zellen in eine mit Fibronektin beschichtete (Kap.2.8) 24-Loch Platte ausgebracht. Die weiteren Schritte, die Kultivierung sowie die Auswertung entsprachen der im Kapitel 2.8 beschriebenen Vorgehensweise bei humanen EPC.

2.24 Isolierung und Kultivierung von Allantois

Für die Untersuchung der embryonalen Gefäßneubildung wurde die Allantois aus HoxA9^{-/-} - bzw. Wildtypmäusen nach einem Protokoll von Down et al. (Down et al., 2001) isoliert und kultiviert. Für die Isolierung wurde den Mäusen am Tag 7,5 -8,5 der Uterus entnommen, die Embryos isoliert und die Allantois sezirt. Anschließend wurden die Allantois zusammen mit 400 µl DMEM 4500 Glukose mit Glutamax (Gibco), 10% FCS (Origin Nord Amerika, PAA) sowie Penecillin/Streptomycin (1 U/ml; Roche) in eine 8-well-Glasplatte (NUNC) überführt und für 48 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Im Anschluss an die Kultivierung wurden die Allantois mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit einem CD31-Antikörper, wie unter Kapitel 2.17 beschrieben, gefärbt.

2.25 Untersuchung der Apoptoserate maturer Endothelzellen

Die Apoptose ist durch bestimmte morphologische Eigenschaften charakterisiert. Diese schließen Veränderungen der Plasmamembran, wie den Verlust der Membransymmetrie oder -anbindung, eine Kondensation des Zytoplasmas und des Kerns sowie eine internukleosomale Spaltung der DNA mit ein. Veränderungen der Membran, wie die Ausstülpung des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) stellen eines der ersten Ereignisse in diesem Prozess dar. Annexin V ist ein 35-36 kDa großes Phospholipid-bindendes Protein das eine hohe Affinität für PS hat und kann als durchflußzytometrischer Marker für apoptotische Zellen verwendet werden. Für die Untersuchungen wurden die Zellen in der bereits

beschriebenen Weise mit Trypsin abgelöst, in 50 µl Annexin-V-Binding-Puffer (PharMingen) resuspendiert und mit 2,5 µl PE-konjugierten Annexin V (PharMingen) sowie 2,5 µl 7-AAD (PharMingen) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Annexin V-Binding-Buffer gewaschen und für 5 min mit 1300 g bei 21°C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 300 µl Annexin-Binding-Buffer resuspendiert und sofort mittels FACS analysiert. Die Auswertung erfolgte nach dem Muster der nachfolgenden Abbildung.

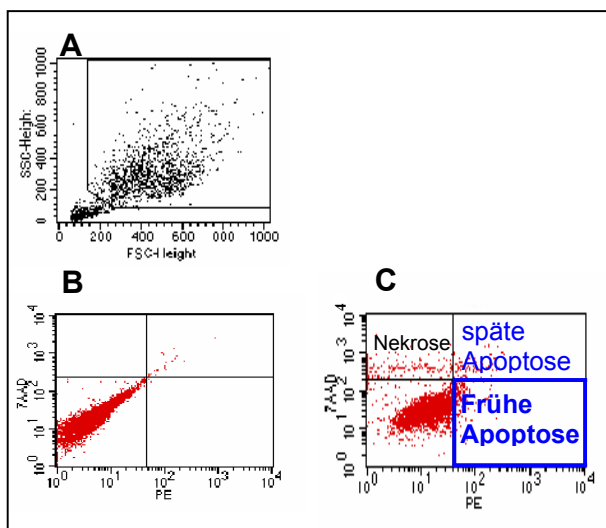


Abb.: FACS-Analyse der Apoptoserate maturaer Endothelzellen

- A) Sortierung der Zellen nach Größe - Ausschluss von Zelltrümmern
- B) ungefärbte Isotyp-Kontrolle
- C) Annexin und 7-AAD markierte Zellen

2.26 Untersuchung der Proliferationsrate mittels BrdU

Die Technik der Immunfluoreszenz-Färbung von eingebautem Bromdeoxyuridin (BrdU) stellt eine Möglichkeit zur Feststellung der Proliferationsrate von Zellen dar. Bei dieser Methode wird BrdU, ein Analogon des DNA-Vorläufermoleküls Thymidin, in neu synthetisierte DNA von wachsenden Zellen, die in die S-Phase eintreten oder sie durchlaufen, eingebaut. Das inkorporierte BrdU wird dann mit spezifischen, Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt und die Zellen auf ihren Anteil an eingebautem BrdU hin mit einem Durchfluss-Zytometer analysiert. Dafür wurden die Zellen für 30 min mit 10 mM BrdU bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in der bereits beschriebenen Weise mit Trypsin abgelöst und mit einem BrdU-Flow-Kit (BD Biosciences) nach Angaben des Herstellers fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Zur Unterscheidung der

Endothelzellen von kontaminierenden Zellen (z.B. Fibroblasten) wurden bei der Analyse von Endothelzellen aus der Aorta von Mäusen, diese mit einem PE-konjugierten CD146-Antikörper angefärbt. Die Auswertung erfolgte nach dem beschriebenen Muster der nachfolgenden Abbildung.

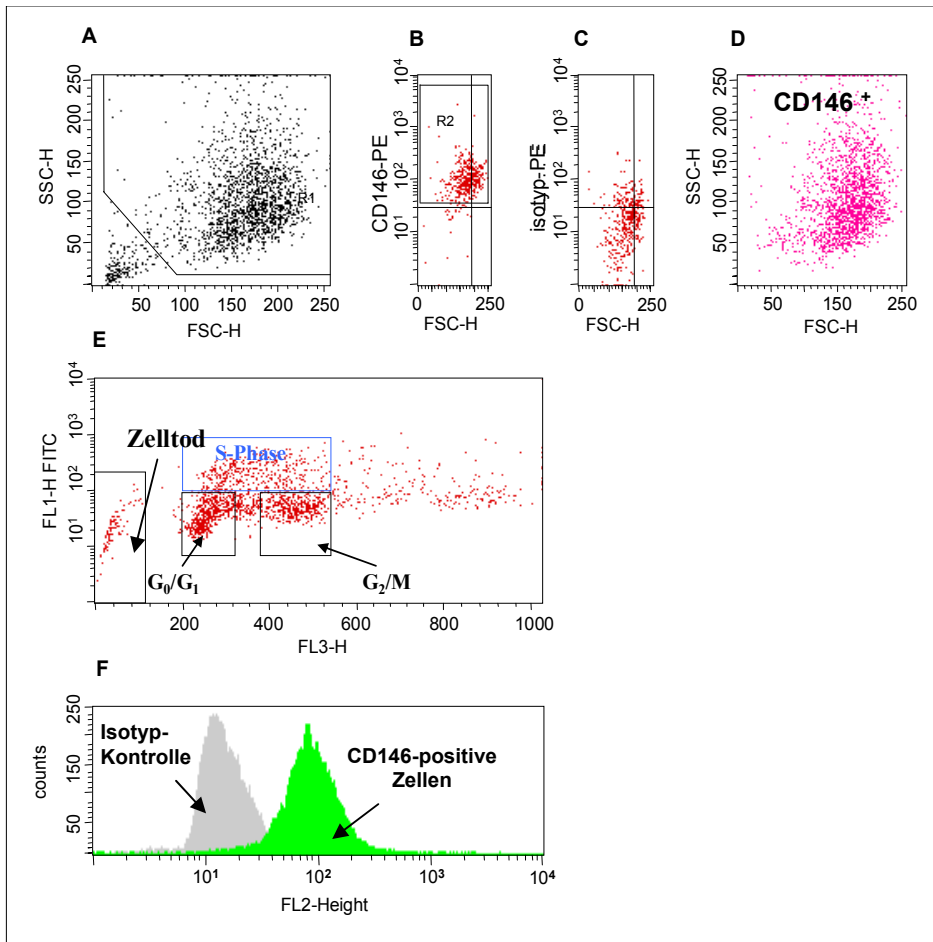


Abbildung: FACS-Analyse der Proliferationsrate von murenen Endothelzellen

A) Sortierung der Zellen nach Größe – Ausschluss von Zelltrümmern **B-D)** nur in A) eingeschlossenen Zellen **B)** CD146-markierte Zellen **C)** Isotyp-Kontrolle **D)** Einzeldarstellung der in B) eingeschlossenen Zellen **E)** Darstellung der Zellzyklus-Phasen der CD146-positiven Zellen aus B) **F)** Schematische Gegenüberstellung von CD146-markierten mit Isotyp-markierten Zellen

2.27 Nachweis von endogenem NO mittels FACS-Analyse

Für den Nachweis von endogenem NO wurden die Zellen in einer 6 cm Kulturschale mit 10 µM 4,5-diaminofluorescein für 40 min bei 37°C, 5% CO₂ und

95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 15 min unter denselben Bedingungen mit 3 ml Vollmedium EBM inkubiert. Anschließend wurden die fluoreszenz-markierten Zellen mit Trypsin abgelöst, in 300 µl PBS resuspendiert und die endogene NO-Produktion mittels FACS (FACS Calibur, CellQuest Software, Becton Dickinson) analysiert.

2.28 CFU-Assay

Die Fähigkeit von zirkulierenden Progenitorzellen zur klonalen Expansion macht es möglich, sie in vitro von anderen maturen Zellen zu unterscheiden. Mature Zellen, die in ein semisolides Gel aus Methylzellulose und Wachstumsfaktoren ausgebracht werden, sterben innerhalb von 1 - 2 Wochen. Progenitorzellen, die sich noch in einem noch nicht vollständig differenzierten, Stadium befinden, können im Gel differenzieren und lokal einen Zellhaufen (Klon) bilden, der sich komplett auf eine Gründerzelle zurückführen lässt. Die Klone lassen sich dann sowohl mikro- als auch makroskopisch identifizieren. Die durch die Isolierung aus Vollblut bedingte sehr heterogene Zellpopulation mit verschiedenen Progenitorzellen, machte es nach der Inkubation notwendig, die einzelnen Kolonien nach Aussehen, Form der Zellen und Farbe zu unterscheiden, und den einzelnen Gründerzelltypen zuzuordnen.

Die für die Versuche benötigten endothelialen Progenitorzellen aus der Milz wurden wie unter Kapitel 2.7 beschrieben isoliert. Je 10^5 mononukleäre Zellen wurden mit 1,5 ml Methylzellulose (CellSystems) vermischt, mit 100 ng/ml murinem GM-CSF (Cell Concepts) sowie 20 ng/ml murinem VEGF (Cell Concepts) versetzt und in 3,5 cm Zellkulturschalen ausgebracht. Danach folgte eine 2-wöchige Inkubationszeit bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Anschließend wurden die Kolonien sowohl makro- als auch mikroskopisch ausgezählt.

2.29 Chromatin-Immunopräzipitation

Eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) dient der Analyse von Protein-DNA-Interaktionen. Dafür wurden die Zellen zuerst mit 1 % Formaldehyd fixiert. Dabei werden Proteine kovalent mit der DNA verbunden. Anschließend wurden die Zellen mit Proteinlysispuffer (1 % Triton (v/v); 0,32 M Sucrose; 5 mM EDTA pH 8,0; 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM PMSF; 200 mM DTT) für 30 min auf Eis lysiert und die DNA mit einem Ultraschallgerät 5 x 7 sec mit Output 5 (Branson Sonifire 450, Branson) in ca. 500 bp große Fragmente geteilt. Zwischen den einzelnen Ultraschall-Schritten wurden die Proben für mind. 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proben mit 10000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Lysispuffer resuspendiert. Die Protein-DNA-Komplexe wurden dann mit 2 µg anti-myc - bzw. 5 µg anti-HoxA9 (N20) - Antikörper (Santa Cruz) über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die folgenden Schritte wurden mit einem Chromatin-Immunpräzipitations-Kit (Upstate) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Abschließend wurde eine Promotor-spezifische PCR mit den verschiedenen Promotoren der untersuchten Zielgene durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2-7 aufgeführt

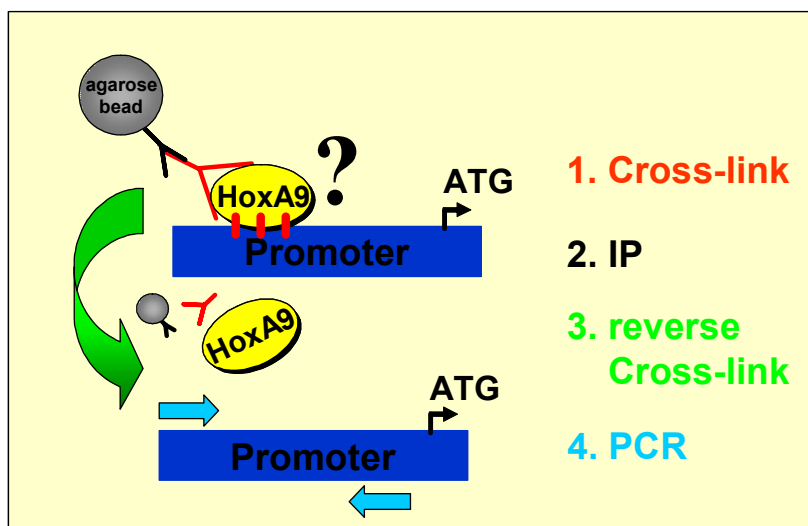


Abbildung: schematische Darstellung des Ablaufs einer Chromatin-Immunopräzipitation

. **Tab. 2-6** Oligonukleotide für PCR nach Chromatin-Immunpräzipitation

Oligonukleotide	Sequenz
EphB4 forward	5` - atg aat tat tca gta gcg tga gct cc - 3`
EphB4 reverse	5` - gct gag ccg gcc gct cgc ggt c -3`
KDR forward	5` - ggt ttg tag ttc ttc ttg aag agg - 3`
KDR reverse	5` - ctc cag cta ctt ttc tgg gct tg -3`
VE-Cadherin forward 1	5` - gcc ttg tga gga tga ggc tgt g - 3`
VE-Cadherin reverse 1	5` - gtg gtg atc cca tga tgt ctt tg - 3`
VE-Cadherin forward 2	5` - gaa ccc agc acc tgc aaa gag c - 3`
VE-Cadherin reverse 2	5` - gac ttc cca acc att cac cca tg - 3`
VE-Cadherin forward 3	5` - cag ccc agc cct cac aaa gga ac - 3`
VE-Cadherin reverse 3	5` - gcc tgt ggg ctg agg gat g - 3`
VE-Cadherin forward 4	5` - cgc tga gct gtt gtt tgt tca ttc - 3`
VE-Cadherin reverse 4	5` - cac gtg tga ctg tag ctt ctt cc - 3`
eNOS forward	5` - aca ttt caa atg gtg gct taa tat gga - 3`
eNOS reverse	5` - gct ggg cat ctg gtc cac agg gg - 3`
Integrin β 3 forward 1	5` - gtg aat gtg tcc caa gaa tcc ag - 3`
Integrin β 3 reverse 1	5` - ctt ctc tag atc ccc tcg cgc ttc - 3`
Integrin β 3 forward 2	5` - aag ata agt gga att ttc caa gtg - 3`
Integrin β 3 reverse 2	5` - gca gcc tgc ctc aat ggg tag tcc - 3`
Integrin α_v forward 1	5` - cac ttc tct ggg cac ttt gct c - 3`
Integrin α_v reverse 1	5` - cac tga ttt gtt gat tta gga tgt - 3`
Integrin α_v forward 2	5` - ccg ctg acc cag gct cag gag - 3`
Integrin α_v reverse 2	5` - cct ttg ctt ccc tcc ggc tcc - 3`

2.30 Luciferase-Reportergen-Assay

Reportergensysteme finden bei der Erforschung der eukaryontischen Genexpression ihren Einsatz. In der hier vorliegenden Arbeit, wurde für die Reportergen-Assays ein Luciferasesystem verwendet. Dabei wurden verschiedene

Material und Methoden

Promotoren (Tabelle 2-8) vor verschiedene Luciferasegen-Vektoren (alle Promega) kloniert und zusammen mit HoxA9 wt oder HoxA9 mt in HUVEC transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 20 - 24 h wurden die Zellen mit 1 x Luciferase-Lysispuffer (Promega) lysiert und die Membran durch einmaliges Einfrieren aufgebrochen. Nach dem Auftauen wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und 20 µl des Überstandes mit 100 µl Luciferasereagenz (Promega) vermischt. Anschließend wurde sofort die Luciferaseaktivität für jeweils 10 sec mit einem Luminometer (Lumat LB9510, Berthold) gemessen.

Für die Analyse von potentiellen Bindungsstellen für HoxA9 im EphB4-, bzw. eNOS-Promotor wurde die fertig klonierten Promotoren mit Hilfe des Quick-Change-Mutagenesis-Kit (Stratagene) gezielt an den potentiellen Bindungsstellen nach Angaben des Herstellers mutiert.

Tab. 2-7 verwendete Plasmidvektoren für Luciferase-Reportergen-Assay

Insert	Vektor	Schnitt- / Mutationsstellen
eNOS (-1,6 kb - Fragment)	pGL3 - basic	Bereitgestellt von H. Li (Mol. Pharmakologie, Universität, Mainz)
VEGF-R2 (-4 kb / +296 bp)	pGL2 - basic	Bereitgestellt von J. Gille (Institut für Dermatologie, Universität, Frankfurt)
EphB4 (-1017 / +484 bp oder -537 / +484 bp)	pGL3 - enhancer	Kpn I / Xho I
EphB4 (-1017 / +484 bp <i>mt1</i>)	pGL3 - enhancer	Kpn I / Xho I Mutationsposition -126 bp
EphB4 (-1017 / +484 bp <i>mt2</i>)	pGL3 - enhancer	Kpn I / Xho I Mutationsposition -611 bp
EphB4 (-1017 / +484 bp <i>mt3</i>)	pGL3 - enhancer	Kpn I / Xho I Mutationsposition -874 bp
Integrin α_v (-3095 / +266 bp)	pGL3 - enhancer	Kpn I / Xho I
Integrin $\beta 3$ (+1429 / -112 bp)	pGL3 - enhancer	Nhe I / Bgl II
VE-Cadherin (-2928 / +104 bp)	pGL3 - enhancer	Kpn I / Xho I

2.31 Migrationsassay

Die Migration von HUVECs wurde mit der modifizierten Boyden-Kammer oder mittels „scratched wound“ gemessen. Für die modifizierte Boyden-Kammer (BD Biosciences) wurden die Zellen mit Trypsin in der üblichen Weise abgelöst, gewaschen, gezählt, 5×10^4 Zellen in 500 μ l EBM - Medium (1% BSA und ohne Zusätze) resuspendiert und in die obere Kammer überführt. Die Kammer wurde anschließend in eine mit 500 μ l EBM-Vollmedium gefüllte 24-well-Platte überführt und für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und die Zellkerne mit dem Kernmembranmarker 4',6-diamidino-phenylidole (DAPI) angefärbt. Abschließend wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Für den „scratched wound“ - Assay wurden HUVEC in einer Kulturschalen (\varnothing 6 cm), die vorher mit einer Orientierungslinie markiert wurden, bis zur Konfluenz bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei Konfluenz wurde mit einem Zellschaber eine ca. 14 mm breite Wunde entlang der Orientierungslinie in die Endothelschicht geschabt, das Kulturmedium erneuert und der Abstand zwischen den Enden der intakten Endothelschichten an 5 festgelegten Punkten gemessen. Anschließend wurden die Zellen für weitere 40 Stunden kultiviert und erneut die Breite der Wunde an denselben 5 Punkten gemessen.

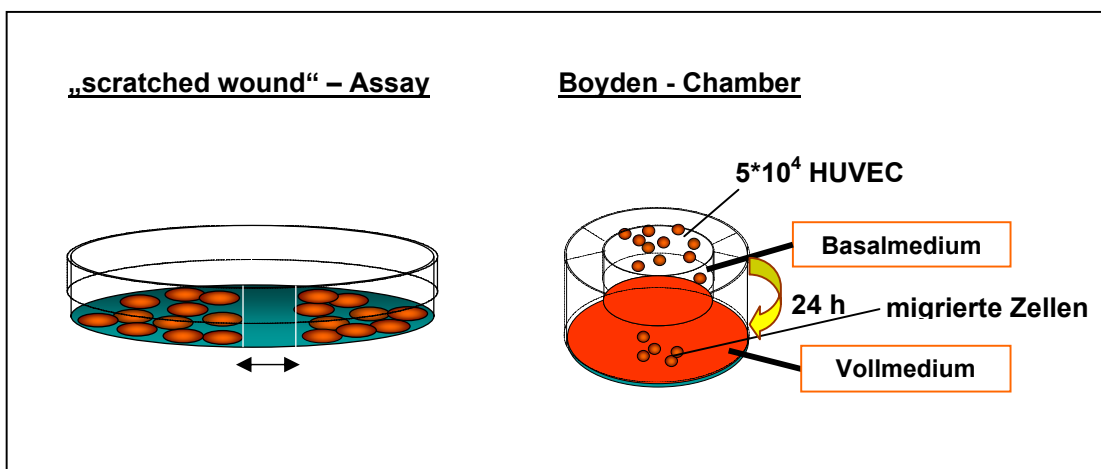


Abbildung: schematische Darstellung der verwendeten Migrationsassays

2.32 In vitro – Matrigelassay

Der Matrigel-Assay ist eine Möglichkeit in vitro die angiogene Funktion von Endothelzellen zu untersuchen. Senescente oder funktionell gestörte Zellen sind im Matrigel, nicht in der Lage gefäßähnliche Strukturen zu bilden und/oder zu erhalten.

Zuerst wurden 200 µl eiskaltes Matrigel (BD Biosciences) in vorgekühlte 12-well Platten ausgebracht und für mind. 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 1×10^5 HUVEC in die, mit Matrigel beschichtete, 12-well-Platten ausgebracht. Nach einer Kultivierung von 40 h wurde die Platten mit EBM gewaschen und die gefäßähnlichen Strukturen am Mikroskop ausgemessen und ausgewertet (Mikroskop Axiovert 100, AxioCam, Axiovision Software).

Für den Matrigelassay von murinen Endothelzellen wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen und für die Co-Kultivierung von murinen Endothelzellen (mEC) mit murinen EPC (mEPC) wurden je $2,5 \times 10^5$ mEC und mEPC verwendet. Ansonsten wurde das gleiche Verfahren wie für den Matrigelassay mit HUVEC angewandt.

2.33 Hinterlauf-Ischämie

Alle Arbeiten an Mäusen, wie die Induktion einer Hinterlauf-Ischämie oder die Blutflussmessungen mit dem Laserdoppler-Blutfluss-Image-System wurden von Dr. Ken-ichiro Sasaki und mit der Erlaubnis des Regierungspräsidiums Darmstadt des Landes Hessen, entsprechend Artikel 8 des deutschen Tierschutzgesetzes, durchgeführt.

Der proximale Teil der femoralen Arterie und der distale Teil der Saphena - Arterie wurden ligiert und sämtliche arteriellen Verzweigungen zwischen den Ligaturen wurden mit einem elektrischen Koagulator unterbrochen. Die darüber liegende Haut wurde anschließend mit drei chirurgischen Klammern verschlossen. Nach 2 Wochen wurde das Verhältnis des Blutflusses zwischen dem ischämischen (rechts) und dem normalen (links) Bein mit einem Laserdoppler-Blutfluss-Image-System (moorLDI-Mark 2, Moor Instruments) ermittelt. Dabei wird den Hinterläufen

das Oberhaar entfernt, die Mäuse auf eine auf 37°C erwärmte schwarze Platte gelegt und die Hinterläufe gescannt. Aus den aufgenommenen Histogrammen wurden die Perfusion des nicht-ischämischen und des ischämischen Beines berechnet. Um Varianzen zu minimieren, wurde die berechnete Perfusion als Verhältnis zwischen der ischämischen und der nicht-ischämischen Hinterlaufperfusion angegeben.

2.34 Blutbildbestimmung

Zur Untersuchung der Leukozytenzahl im Blut der Mäuse (Wildtyp, HoxA9^{+/-}, HoxA9^{-/-}) wurde eine Blutbildmessung vorgenommen. Dafür wurden die Tiere mit 200 mg Ketamin / kg Körpergewicht betäubt, danach die Bauchdecke geöffnet und ca. 500 - 700 µl Blut aus der Vena cava inferior entnommen. Anschließend wurde zur Ermittlung der Leukozytenzahl eine automatische Blutbildbestimmung vorgenommen (Cell-Dyn 3500, Abbott).

2.35 Shear-Stress-Exposition

HUVEC (4×10^5 Zellen) wurden in 6 cm Kulturschalen ausgebracht und in einem konischen Kegelplattenviskosimeter laminarer Schubspannung von 5, 15 oder 45 dynes/cm² ausgesetzt und für verschiedene Zeitpunkte exponiert. Durch die gleichmäßige Rotation des Konus im Kulturmedium entsteht eine definierte laminare Schubspannung τ (Shear Stress), die auf die Endothelzelleinzelschicht wirkt.

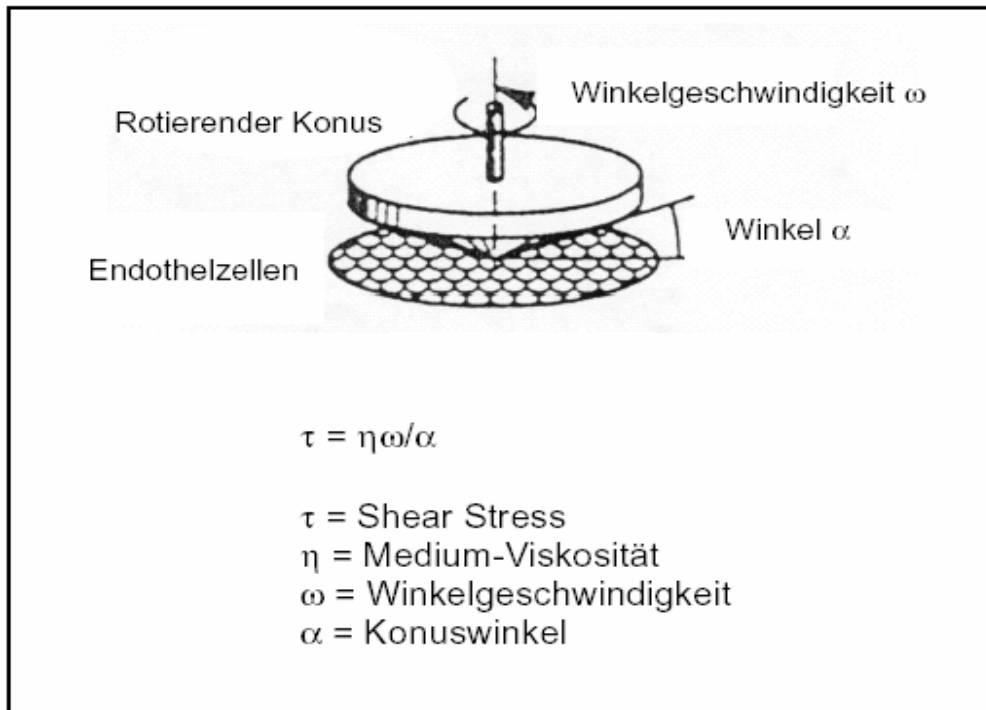


Abbildung: Konisches Kegelplattenviskosimeter (modifiziert nach Norris et al.)

2.36 Statistik

Die erhobenen Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die n-Zahlen beziehen sich auf die jeweilige Anzahl an unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test mit der Software von Excel. Ein P-Wert von weniger als 0,05 (*) wurde als signifikant bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Der vaskuläre Phänotyp HoxA9-defizienter Mäuse

3.1.1 Genotypisierung

Vor der Untersuchung des Phänotyps wurde der Genotyp der transgenen Mäuse mittels PCR analysiert. Die Analyse der PCR im Agarosegel ergab zwei charakteristische Banden. Eine Bande bei 188 bp für das Wildtyp-Allel sowie eine zweite Bande bei 333 bp für die, in den transgenen Tieren, eingebaute Neomycin-Resistenzkassette (Abb. 3.1). Die Kreuzung zweier heterozygoter HoxA9-Tiere zeigte nach der Geburt nicht die normale Mendelsche Verteilung, sondern eine signifikante Bevorzugung von heterozygoten gegenüber homozygoten HoxA9-Mäusen (164 HoxA9^{+/-} vs. 17 HoxA9^{-/-}) im Verhältnis von ungefähr 1:10. Der Wildtyp wurde mit einer zu erwartenden Häufigkeit von ungefähr 25% geboren. Die geborenen HoxA9^{-/-}-Tiere waren dann vital und fertil. Die Fertilität war allerdings in bestimmten Fällen vermindert und diese Tiere hatten dann statt der üblichen 6-8 nur 1-2 Jungtiere. Diese gehemmte Fertilität wurde vererbt und auf bei Tieren in der F2-Generation beobachtet. Eine weitergehende Beobachtung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen.

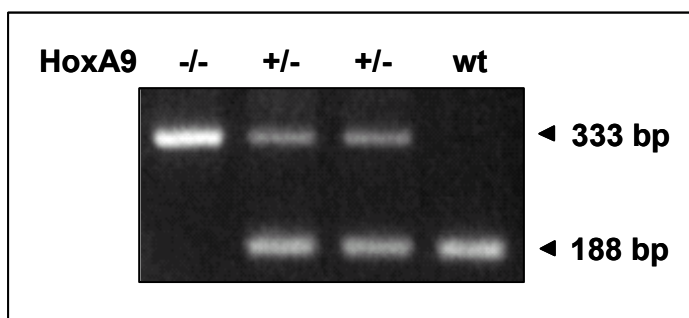


Abbildung 3.1 Genotypisierung der HoxA9-defizienten Mäuse

Die DNA wurde aus den Schwänzen der Mäuse isoliert und danach in einer PCR mit drei verschiedenen Oligonukleotiden eingesetzt. Für eine Wildtyp-Maus wurde nur das Wildtypgen, für eine HoxA9-defiziente Maus nur die Neomycin-Kassette und für heterozygote Tiere beide Sequenzen amplifiziert.

3.1.2 HoxA9 ist essentiell für die postnatale Neovaskularisierung

Sämtliche in diesem Kapitel aufgeführten Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Ken-ichiro Sasaki, Marion Muhly-Reinholz sowie Ariane Fischer durchgeführt.

Zur Untersuchung der postnatalen Neovaskularisierung wurde bei allen drei Genotypen eine Hinterlaufischämie induziert. Nach 14 Tagen wurde die Ratio des Blutflusses zwischen dem ischämischen (rechts) und dem nicht-ischämischen Bein (links), mit einem Laserdoppler ermittelt. Als Marker einer verminderten Erholung im ischämischen Bein und damit einer verschlechterten Gefäßneubildung wurde außerdem die Entstehung und, wenn vorhanden, der Schweregrad einer Nekrose dokumentiert.

Beide Genotypen HoxA9-defizienter Mäuse haben eine stark verminderte postnatale Neovaskularisierung. So zeigen HoxA9^{+/-} wie auch HoxA9^{-/-} gegenüber dem Wildtyp eine drastisch erhöhte Hinterlaufnekrose (Abb. 3.2 A). Auch die mit dem Laser-Doppler gemessene Hinterlauf-Perfusion war in hetero- (38 ± 19 % vs. Wildtyp) sowie in homozygoten (27 ± 14 % vs. Wildtyp) Mäusen signifikant gehemmt. Morphologische Untersuchungen geben einen weiteren Hinweis auf eine verschlechterte Gefäßneubildung bei HoxA9^{-/-}-Mäusen. Dabei zeigten sich eine reduzierte Anzahl von Arteriolen sowie beträchtliche Nekrosen im ischämischen Muskel. Diese Daten demonstrieren eine wichtige und essentielle Rolle von HoxA9 bei der Regulation der postnatalen Neovaskularisierung und die Wiederherstellung der Perfusion nach Hinterlaufischämie. Defekte bei der postnatalen Neovaskulierung können auf einer gehemmten Angiogenese oder Vaskulogenese basieren.

Für HoxA9^{-/-}-Mäuse wurden Defekte in der Hämatopoese sowie eine verminderte T-Zellenentwicklung beschrieben (Lawrence et al., 1997; Izon et al., 1998). Um einen Unterschied bei der Inflammations - induzierten Angiogenese auszuschließen, wurde eine Blutbildbestimmung an den Mäusen vorgenommen. Für keinen der untersuchten Genotypen konnte ein Unterschied bei der Gesamtzahl der Leukozyten festgestellt werden (Abb. 3.2 B).

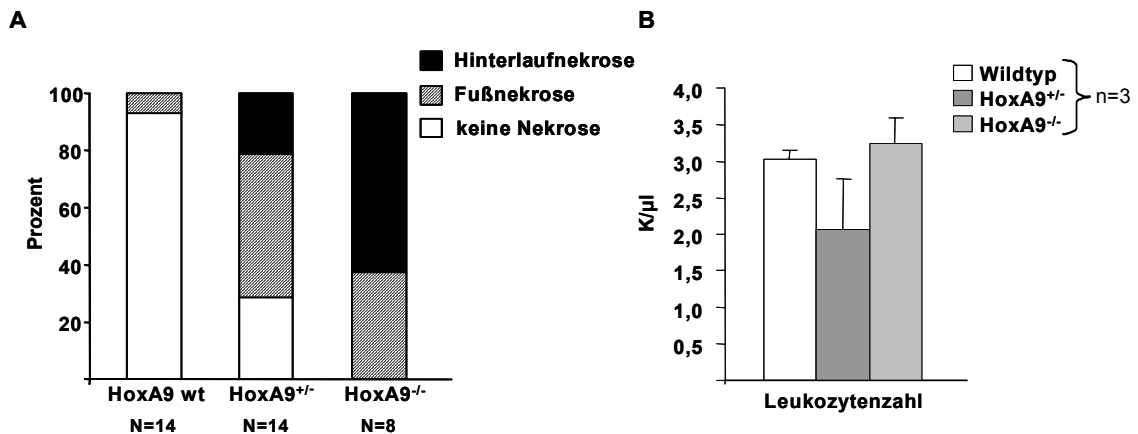


Abb. 3.2 Rolle von HoxA9 für die postnatale Neovaskularisierung nach Ischämie

(A) Häufigkeit von auftretender Nekrose nach Hinterlaufischämie bei HoxA9-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. (B) Blutbildbestimmung aller drei untersuchten Genotypen.

3.2 Der Einfluss von HoxA9 auf die Angiogenese

3.2.1 Aortenoutgrowth - Assay

Um die Auswirkungen des Verlustes von HoxA9 spezifisch auf die Endothelzellen zu untersuchen, wurden Endothelzellen aus den Aorten der Mäuse mittels Outgrowth-Assay isoliert.

Die Reinheit der Endothelzellen nach Kultivierung und Vermehrung wurde mittels Durchflußzytometrie überprüft. Der Anteil von CD146-positiven Zellen betrug bei allen drei untersuchten Genotypen durchschnittlich $97,3 \pm 0,2$ % der Gesamtzellen (Abb. 3.3).

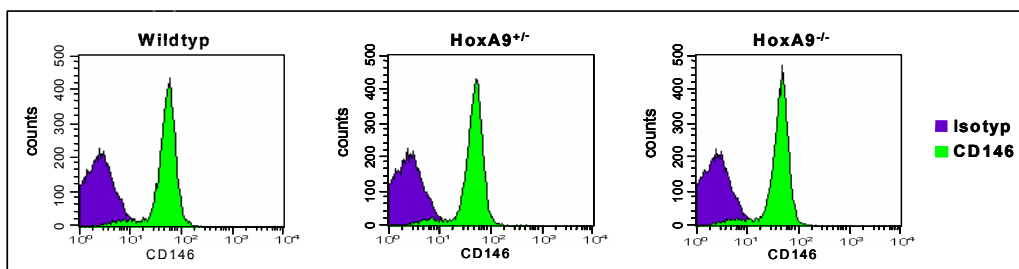


Abb. 3.3 Repräsentative Darstellung einer FACS-Analyse von Endothelzellen.

Endothelzellen wurden im Outgrowth-Assay isoliert, kultiviert, anschließend mit einem Fluoreszenz - markierten CD146-Antikörper markiert und in einer FACS-Analyse untersucht.

Ergebnisse

Um den Einfluss von HoxA9 auf Endothelzellen zu untersuchen, wurden die Zellen nach der Degradation der Kollagenmatrix gezählt. Eine verminderte oder erhöhte Anzahl von ausgewachsenen Zellen lässt einen Rückschluss auf eine mögliche Dysregulierung bestimmter Zellfunktionen, wie Apoptose, Proliferation oder Migration, zu.

Die Zählung ergab für den Wildtyp eine durchschnittliche Zellzahl von $7 \pm 0,4 \times 10^4$ Zellen. Bei den heterozygoten und den homozygoten Mäusen wuchsen signifikant weniger Zellen aus (Abb. 3.4).

Diese Daten lassen vermuten, dass der vaskuläre Phänotyp von HoxA9-defizienten Mäusen mit einem Defekt der Endothelzellfunktion, wie eine Dysregulierung von Apoptose, Zellzyklus oder Zellmigration, einhergeht.

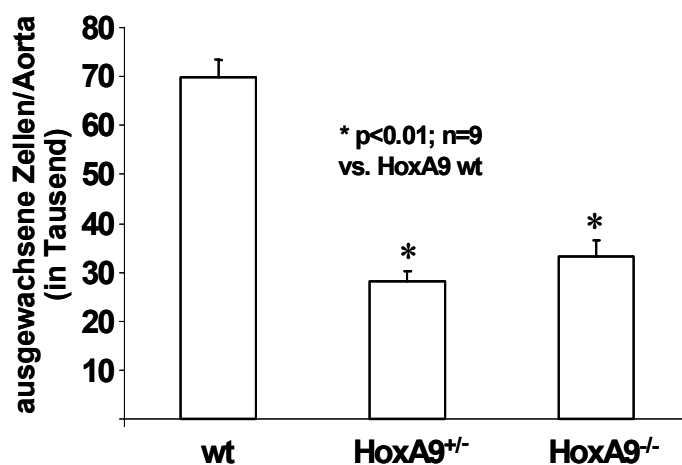


Abb. 3.4 Rolle von HoxA9 für das Auswachsen von Endothelzellen in eine Matrix

Murine Endothelzellen wurden in einem Outgrow-Assay über 4 Tage isoliert, die Matrix kollagenisiert und im Mikroskop ausgezählt.

3.2.2 Einfluss von HoxA9 für die endotheliale Apoptose, Proliferation und Migration

Wichtige Faktoren der Angiogenese im adulten Organismus sind neben der Proliferationsrate von Endothelzellen, deren Apoptoserate und Migrationsfähigkeit.

Ergebnisse

Um den Einfluss von HoxA9 auf die Regulation der Proliferation von Endothelzellen zu untersuchen, wurde die Proliferationsrate der im Outgrowth-Assay isolierten Endothelzellen mittels FACS-Analyse gemessen. Zusätzlich zur Analyse der Proliferation, wurde eine mögliche Regulation der Apoptose von Endothelzellen durch HoxA9 untersucht. Zur Unterscheidung zwischen früher und später Apoptose bzw. Zellnekrose wurden die Zellen zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff 7-AAD gefärbt. In die Messungen wurden alle Annexin⁺/7-AAD⁻- und Annexin⁺/7-AAD⁺- Zellen einbezogen.

Bei den Messungen der Proliferation und der basalen Apoptoserate konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Genotypen festgestellt werden (Abb. 3.5).

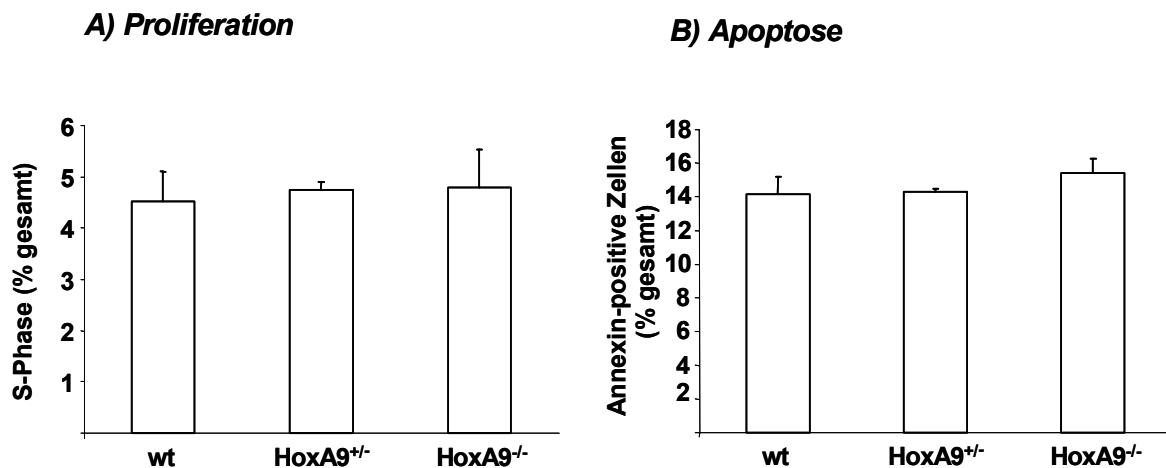


Abb. 3.5 FACS-Analyse der Proliferation und Apoptoserate muriner Endothelzellen (A) Vergleich der Proliferation muriner Endothelzellen in einer FACS-Analyse nach Inkubation mit BrdU. (B) Messung der basalen Apoptose mittels Annexin V - Färbung bei HoxA9-defizienten murinen Endothelzellen.

Als weiterer Faktor wurde der Einfluss von HoxA9 auf die Migration von Endothelzellen getestet. Dafür wurden die Zellen in eine modifizierte Boyden-Kammer eingebracht, in der die Zellen entlang eines Serumgradienten migrierten. Nach 24 h wurden die Zellen unterhalb der Membran gefärbt und gezählt. Während beim Wildtyp durchschnittlich $44,3 \pm 3,6$ Zellen/ Gesichtsfeld durch die Membran wanderten, war die Migration bei HoxA9-defizienten Zellen signifikant

gehemmt. So konnten bei HoxA9^{+/-}-Zellen nur noch $5,7 \pm 0,8$ % Zellen/ Gesichtsfeld und bei HoxA9^{-/-}-Tieren nur $5,4 \pm 0,7$ % Zellen/ Gesichtsfeld gezählt werden. Diese Daten zeigen einen dramatischen Einfluss von HoxA9 auf die Regulation der Migration von Endothelzellen. (Abb. 3.6).

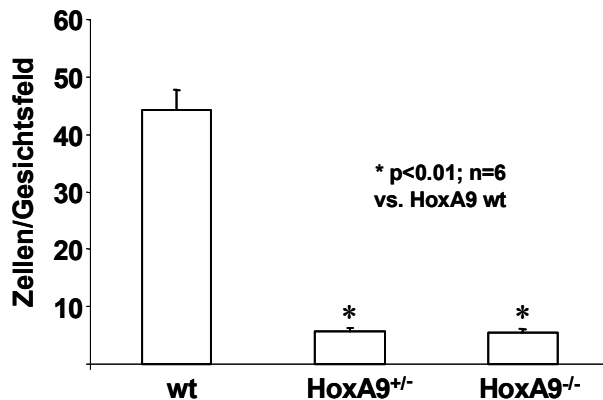


Abb. 3.6 Einfluss von HoxA9 bei der Regulation der Endothelzellmigration

HUVEC wurden in eine modifizierte Boyden-Chamber eingebracht und nach 24 h die Migration ausgezählt

3.2.3 Die Regulation maturaer Endothelzellen durch HoxA9

Für eine in vitro - Untersuchung des Einflusses von HoxA9 auf Endothelzellen, wurde neben den eben beschriebenen murinen Aorten-Endothelzellen auch humane Endothelzellen verwendet. Die dafür verwendeten HUVEC, hatten den Vorteil, dass die Zellen nicht mit anderen Zelltypen kontaminiert und für alle Versuche standardisiert waren. Dafür musste an diesen Zellen ein Knockdown mittels RNA interference (RNAi) etabliert werden. Für die RNAi wurden die HUVEC mit small interference RNA (siRNA) transfiziert und anschließend im Westernblot analysiert. Als Kontrolle wurde siRNA verwendet, die sich aus denselben Nukleotiden zusammensetzte, jedoch keine Übereinstimmung mit einem Gen hatte. Solche siRNA - Kontrollen werden im Folgenden als „scrambled“ bezeichnet. Die densitometrische Auswertung der Westernblots ergab eine signifikante Reduktion der HoxA9-Expression nach Transfektion mit HoxA9 - siRNA im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.7).

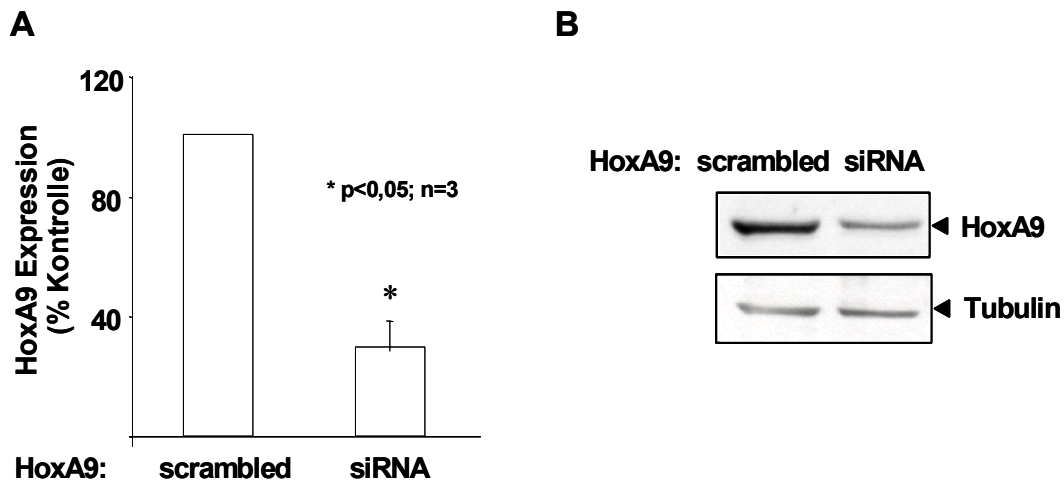


Abb. 3.7 Überprüfung und Analyse einer HoxA9 - spezifischen siRNA

(A) HUVEC wurden mit scrambled- und HoxA9-siRNA transfiziert und die HoxA9-Expression im Westernblot analysiert. Als Gleichladungskontrolle wurde Tubulin verwendet. (B) Repräsentativer Westernblot der HoxA9-Expression nach HoxA9-siRNA.

Zusätzlich war es notwendig die erfolgreiche Überexpression und korrekte Lokalisation von überexprimiertem HoxA9 nachzuweisen. Dazu wurde HoxA9 in einen pcDNA3.1 myc-His - Vektor kloniert, so dass das überexprimierte HoxA9 durch einen myc-Tag leichter vom endogenen Protein zu unterscheiden war. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung und die Expression und Lokalisation durch Westernblot bzw. Immuncytochemie nachgewiesen. Die Bande des überexprimierten HoxA9 lag auf der erwarteten Höhe im Westernblot und war durch Antikörper gegen den Myc-Tag sowie durch Antikörper gegen endogenes HoxA9 detektierbar (Abb. 3.8A). Die Immuncytochemie zeigte eine, für einen Transkriptionsfaktor zu erwartenden Lokalisation von HoxA9 im Zellkern (Abb. 3.8B). Für HoxA9 sind zwei verschiedene distinkte Kernimportsequenzen beschrieben (Kirito et al., 2004), was die absolute und exklusive Lokalisation im Zellkern erklärt.

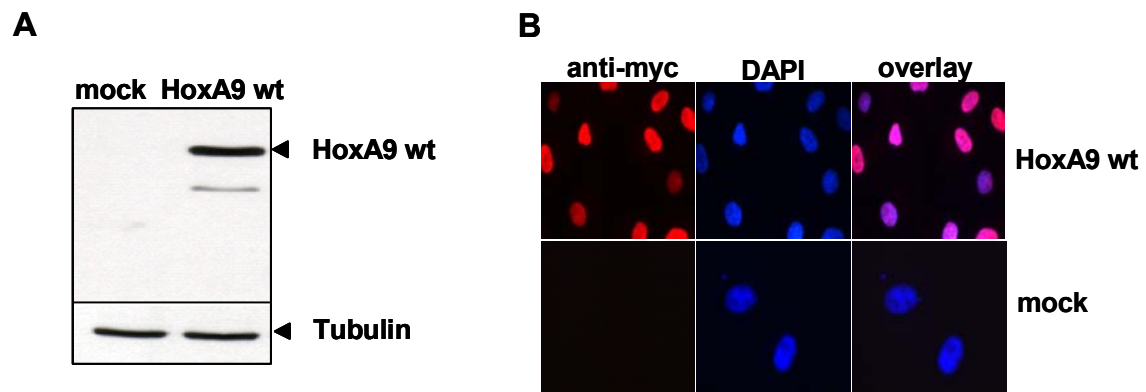


Abb. 3.8 Nachweis der Überexpression und Lokalisation von HoxA9

HUVEC wurden mit HoxA9 wt und, als Kontrolle, mit einem Leerplasmid transfiziert, lysiert und dann im Westernblot analysiert. Für den Nachweis der Lokalisation wurden die Zellen mit einem Anti-myc - Antikörper gefärbt (n=3). **(A)** Repräsentativer Westernblot der HoxA9-Expression nach HoxA9-Überexpression. **(B)** Immunhistochemischer Nachweis der HoxA9-Lokalisation in HUVEC (n=5).

Die Parameter Migration, Proliferation und Apoptose wurden zusätzlich in humanen Endothelzellen nach einer Transfektion mit HoxA9-siRNA untersucht. wurde auch untersucht ob die Überexpression von HoxA9 zu einer Verbesserung der von Endothelzellmigration führt.

Für die RNAi - Versuche wurden die Zellen mit siRNA gegen HoxA9 transfiziert und für weitere 48 h kultiviert. Anschließend wurde die Proliferation im FACS auf die Inkorporation des Thymidin-Analogons BrdU und die Apoptose auf die Bindung des Apoptosemarkers Annexin V hin analysiert. Die Migration wurde mittels „scratched-wound“ - Assay untersucht.

Auch bei Reduktion der HoxA9-Expression durch RNAi konnte kein Einfluss von HoxA9 auf die Proliferation oder Apoptose festgestellt werden. Sowohl Proliferation wie basale Apoptoserate unterschieden sich in der „scrambled-Gruppe“ nicht von den siRNA-behandelten Zellen (Abb. 3.9).

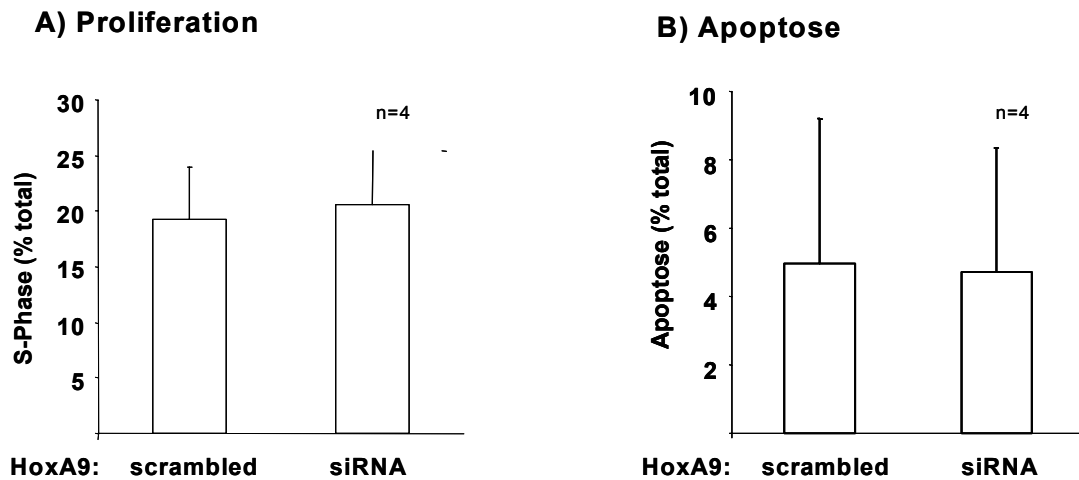


Abb. 3.9 Bedeutung von HoxA9 für die endotheliale Proliferation und Apoptose

HUVEC wurden mit HoxA9- und scrambled - siRNA transfiziert und für 24 h kultiviert. Anschließend wurde die Proliferations- und die Apoptoserate mittels FACS-Analyse untersucht. **(A+B)** Statistische Auswertung der Proliferations- und der Apoptoserate.

Bei den Untersuchungen zur Migration zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei genetisch HoxA9-defizienten Endothelzellen. Nach der RNAi-induzierten Reduktion der HoxA9-Proteinexpression reduzierte sich die Fähigkeit zur Zellwanderung bei den mit HoxA9-siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe fast vollständig auf $13 \pm 3 \%$ (Abb. 3.10).

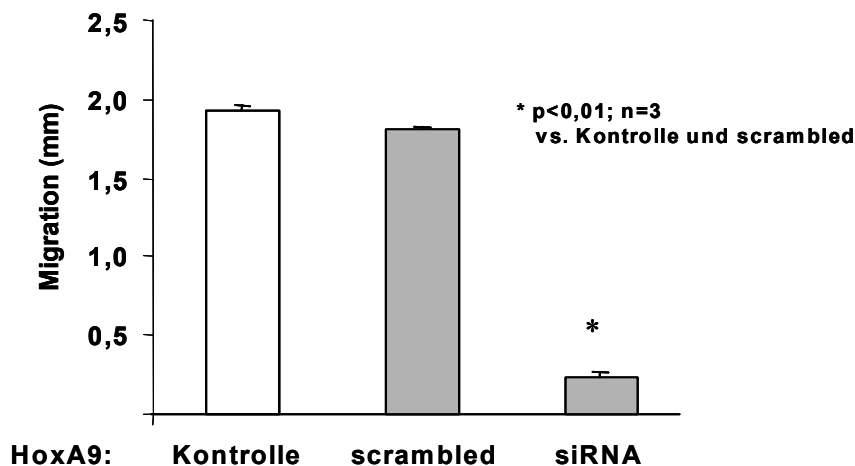


Abb. 3.10 Rolle von HoxA9 bei der endothelialen Migration

HUVEC wurden mit HoxA9- und scrambled - siRNA transfiziert und für 24 h kultiviert. Anschließend wurde die Migration der Endothelzellen nach 48 Stunden mittels „scratched wound“ - Assay gemessen.

Ergebnisse

Zusammenfassend zeigen diese Daten einen spezifischen Einfluss von HoxA9 auf die Migration von Endothelzellen. Daher lag die Vermutung nahe, dass auch die Bildung und Erhaltung von Gefäßstrukturen im Matrigel - Assay nach einem Knockdown von HoxA9 funktionell gestört ist. Deshalb wurden HUVEC mit HoxA9 - siRNA transfiziert und kultiviert, nach 24 h wurden die Zellen in einem Matrigel - Assay eingesetzt und für weitere 48 h kultiviert. Der Erhalt des RNAi - Effektes auf die Zellen wurde in drei unabhängigen Experimenten exemplarisch über den gesamten Zeitraum im Westernblot überprüft und bestätigt. Die Kultivierung im Matrigel führte bei HoxA9-defizienten HUVEC zu einer fast vollständigen Verlust von messbaren Gefäßstrukturen, während sich bei scrambled - transfizierten Zellen kein Unterschied zu unbehandelten Zellen zeigte (Abb. 3.11).

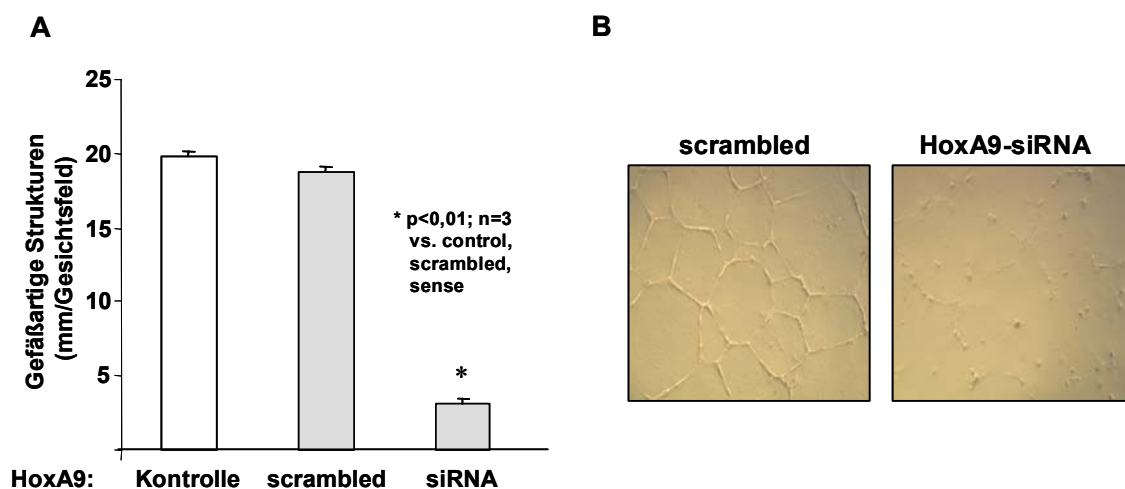


Abb. 3.11 Rolle von HoxA9 für die endotheliale Gefäßstrukturbildung

(A) Unbehandelte, scrambled- und HoxA9-siRNA behandelte HUVEC wurden in eine mit Matrigel beschichtete Zellkulturschale ausgebracht. Die Bildung gefäßähnlicher Strukturen wurde nach 48 h gemessen. (B) Repräsentative Darstellung eines in vitro - Matrigelgels mit scrambled- und HoxA9-siRNA transfizierten Zellen.

Die Tatsache, dass die Inhibierung der HoxA9-Expression mit einer Hemmung der Migration und Bildung von Gefäßstrukturen von Endothelzellen einhergeht, führte zu der Hypothese, dass die Überexpression von HoxA9 diese Funktionen verbessern könnte. Dafür wurden Zellen mit einem HoxA9-Plasmid transfiziert und die Migration sowie die Gefäßbildung im Matrigel analysiert. Die Migration wurde im „scratched wound“-Assay und in der modifizierten Boyden-Kammer untersucht.

Ergebnisse

Die Überexpression mit HoxA9 stimulierte sowohl die Migration, als auch die Bildung neuer Gefäßstrukturen im Matrigel signifikant. Diese Verbesserung fiel jedoch sehr viel geringer aus, als der Verlust von HoxA9 invers wirkt. So führte die erhöhte Expression von HoxA9 in den Endothelzellen in beiden experimentellen Ansätzen zu einer Steigerung der Migration auf ca. 150 % der Kontrolle (Abb. 3.12).

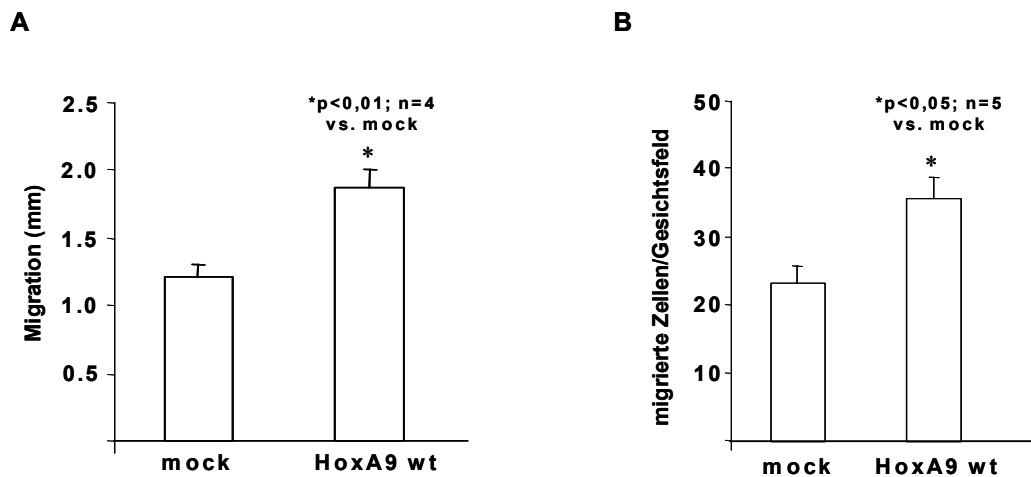


Abb. 3.12 HoxA9-Überexpression führt zu einer Verbesserung der Migration

HUVEC wurden mit HoxA9 wt oder mock transfiziert und die Migration in der modifizierten Boyden-Kammer und im „scratched wound“ - Assay nach 24 bzw. 48 h analysiert. **(A)** Analyse der Migration im „scratched wound“-Assay. **(B)** Auszählung der migrierten Zellen in der modifizierten Boyden-Kammer.

Obwohl die Gefäßbildung durch HoxA9 signifikant erhöht war (Abb. 3.13) fiel die Verbesserung nach HoxA9-Überexpression auf 133% noch geringer aus als bei der Migration.

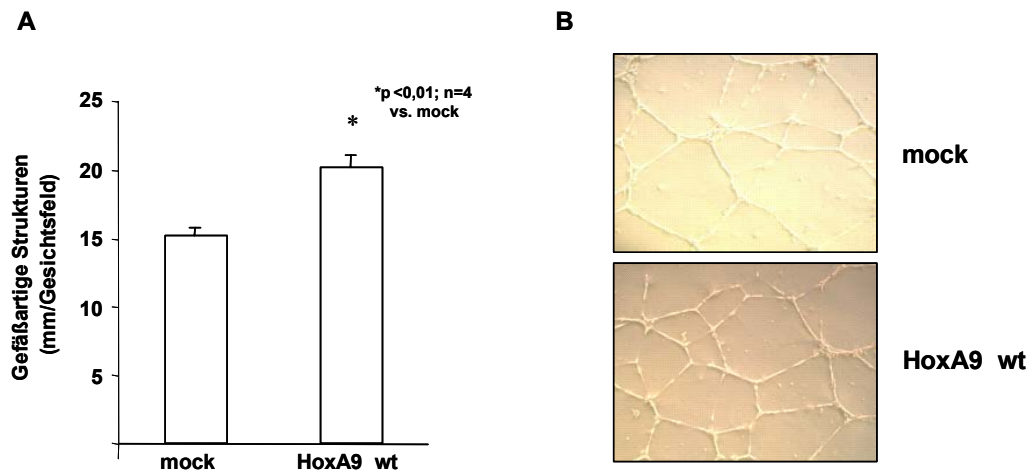


Abb. 3.13 Verbesserung der Bildung gefäßartiger Strukturen im Matrigel nach HoxA9-Überexpression

HUVEC wurden mit HoxA9 wt und Leerplasmid transfiziert und die Gefäßstrukturbildung im Matrigel nach 48 h gemessen. **(A)** quantitative Analyse der gebildeten Strukturen. **(B)** Repräsentative Darstellung der Strukturbildung im Matrigel nach mock- und nach HoxA9-Transfektion.

3.3 Der Einfluss von HoxA9 auf die Vaskulogenese

3.3.1 HoxA9 reguliert die postnatale Differenzierung endothelialer Progenitorzellen

Neben der Angiogenese ist die Vaskulogenese ein weiterer entscheidender Faktor bei der postnatalen Neovaskularisierung. Bisher konnte ein Einfluss von HoxA9 auf die Migration und die Sprossung von Endothelzellen gezeigt werden. Um festzustellen ob HoxA9 auch bei der Regulation der Vaskulogenese eine Rolle spielt, wurden mononukleäre Zellen (MNC) aus der Milz der Mäuse isoliert, kultiviert und die Anzahl und Funktion differenzierter endothelialer Progenitorzellen untersucht.

Um die Anzahl der spezifisch endothelialen Vorläuferzellen zu bestimmen, wurden die aus der Milz isolierten Zellen auf Fibronectin beschichteten Platten kultiviert und anschließend mit Dil-Ac-LDL sowie FITC-markiertem Lectin gefärbt. Die mikroskopische Auszählung ergab, dass nahezu alle (ca. 95%) mit Dil-Ac-LDL markierten Zellen auch mit Lectin anzufärben waren (Abb. 3.14 A). Im Folgenden wurden daher die Dil-Ac-LDL-positiven Zellen als endotheliale Progenitorzellen

Ergebnisse

angesehen. Diese endothelialen Progenitorzellen (EPC) machten ungefähr 1 - 2 % aller kultivierten isolierten Milzzellen aus. Bei HoxA9^{+/-}- und HoxA9^{-/-}-Mäusen differenzierten signifikant weniger mononukleäre Zellen zu Dil-Ac-LDL-positiven endothelialen Progenitorzellen im Vergleich zum Wildtyp. Die Anzahl der gezählten EPC je Gesichtsfeld war beim Wildtyp bei durchschnittlich 3-mal höher als bei den HoxA9^{+/-}- und HoxA9^{-/-}-Mäusen (Abb. 3.14 B). Ein typisches Merkmal von nicht ausgereiften Vorläuferzellen ist ihre Fähigkeit zur Koloniebildung. Diese Fähigkeit zeigt sich nicht nur in semisolider Methylzellulose sondern auch während der Kultivierung auf Fibronektin. Bei HoxA9-defizienten EPC ist diese Koloniebildung nahezu vollständig gehemmt. Während beim Wildtyp 9 ± 3 Kolonien pro ausgebrachte Kulturschale gezählt wurden, bildete sich bei heterozygoten sowie bei homozygoten Tieren, bis auf eine einzige Ausnahme keine einzige Kolonie (Abb. 3.14 B+C), was den Einfluss von HoxA9 auf die Bildung endothelialer Progenitorzellen aus mononukleären Zellen hervorhebt.

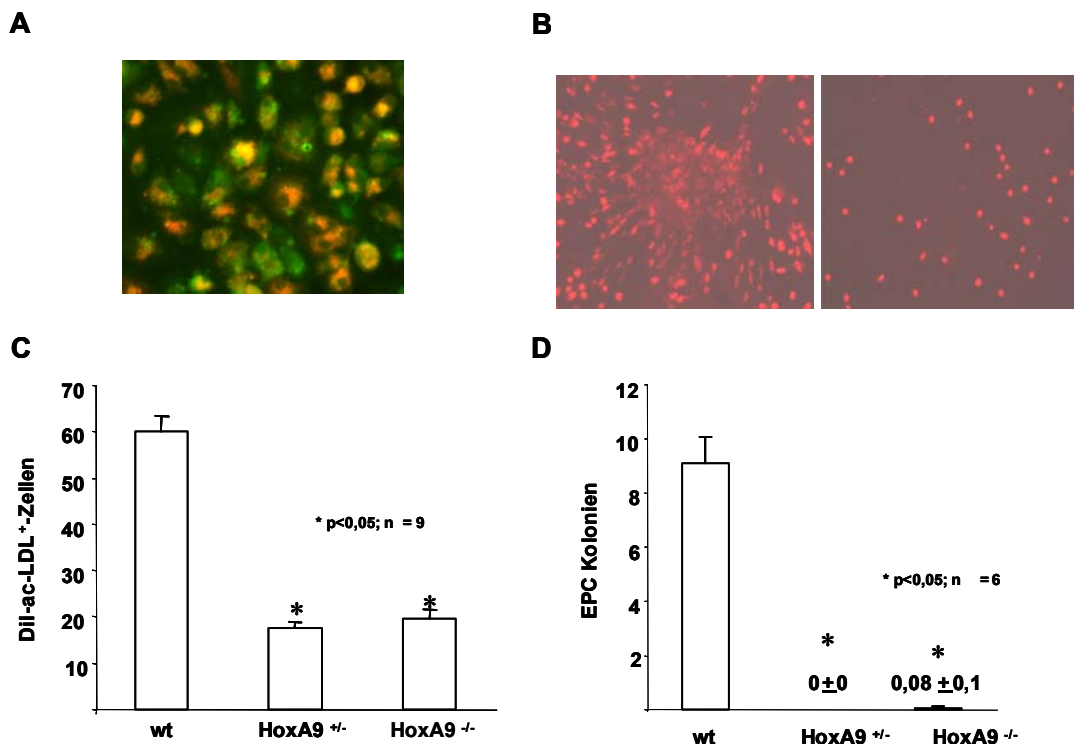


Abb. 3.14 Regulation der endothelialen Differenzierung von MNCs durch HoxA9

(A) Repräsentative Darstellung Dil-Ac-LDL- und Lectin-positiver EPC (B) Repräsentativer Unterschied bei der Koloniebildung von EPC aus wt (links) und HoxA9^{+/-}-Mäusen (rechts) (C) Differenzierte Dil-Ac-LDL⁺ - EPC aus der Milz von Wildtyp-, HoxA9^{+/-}- und HoxA9^{-/-}-Mäusen. (D) Koloniebildung HoxA9-defizienter endothelialer Progenitorzellen nach Kultivierung auf Fibronektin.

Ergebnisse

Diese Daten zeigen, dass der Verlust von HoxA9 zu einer dramatischen Verschlechterung der EPC-Differenzierung führt. Daher war es von Interesse zu untersuchen, ob die Überexpression von HoxA9 die Differenzierung von EPC verbessern konnte. Für diese Versuche wurden humane mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut mit einem HoxA9-exprimierenden Adenovirus transfiziert. Als Kontrolle wurde ein lacZ-exprimierender Adenovirus verwendet. Die Überexpression von HoxA9 in MNC des Blutes führte zu einer signifikant erhöhten Differenzierung von MNC zu endothelialen Progenitorzellen (Abb. 3.15A). Die Expression wurde mittels Westernblot überprüft (Abb. 3.15B).

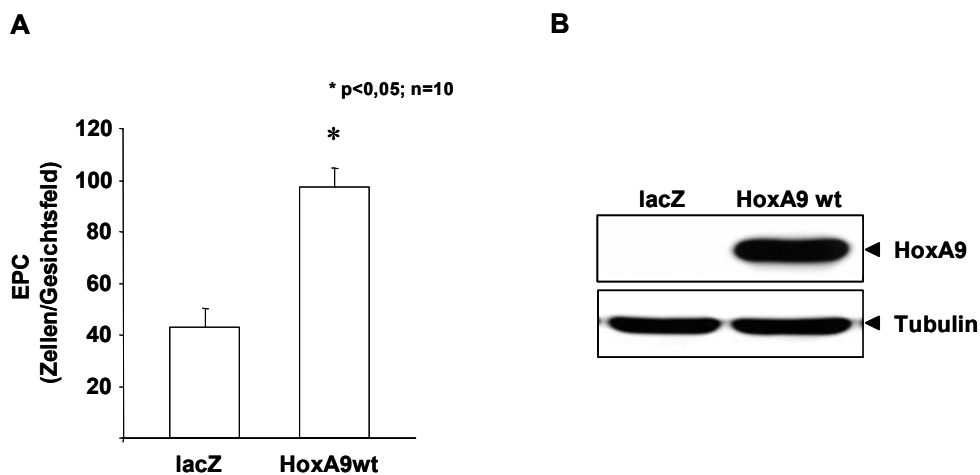


Abb. 3.15 Regulation der endothelialen Differenzierung durch HoxA9

(A) Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden mit einem lacZ- bzw. einem HoxA9-Adenovirus transfiziert, nach 4 Tagen mit Dil-Ac-LDL angefärbt und ausgezählt. (B) Repräsentativer Westernblot der HoxA9-Expression nach HoxA9-Transfektion.

Die Beobachtung, dass eine erhöhte Expression von HoxA9 zu einer gesteigerten Differenzierung von mononukleären Zellen des Blutes zu endothelialen Progenitorzellen führt, weist auf die Rolle von HoxA9 bei der Vaskulogenese hin.

3.3.2 HoxA9 trägt zur funktionellen Integrität endothelialer Vorläuferzellen bei

Die Reifung endothelialer Zellen aus mononukleären Zellen ist nur ein Teil der Vaskulogenese im adulten Organismus. Daneben gibt es ein Zusammenspiel mit umgebenden Zellen und Wechselwirkungen, durch deren Sekretion von verschie-

denen Wachstumsfaktoren. Um den Einfluss von HoxA9 auch auf andere Zelllinien zu untersuchen, wurden mononukleäre Zellen aus den Milzen von allen Genotypen der transgenen HoxA9-Mäuse in einem Kolonie-Assay untersucht. Anhand des Phänotyps der Kolonien ließ sich dabei erkennen, welche Art bei jeder einzelnen Kolonie vorlag. Im Wildtyp wurden am häufigsten (Anteil ca. 70% aller Kolonien) Multi-Linien-Kolonien aus Granulozyten, Erythrozyten, Makrophagen und Megakaryozyten (Multi-GM) sowie Kolonien endothelialen Ursprungs (ca. 10 % Anteil) beobachtet. Der relative Anteil der Multi-GM-Linien war bei den HoxA9-defizienten Mäuse ähnlich hoch, jedoch bildeten sich nahezu keine endothelialen Kolonien.

HoxA9-defiziente Mäuse zeigten in allen Subpopulationen eine signifikante Hemmung der absoluten Koloniebildung, wobei vor allem die Bildung von endothelialen Kolonien inhibiert war (Abb. 3.16). Dieser ausgeprägte Effekt bei der Koloniebildung aller Zelllinien im Kolonie-Assay zusammen mit der in Kapitel 3.3.1 erwähnten Hemmung der Koloniebildung von endothelialen Progenitorzellen, zeigt einen deutlichen Einfluss von HoxA9 für die funktionelle Integrität von Progenitorzellen des peripheren Blutes hin.

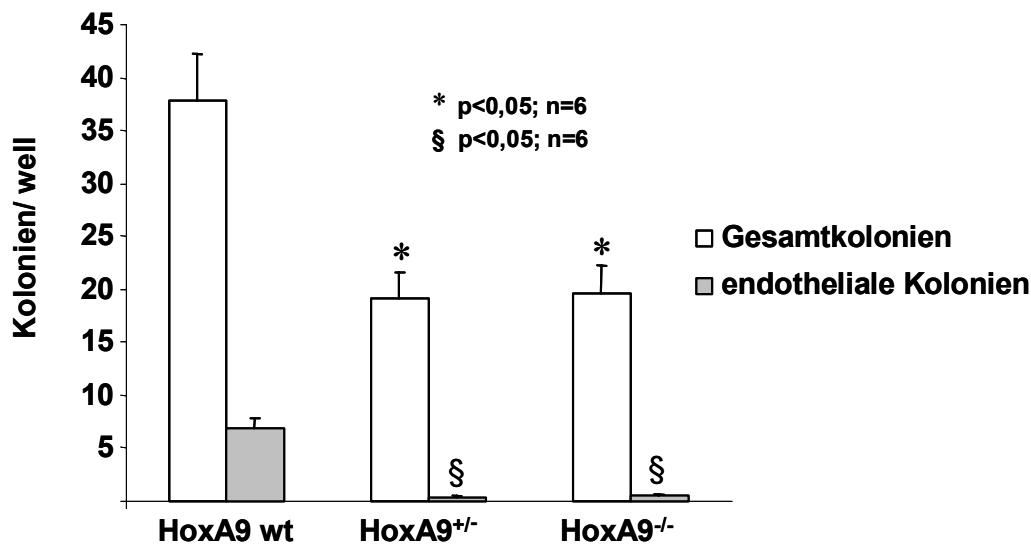


Abb. 3.16 HoxA9 beeinflusst die Koloniebildung von hämatopoetischen sowie endothelialen Progenitorzellen

Mononukleäre Zellen wurden aus der Milz von Wildtyp- und HoxA9-defizienten Mäusen isoliert, in eine semisolid Matrix mit verschiedenen Wachstumsfaktoren ausgebracht und 2 Wochen kultiviert. Danach erfolgte die Auszählung der Kolonien.

Die bisherigen Analysen zeigten einen Einfluss von HoxA9 auf die postnatale Neovaskularisierung und zusätzlich Erklärungen für mögliche zugrunde liegenden Ursachen. Die gewonnenen Daten legen nahe, dass HoxA9 in verschiedene Stufen der Angiogenese und Vaskulogenese eingreift. Sowohl mature Endothelzellen wie nicht vollständig ausgereifte Progenitorzellen zeigen eine gestörte angiogene Funktion bei einem teilweisen oder vollständigen Verlust von HoxA9. Um zusätzlich Wechselwirkungen zwischen maturen Endothelzellen und endothelialen Progenitorzellen zu untersuchen, wurden in einem in vitro - Matrigel-Assay durch Co-Kultivierung die angiogene Funktion von Endothelzellen und endothelialen Vorläuferzellen untersucht. Zusätzlich zur angiogenen Funktion, sind durch evtl. veränderte Gefäßstrukturbildung, auch Rückschlüsse auf die Interaktion zwischen Endothel und EPC möglich.

Bei den Untersuchungen im Matrigel-Assay zeigte sich ein differenziertes Bild zwischen der Bildung gefäßähnlicher Strukturen und der Inkorporation. Während heterozygote HoxA9-Mäuse bei der Gefäßstrukturbildung einen Unterschied von $48\pm 3\%$ aufwiesen, inkorporierten $87\pm 3\%$ weniger EPC. Bei den homozygoten Knockout-Mäusen dagegen bildeten sich keine gefäßartigen Strukturen, jedoch integrierten sich genauso viele EPC wie beim Wildtyp in die Endothelzellen (Abb. 3.17/ 3.18). In ersten weiterführenden Versuchen zeigte sich jedoch ein Trend, dass sich auch EPC von HoxA9^{+/-}-Mäusen in diese Zellcluster integrieren können, während die Zahl inkorporierte homozygote Vorläuferzellen in eine intakte Gefäßstruktur ähnlich wie bei EPC von heterozygoten Mäusen reduziert war. Andererseits gibt es erste Hinweise darauf, dass Wildtyp-EPC, die mit HoxA9-defizienten maturen Endothelzellen co-kultiviert worden sind, in der Lage waren, die inhibierte Gefäßstrukturbildung zum Teil wieder herzustellen.

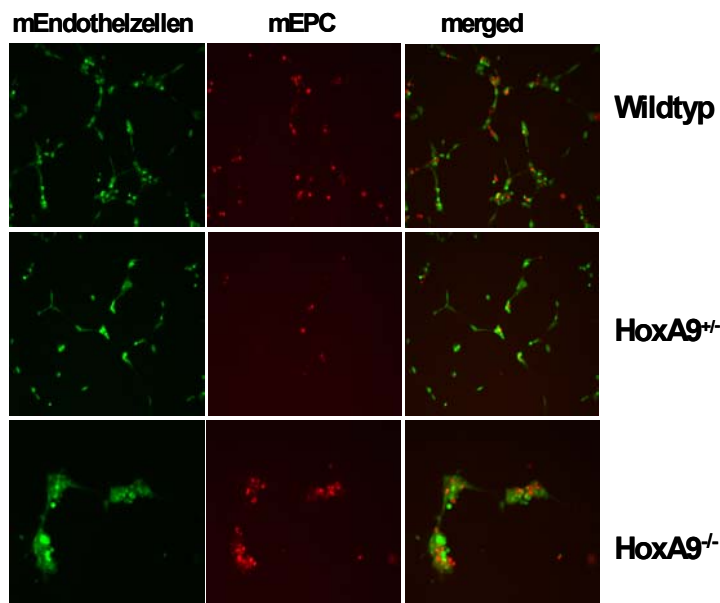


Abb. 3.17 Repräsentative Darstellung von co-kultivierten murinen Endothelzellen mit murinen endothelialen Progenitorzellen

Mit Cell-Tracker-Green gefärbte murine Endothelzellen wurden zusammen mit Dil-Ac-LDL gefärbten murinen EPC co-kultiviert und die Gefäßstrukturbildung sowie die Inkorporation der EPC in diese Strukturen analysiert.

Diese Daten zeigen, dass HoxA9 nicht nur eine Rolle bei der Funktion von Endothelzellen und EPC hat, sondern auch in die Interaktion von beiden Zelltypen beeinflusst.

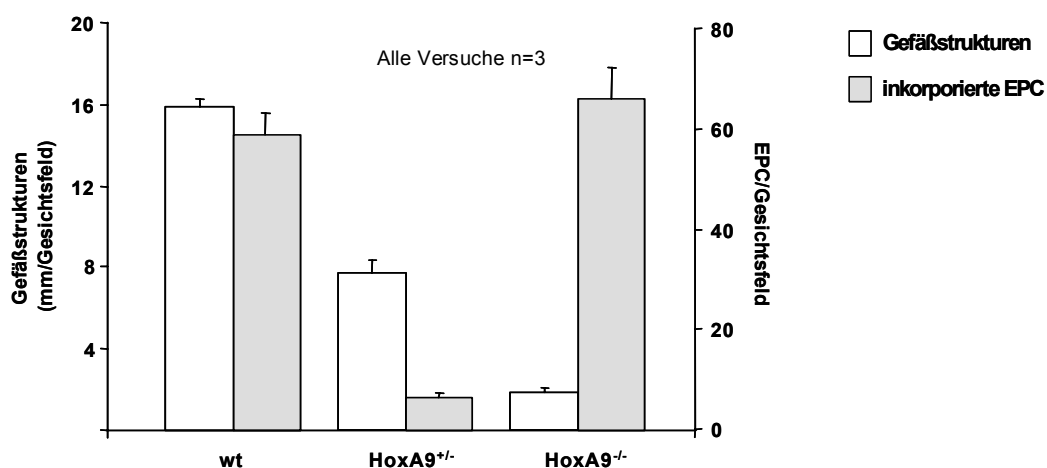


Abb. 3.18 Einfluss von HoxA9 auf die Gefäßstrukturbildung von Endothelzellen sowie die Inkorporation von endothelialen Progenitorzellen

Quantitative Analyse des in Abb. 3.17 gezeigten Matrigel-Assays.

3.4 Der Einfluss von HoxA9 auf die embryonale Angio- und Vaskulogenese ex vivo

Aufgrund des in Kap. 3.1 beschriebenen Phänotyps einer nicht-mendel'schen Verteilung der Genotypen nach Geburt, war neben der adulten auch die embryonale Angio- und Vaskulogenese von Interesse. Dafür wurden in einem weiteren Versuch die vaskuläre Differenzierung embryonaler Allantois ex vivo untersucht. Dazu wurden die Allantois von 7,5 Tage alten Embryos für 48 Stunden kultiviert und danach die gebildeten vaskulären Strukturen analysiert. Diese Gefäßstrukturbildung in Allantois lässt sich nicht eindeutig der Angiogenese oder Vaskulogenese zuordnen und stellt in bestimmten Punkten eine Mischung aus beiden dar. In ersten Experimenten zeigten die aus HoxA9^{-/-} - Mäusen isolierten Allantois im Vergleich zum Wildtyp eine gehemmte eine reduzierte Größe sowie verminderte Verzweigungen und Struktur (Abb. 3.19).

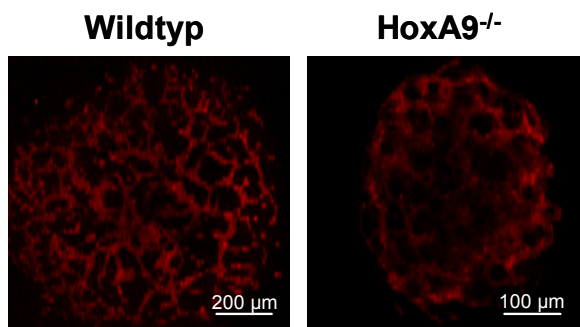


Abb. 3.19 Einfluss von HoxA9 auf die embryonale Vaskularisierung ex vivo

Ex vivo - Differenzierung muriner Allantois. Nach Immunofärbung der gebildeten Gefäße wurden diese im Fluoreszenzmikroskop visualisiert.

3.5 Zielgene von HoxA9

3.5.1 Der EphB4-Rezeptor

In den vorangegangenen Kapiteln (3.1 - 3.4) wurde der Einfluss von HoxA9 auf die postnatale Angiogenese und Vaskulogenese beschrieben. Außerdem konnte

gezeigt werden, dass die gehemmte postnatale Neovaskularisierung mit einer gestörten Endothelzell-Funktion und einer verminderten funktionellen Integrität endothelialer Progenitorzellen einhergeht. Die dafür zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind bisher noch nicht untersucht worden. Eine Möglichkeit für diese funktionellen Unterschiede durch HoxA9 liegt in der direkten oder indirekten transkriptionellen Kontrolle verschiedener endothelialer Gene.

Knockout-Mäuse denen das Gen für den EphB4-Rezeptor oder dessen Liganden EphrinB2 fehlt, zeigen identische und letale vaskuläre Defekte bei der Bildung eines hierarchisch aufgebauten Gefäßsystems (Gerety et al., 1999). Aufgrund der Stellung des EphB4/EphrinB2-Systems für die Angiogenese und Vaskulogenese wurde der mögliche Einfluss von HoxA9 auf den EphB4-Rezeptor untersucht.

Für die Untersuchung einer Regulation des EphB4-Rezeptors durch HoxA9 wurden HUVEC mit siRNA gegen HoxA9 sowie mit einem HoxA9-exprimierenden Plasmid transfiziert. Anschließend wurde die Expression von HoxA9 und EphB4 mittels Westernblot analysiert. Als Gleichladungskontrolle diente Tubulin. Die Transfektion mit HoxA9-siRNA führte zu einer signifikanten Reduktion der EphB4-Expression. Andererseits führte die Überexpression von HoxA9 zu einer gleichsinnigen erhöhten Expression des EphB4-Rezeptors (Abb. 3.20).

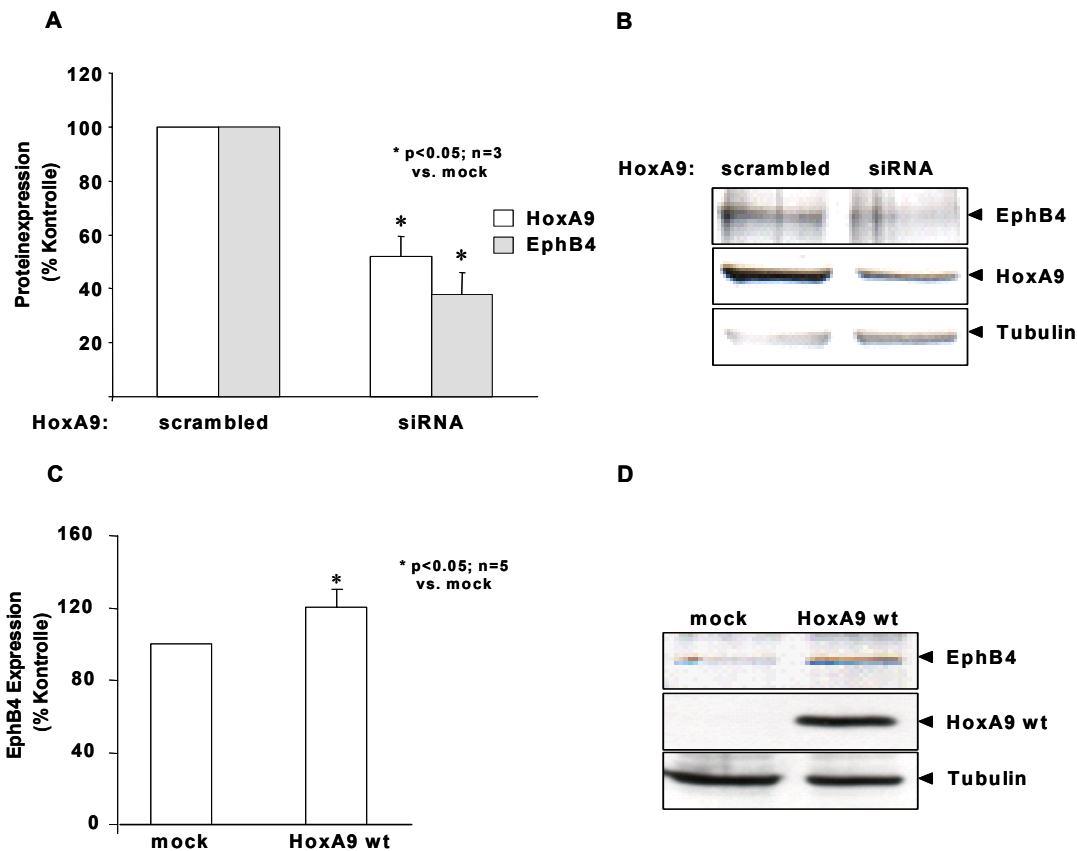


Abb. 3.20 Die Expression des EphB4-Rezeptors korreliert mit der HoxA9-Expression

HUVEC wurden mit HoxA9- und scrambled-siRNA oder HoxA9 wt und mock transfiziert und kultiviert. Nach 48 h wurde die Expression von HoxA9 und EphB4 mittels Westernblot analysiert. **(A+C)** Semiquantitative Analyse der EphB4-Expression nach Transfektion mit siRNA gegen HoxA9 bzw. nach HoxA9-Überexpression. **(B+D)** Repräsentativer Westernblot für die HoxA9- und die EphB4-Expression nach Transfektion mit siRNA gegen HoxA9 bzw. nach HoxA9-Überexpression.

Nachdem eine Regulation des EphB4-Rezeptors durch HoxA9 gezeigt werden konnte, wurde untersucht, ob diese Regulation durch eine direkte oder indirekte transkriptionelle Kontrolle stattfindet. Eine direkte Kontrolle des EphB4-Proteins durch HoxA9 würde eine Bindung des HoxA9-Transkriptionsfaktors an den Promotor von EphB4 voraussetzen. Um diese Bindung zu überprüfen wurde mit HoxA9 eine Chromatin-Immunpräzipitation durchgeführt. Die Protein-Präzipitation wurde gegen endogenes sowie überexprimiertes HoxA9 durchgeführt. Zur Überprüfung der Spezifität dieser Methode wurde zusätzlich eine HoxA9-Mutante (Δ aa 206 – 272), ohne DNA-Bindungsdomäne, eingesetzt. Die Ergebnisse der

Ergebnisse

Chromatin-Immunpräzipitation zeigten eine Bindung für endogenes wie für überexprimiertes HoxA9 an den EphB4-Promotor (Abb. 3.21A+C). Konsistent dazu konnte für die HoxA9-Mutante, keine Bindung an den EphB4-Promotor nachgewiesen werden (Abb. 3.21C), was eine direkte Bindung des Proteins an die DNA impliziert.

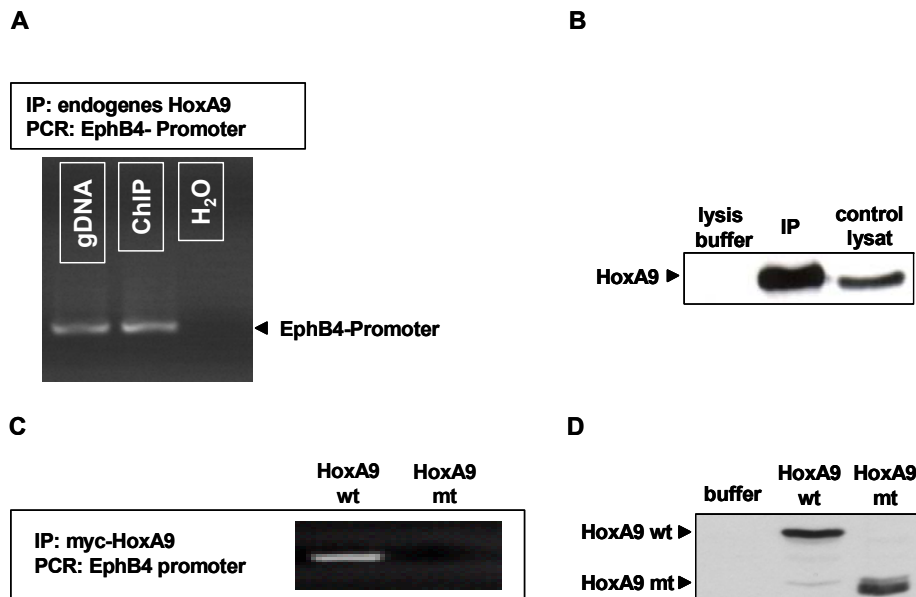


Abb. 3.21 HoxA9 bindet den EphB4-Promotor

Endogenes oder überexprimiertes HoxA9 wurde mit Antikörper gegen HoxA9 oder c-myc präzipitiert, die mit dem Protein verbundene DNA aufgereinigt und in einer PCR analysiert. **(A + C)** Repräsentatives Bild der EphB4-PCR nach ChIP gegen endogenes und überexprimiertes HoxA9. **(B + D)** Repräsentativer Westernblot zur Kontrolle der Immunpräzipitation gegen endogenes sowie überexprimiertes HoxA9.

Eine transkriptionelle Kontrolle beinhaltet neben der Bindung auch die Transaktivierung des entsprechenden Promotors. Um die Transaktivierung des EphB4-Promotors durch HoxA9 zu überprüfen, wurde ein Luciferase-Reportergen-Assay durchgeführt. Dabei wurde der EphB4-Promotor (-1017 / +484 bp) vor ein Luciferase-Gen kloniert, und zusammen mit einem HoxA9-Plasmid transfiziert. Bei einer Transaktivierung kommt es dann zu einer erhöhten Expression der Luciferase, deren Aktivierung in einem Luminometer nachgewiesen werden kann. Als Kontrolle wurde die HoxA9-Mutante verwendet. Die Auswertung von fünf unabhängigen Experimenten ergab einen signifikanten Anstieg der Luciferase-Aktivität über das Basalniveau bei gleichzeitiger Expression von HoxA9 um mehr

Ergebnisse

als 2000 %. Im Gegensatz dazu, gab es keine Transaktivierung des EphB4-Promotors durch die HoxA9-Mutante (Abb. 3.22).

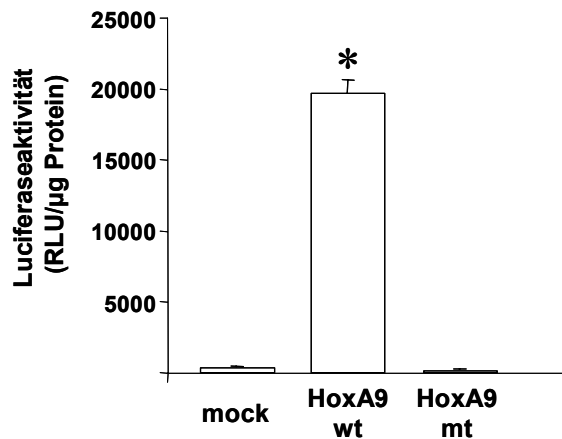


Abb. 3.22 Transaktivierung des EphB4-Promotors durch HoxA9

HUVEC wurden mit einem EphB4-Reporter-Gen-Plasmid und HoxA9 wt oder HoxA9 mt co-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und in einem Reporter-Gen-Assay in einem Luminometer analysiert.

Um zusätzlich die Bindungsstellen von HoxA9 im EphB4-Promotor zu untersuchen, wurde der Promotor auf potentielle Bindungssequenzen hin untersucht. Dabei wurde vor allem nach Hox-spezifischen Bindungsmotiven mit den Sequenzen TATT und TAAT gesucht (Shi et al., 2001). Der EphB4-Promotor zeigte im untersuchten Bereich drei verschiedene, auf dieses Muster zutreffende Domänen. Diese wurden anschließend mittels eines kommerziell erhältlichen Mutationskits mutiert. Zusätzlich wurde eine verkürzte Version des EphB4-Promotors, ohne die beiden distalen Bindungssequenzen, kloniert (Abb. 3.23).

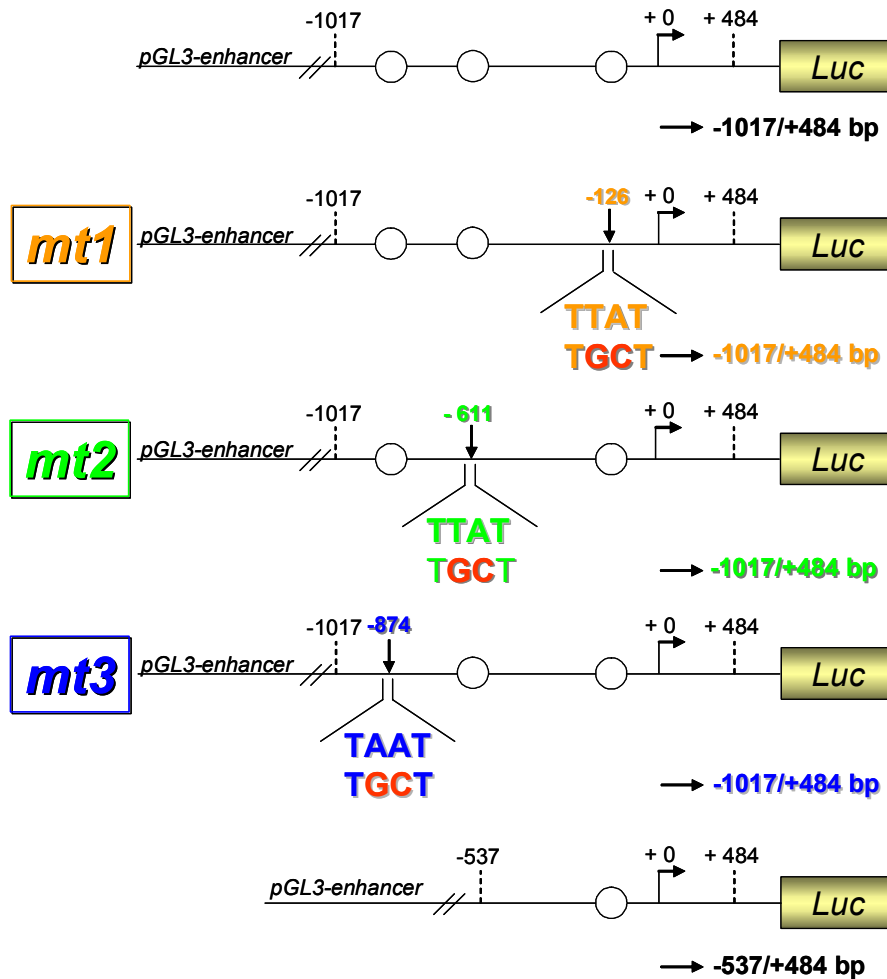


Abb. 3.23 Verwendete EphB4-Promotor-Luciferase-Plasmide

Drei potentielle HoxA9-Bindungssequenzen im EphB4-Promotor wurden an den beschriebenen Stellen mutiert. Zusätzlich wurde eine verkürzte Version (-537/+484bp) des EphB4-Promotors kloniert, die nur noch eine potentielle Bindungsstelle an Position -126 bp besaß.

Die Mutationen im EphB4-Promotor an Position -126 bp (*mt1*) sowie -611 bp (*mt2*) führten zu einer signifikanten Reduktion der Transaktivierung auf 30 % der Aktivität des Wildtyp-Promotors. In den gleichen Testreihen führte die Co-Transfektion von HoxA9 mit dem nicht-mutierten EphB4 zu einer Aktivierung von 1446 ± 116 % der Kontrolle. Die Aktivität des Vektors mit der Mutation an Position -874 bp des EphB4-Promotors dagegen führte zu einer vollständigen Hemmung der Luciferase-Aktivität unter das Basalniveau der Kontrolle (Abb. 3.24). Um die essentielle Bedeutung der Bindungsstelle an Position -874 bp zu überprüfen, wurde zusätzlich eine verkürzte Version (-537/+484 bp) des EphB4-Promotors kloniert.

Ergebnisse

Die Aktivität der Luciferase unter der Kontrolle dieser Version des EphB4-Promotors betrug nur noch 228 ± 43 % der Kontrolle, was die Bedeutung der Bindungssequenz bei -874 bp bestätigt (Abb. 3.24).

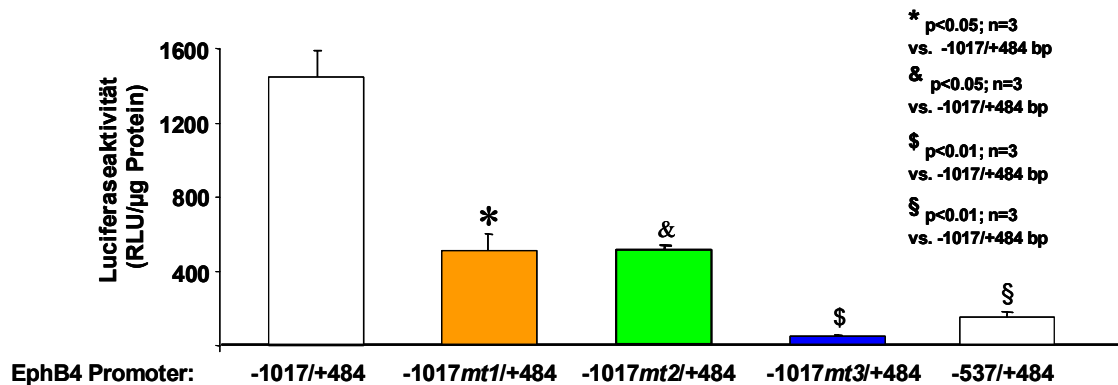


Abb. 3.24 HoxA9 transaktiviert den EphB4-Promotor an drei verschiedenen Bindungsstellen an den Positionen -126 bp, -611 bp und -874 bp

HUVEC wurden mit verschiedenen Reporter-Gen-Plasmiden unter der Kontrolle des EphB4-Promotors und HoxA9 co-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und in einem Reporter-Gen-Assay in einem Luminometer analysiert.

Diese Daten zeigen eine essentielle Bedeutung von HoxA9 für die transkriptionelle Kontrolle des EphB4-Rezeptors.

EphB4 ist von wesentlicher Bedeutung für die endotheliale Migration und Gefäßstrukturbildung

Um einen kausalen Zusammenhang zwischen der funktionalen Integrität von Endothelzellen nach HoxA9-Verlust und der damit einhergehenden Reduktion der EphB4-Expression herzustellen, war es notwendig zu zeigen, dass auch EphB4 bei der Regulation genau dieser Endothelzellfunktionen eine Rolle spielt.

Für die Untersuchungen der Rolle von EphB4 auf die Migration und die Gefäßstrukturbildung im Matrigel wurden HUVEC mit einer siRNA gegen EphB4 transfiziert. Die daraus folgende Reduktion der EphB4-Expression wurde mittels Westernblot analysiert. Als Gleichladungskontrolle wurde Tubulin verwendet. Die

Ergebnisse

Expression von EphB4 reduzierte sich nach RNAi signifikant auf 27 ± 10 % der scrambled-transfizierten Kontrolle (Abb. 3.25).

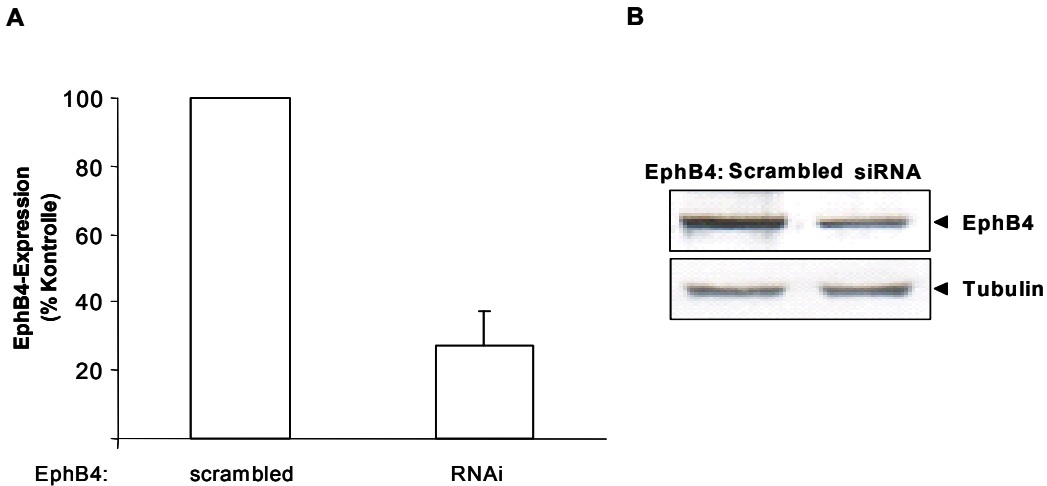


Abb. 3.25 Überprüfung und Analyse einer EphB4 - spezifischen siRNA

HUVEC wurden mit scrambled- und EphB4-siRNA transfiziert und die EphB4-Expression im Westernblot analysiert. **(B)** Repräsentativer Westernblot der EphB4-Expression nach Transfektion mit siRNA gegen EphB4.

Im Anschluss an die erfolgreiche Überprüfung der Spezifität der siRNA gegen EphB4 wurde diese zur Analyse des Einflusses von EphB4 auf die Migration sowie die *in vitro* - Gefäßstrukturbildung im Matrigel eingesetzt. Die Reduktion der EphB4-Expression in Endothelzellen zeigte den gleichen Phänotyp, wie die Hemmung von HoxA9. So wurde die Migration wie auch die Gefäßstrukturbildung signifikant nach EphB4-RNAi gehemmt (Abb. 3.26A+D). Um zusätzlich zu überprüfen, ob durch die siRNA gegen EphB4 wirklich spezifisch der EphB4-Rezeptor betroffen war, wurde die Migration der Zellen mit dem EphB4-Liganden EphrinB2 stimuliert. Diese Migrationsversuche wurden in EBM-Basalmedium mit einem Zusatz von 1 % BSA durchgeführt. EphrinB2 führte basal zu einer Induktion der Endothelzellmigration von 180 ± 16 % der nicht stimulierten Kontrolle (Abb. 3.26B). Nach Behandlung mit siRNA gegen EphB4 fiel diese Steigerung signifikant geringer aus (111 ± 4 % der nicht stimulierten Kontrolle), was die Spezifität der EphB4-siRNA und den spezifischen Einfluss von EphB4 auf die Migration von Endothelzellen zeigt (Abb. 3.26C).

Ergebnisse

Auch bei der Gefäßstrukturbildung im Matrigel führte der Verlust des EphB4-Rezeptors zu einer reduzierten Strukturbildung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.26D).

Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich einen starken Einfluss von EphB4 auf die endotheliale Migration sowie auf die Fähigkeit von Endothelzellen im Matrigel gefäßartige Strukturen zu bilden.

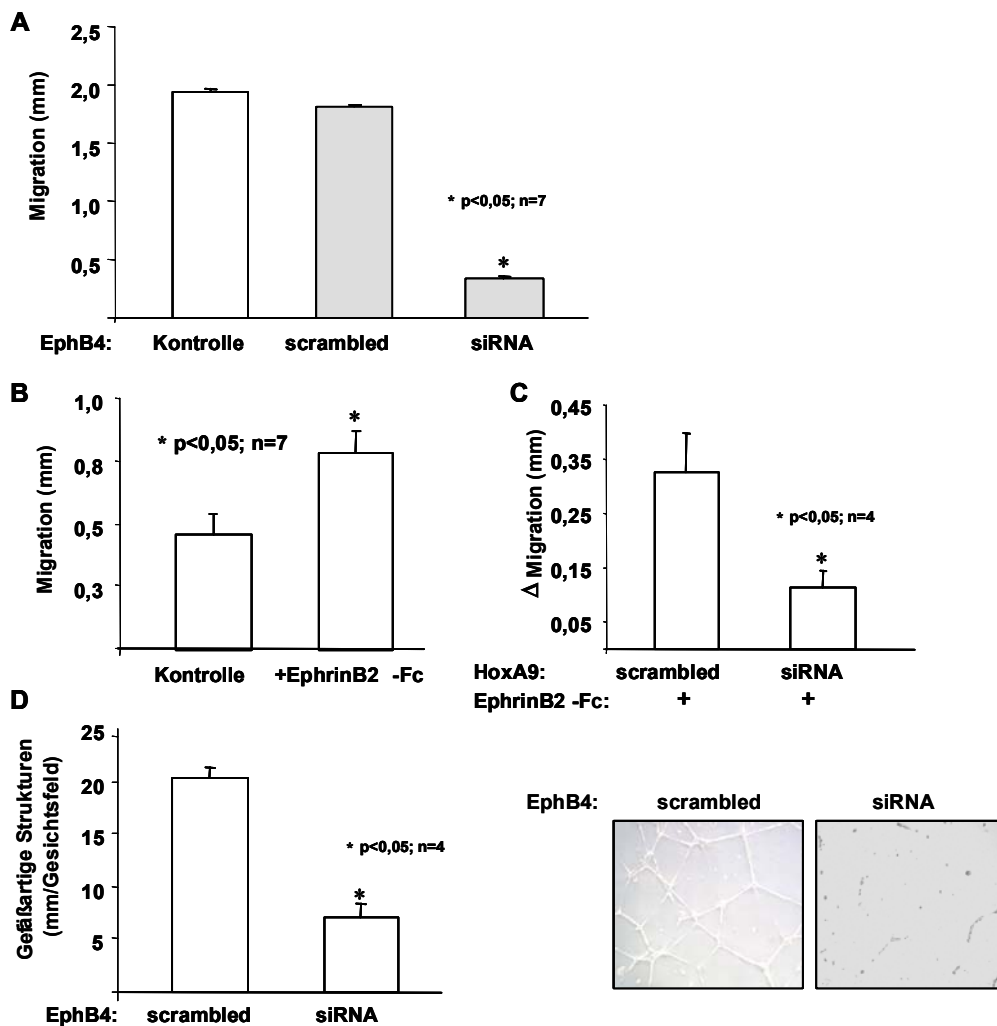


Abb. 3.26 EphB4 reguliert die endotheliale Migration und Gefäßstrukturbildung

HUVEC wurden mit EphB4- und scrambled - siRNA transfiziert und für 24 h kultiviert. **(A)** Quantitative Analyse der Migration im „scratched wound“-Assay **(B)** Induktion der Migration von HUVEC mit und ohne Stimulation durch EphrinB2-Fc. **(C)** Induktion der Migration durch EphrinB2 nach EphB4-siRNA **(D)** Quantitative Analyse (links) und repräsentative Darstellung der Gefäßstrukturbildung im Matrigel.

Ergebnisse

Die Hemmung der HoxA9-Expression führt zu einem vergleichbaren Funktionsverlust wie der Verlust von EphB4. Zusätzlich wird die EphB4-Proteinexpression von HoxA9 reguliert. Basierend auf diesen Befunden, stellte sich die Frage, ob die endotheliale Migration über die HoxA9-abhängige Kontrolle der EphB4-Expression reguliert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden HUVEC mit siRNA gegen EphB4 behandelt und für 24 h kultiviert. Nach dieser Inkubationszeit wurden diese Zellen zusätzlich mit einem HoxA9 wt - Plasmid transfiziert und die Migration nach 48 h in einem „scratched wound“ - Assay analysiert. HoxA9-Überexpression war nicht mehr in der Lage, die durch die Hemmung von EphB4 reduzierte Migration zu verbessern (Abb. 3.27). Diese Daten zeigen, dass die Kontrolle der Migration durch HoxA9 über die Regulation der EphB4-Expression läuft, und dass der EphB4-Rezeptor essentiell für eine funktionierende endotheliale Migration ist.

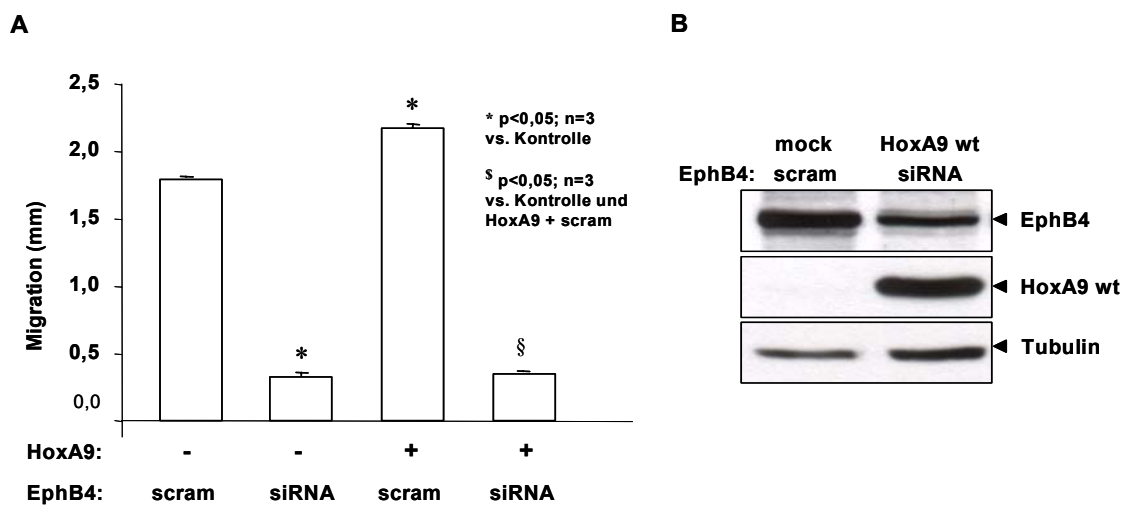


Abb. 3.27 EphB4 ist essentiell für die endotheliale Migration

(A) HUVEC wurden mit EphB4-siRNA sowie mit HoxA9 wt transfiziert und kultiviert. Nach 40 h wurde die Migration analysiert. (B) Repräsentativer Westernblot nach 48 h Kultivierung, der die erfolgreiche HoxA9-Überexpression bei gleichzeitiger Hemmung der EphB4-Expression zeigt.

3.5.2 Das Integrin $\alpha_v\beta_3$

Für verschiedene Integrine und ihre Liganden konnte eine Rolle in der Angiogenese nachgewiesen werden. Eine herausragende Stellung nehmen dabei

Ergebnisse

die Integrine $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$ ein. So zeigen Mäuse denen das α_5 - oder β_1 -Integrin oder der Ligand des Integrins $\alpha_5\beta_1$, das Fibronektin fehlt schwerste vaskuläre Störungen während der Embryonalentwicklung (George et al., 1993; Yang et al., 1993; Fassler und Meyer, 1995; Stephens et al., 1995). Zusätzlich zeigen verschiedene Arbeiten, dass Integrine durch Hox-Proteine reguliert werden (Boudreau et al., 1997; Zhong et al., 2003). Daher wurde die Bedeutung von HoxA9 speziell für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ untersucht.

Hierfür wurden HUVEC mit HoxA9-siRNA oder HoxA9 wt transfiziert, kultiviert und anschließend die Integrin-Expression mittels Westernblot analysiert. Als Gleichladungskontrolle wurde Tubulin verwendet. Die Expression des Integrin α_v ist analog zu HoxA9 reguliert, was auf eine transkriptionelle Kontrolle des Integrins α_v durch HoxA9 schließen lässt (Abb. 3.28).

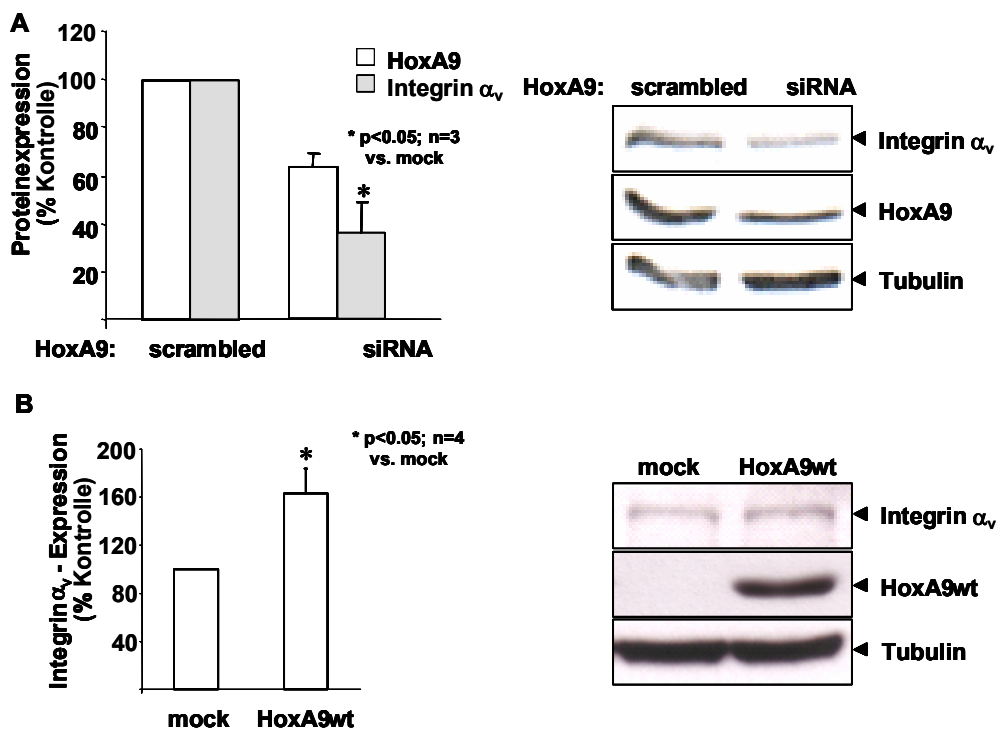


Abb. 3.28 Die Integrin α_v -Expression korreliert mit der Expression von HoxA9

HUVEC wurden mit HoxA9 wt oder siRNA gegen HoxA9 transfiziert und kultiviert. Nach 24 h (HoxA9 wt) bzw. 48 h (HoxA9-RNAi) wurde die Integrin α_v -Expression analysiert. **(A)** (Links) semiquantitative Analyse der HoxA9- und Integrin α_v -Expression nach RNAi gegen HoxA9. (Rechts): Repräsentativer Westernblot der HoxA9- und Integrin α_v -Expression nach HoxA9-RNAi. **(B)** (Links): Semiquantitative Analyse der Integrin α_v -Expression nach HoxA9-Überexpression. (Rechts) Repräsentativer Westernblot der HoxA9- und Integrin α_v -Expression nach HoxA9-Überexpression.

Ergebnisse

Um weiterhin festzustellen, ob die Regulation der Integrin α_v -Expression durch HoxA9 auf direktem oder indirektem Wege erfolgt, wurden erneut ein Reporteragen-Assay sowie eine ChIP durchgeführt. Für den Reporteragen-Assay wurde der Integrin α_v -Promotor (-3095/+266 bp) vor ein Luciferasegen kloniert. Für die ChIP wurde eine Präzipitation gegen endogenes HoxA9 durchgeführt und anschließend eine PCR gegen den Integrin α_v -Promotor mit der aufgereinigten, an HoxA9 gebundenen DNA durchgeführt. In den Untersuchungen konnte weder eine Bindung, noch eine signifikante Transaktivierung des Integrin α_v -Promotors durch HoxA9 festgestellt werden (Abb. 2.29).

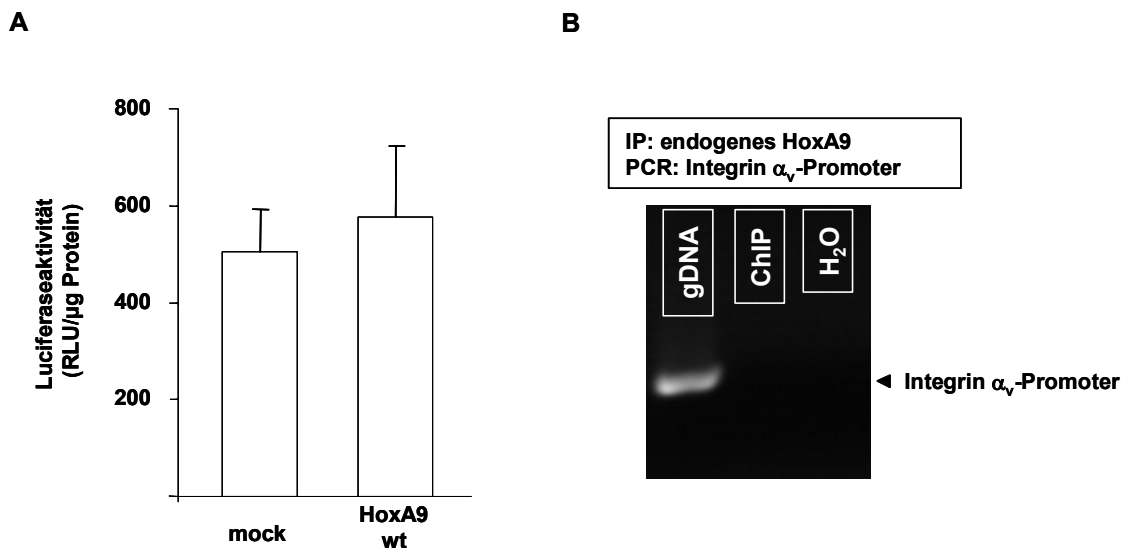


Abb. 3.29 HoxA9 bindet und transaktiviert nicht den Integrin α_v -Promotor

HUVEC wurden in einem Luciferase-Reporteragen-Assay und in einer Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) auf Bindung und Transaktivierung des Integrin α_v -Promotors durch HoxA9 untersucht. **(A)** Auswertung der Aktivität der Luciferase mit und ohne HoxA9-Überexpression. **(B)** Repräsentative Darstellung einer PCR gegen den Integrin α_v -Promotor nach einer ChIP gegen endogenes HoxA9. Genomische DNA (gDNA) und Wasser dienten als Kontrollen.

Für das β_3 -Integrins zeigte sich ein ähnliches Bild wie für das Integrin α_v . So betrug die durchschnittliche Integrin β_3 -Expression nach Transfektion mit siRNA gegen HoxA9 nur noch 55 ± 13 % der mit scrambled-siRNA transfizierten Kontrolle. Die gleichen Zellen hatten parallel dazu eine signifikant niedrigere HoxA9-Expression auf 64 ± 13 % der Kontrolle (Abb. 3.30A+B). Auch bei diesem Integrin

Ergebnisse

konnte keine Bindung des Promotors durch HoxA9 nachgewiesen werden (Abb. 3.30D). Allerdings konnte im Reporter-gen-Assay (Integrin β_3 -Promotor: -1429 / -112 bp) eine schwache aber signifikante Transaktivierung des Integrin β_3 -Promotor um 35 ± 6 % nachgewiesen werden (Abb.3.30C).

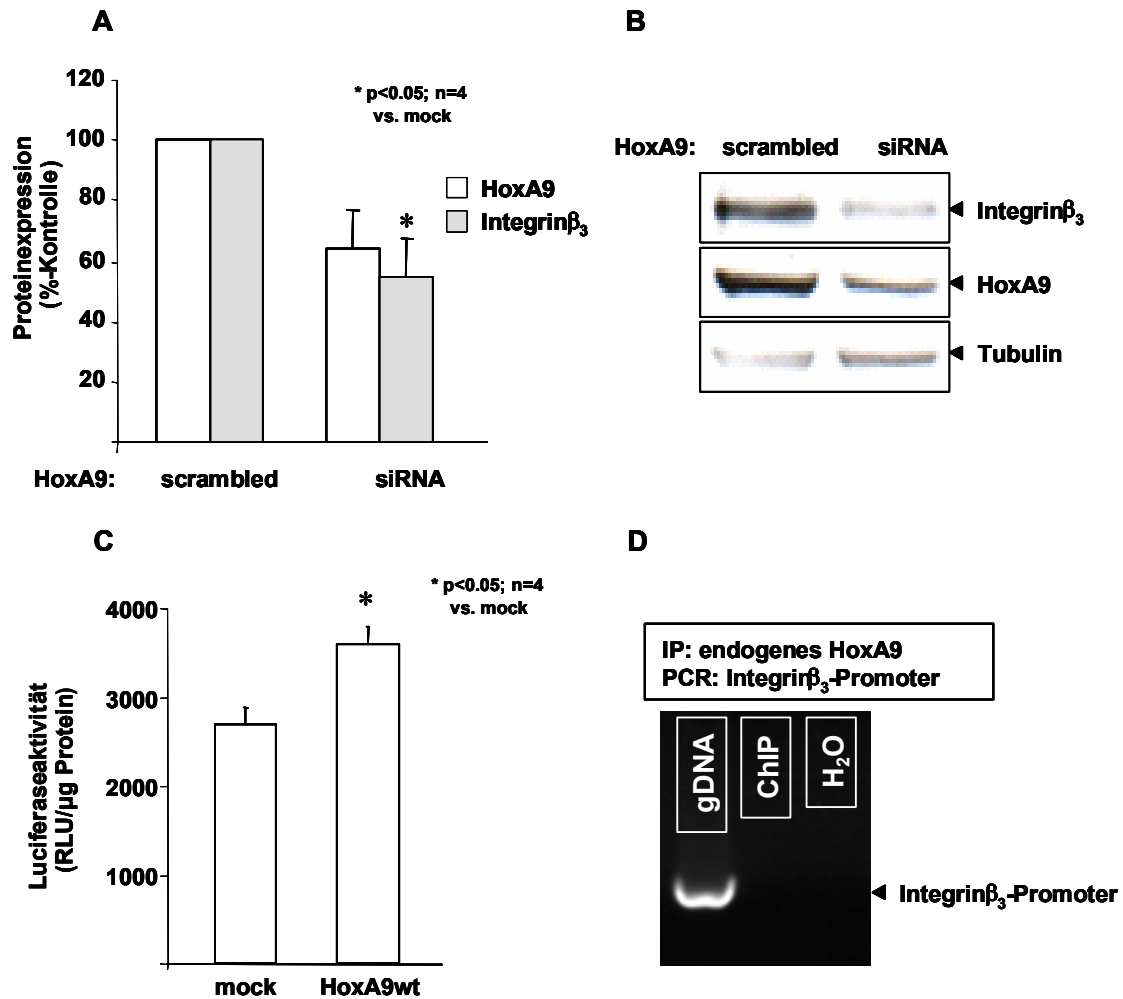


Abb. 3.30 HoxA9 reguliert die Integrin β_3 -Expression

Die Regulation des β_3 -Integrins durch HoxA9 wurde mittels Westernblot nach RNAi gegen HoxA9, Reporter-gen-Assay sowie ChIP untersucht. **(A)** Semiquantitative Analyse der HoxA9- und Integrin β_3 -Expression. **(B)** Repräsentativer Westernblot der Integrin β_3 - Expression nach Transfektion mit siRNA gegen HoxA9. **(C)** Analyse der Aktivierung des Integrin β_3 -Promotor im Luciferase-Reporter-Assay. **(D)** Repräsentative Darstellung einer PCR gegen den Integrin β_3 -Promotor nach einer ChIP gegen endogenes HoxA9

3.5.3 Die Endothelzellmarker eNOS, VEGFR-2 und VE-Cadherin

Die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS), der VEGF-Rezeptor 2 („vascular endothelial growth factor - receptor 2“) und VE-Cadherin („vascular endothelial“ - Cadherin) sind drei Gene, die in endothelialen Zellen exprimiert werden (Lampugnani et al., 1992, Jakeman et al., 1992; Peters et al., 1993; Forstermann und Kleinert, 1995). Alle drei Gene spielen eine wichtige Rolle bei der Angiogenese in allen Stadien der Entwicklung (reviewed in Yancopoulos et al., 2000, Carmeliet und Jain, 2000; Carmeliet 2000; Jain, 2003; Carmeliet 2003). Die Wichtigkeit dieser Proteine wird auch dadurch verdeutlicht, dass VEGF-R2 - und VE-Cadherin-defiziente Mäuse embryonal an vaskulären Defekten sterben (Carmeliet et al., 1999; Shalaby et al., 1995) und der Verlust der eNOS zu Störungen der postnatalen Neovaskularisierung und der Stammzellmobilisierung im Knochenmark führt (Lee et al., 1999; Fukumura et al., 2001; Aicher et al., 2004). Für die Untersuchungen einer regulatorischen Rolle von HoxA9 auf die Expression der Proteine eNOS, VEGF-R2 und VE-Cadherin wurden zuerst HUVEC mit HoxA9-siRNA transfiziert und die mRNA- sowie Proteinexpression der Endothelmarker analysiert. Als Gleichladungskontrolle im Westernblot wurde Tubulin und in der RT-PCR das Gen GAPDH verwendet. Die Hemmung der HoxA9-Expression führte zu einer deutlichen Reduktion sowohl der mRNA-Expression (Abb. 3.31A+B) wie der Proteinexpression der eNOS (Abb.3.31C), des VEGF-R2 (Abb. 3.31D), und des VE-Cadherins (Abb.3.31E). Die Expression zweier anderer, ebenfalls in Endothelzellen exprimierter, Proteine, CD31 und von Willebrand-Faktor (vWF) war nicht betroffen, was die spezifische Wirkung von HoxA9 auf die drei anderen Gene unterstreicht.

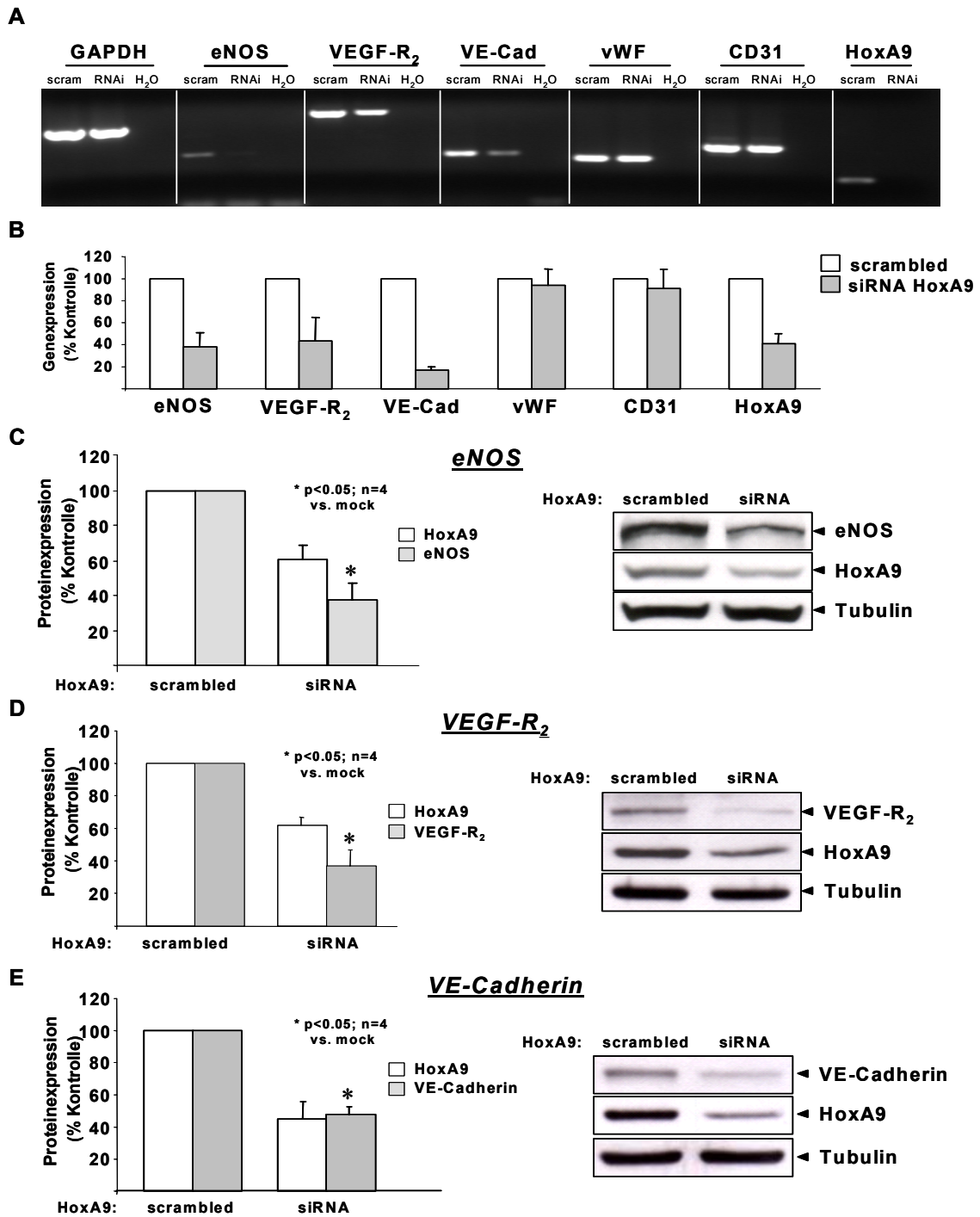


Abb. 3.31 HoxA9 reguliert die eNOS -, VEGF-R2 - und VE-Cadherin – Expression

HUVEC wurden mit siRNA gegen HoxA9 transfiziert und die mRNA- sowie die Proteinexpression analysiert. **(A)** Repräsentative Darstellung einer RT-PCR für verschiedene Endothelzellmarker. **(B)** Quantitative Analyse der mRNA-Expression endothel-typischer Gene. **(C – D)** Links: Semiquantitative Analysen der Proteinexpression für eNOS, VEGF-R2 und VE-Cadherin. Rechts: Repräsentative Westernblots der Proteinexpression von eNOS, VEGF-R2 und VE-Cadherin nach HoxA9-siRNAi.

Ergebnisse

Zur zusätzlichen Überprüfung der reduzierten eNOS-Proteinexpression wurde mittels DAF-2DA - Färbung von HoxA9-siRNA transfizierten Zellen, die Herstellung von endogenem Stickstoffmonoxid (NO) untersucht. Wie zu erwarten synthetisierten die Endothelzellen bei einer Hemmung der HoxA9-Transkription signifikant weniger NO, wodurch die reduzierte eNOS-Expression bestätigt werden konnte (Abb. 3.32).

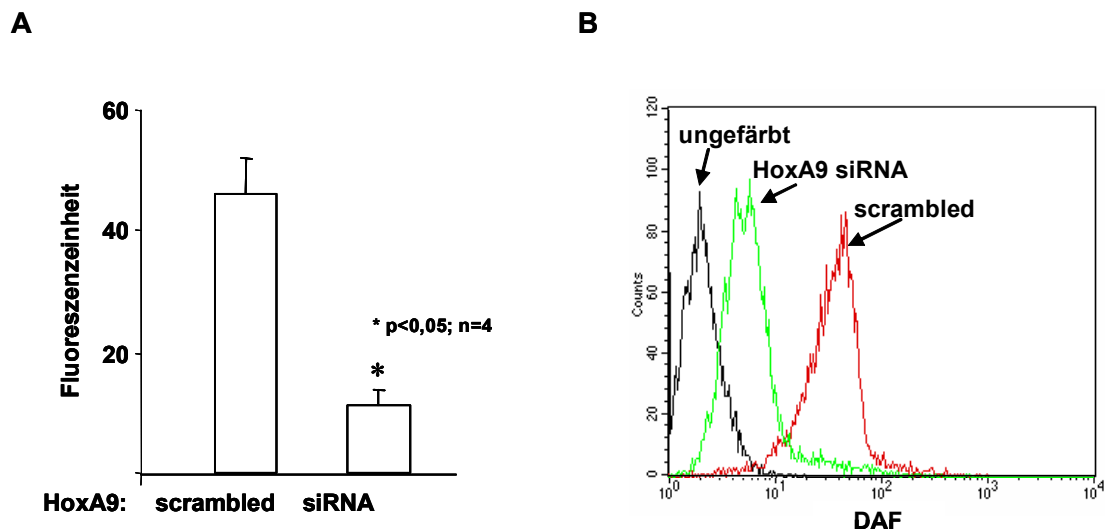


Abb. 3.32 Die Hemmung der HoxA9-Expression führt zu einer verminderten Stickstoffmonoxid-Produktion in Endothelzellen

HUVEC wurden mit siRNA gegen HoxA9 transfiziert und die NO-Produktion mittels FACS-Analyse untersucht **(A)** Quantitative Auswertung der DAF-2DA Färbung. **(B)** repräsentative Darstellung einer FACS-Analyse nach DAF-2DA – Färbung.

Konsistent mit diesen Daten zeigte sich die quantitative Analyse der mRNA-Expression von eNOS und VE-Cadherin in HoxA9-defizienten Endothelzellen, die aus HoxA9^{-/-}-Mäusen gewonnen wurden. Der Verlust von nur einem Allel des HoxA9-Gens genügte, für eine drastisch verringerte mRNA-Expression von eNOS oder VE-Cadherin (Abb. 3.33A). Auch die Gesamt-eNOS-Proteinexpression des Herzens war bei HoxA9^{-/-}-Mäusen signifikant gegenüber dem Wildtyp gehemmt (Abb. 3.33B). Ein anderes Bild zeigte sich bei der Auswertung der mRNA-Expression des VEGF-R2 in HoxA9-defizienten Mäusen. Weder bei heterozygoten, noch bei homozygoten HoxA9-Mäusen konnte ein Unterschied zum Wildtyp

Ergebnisse

festgestellt werden, was alternative Regulationsmechanismen in Tieren mit einem Genverlust von HoxA9 impliziert (Abb. 3.33A).

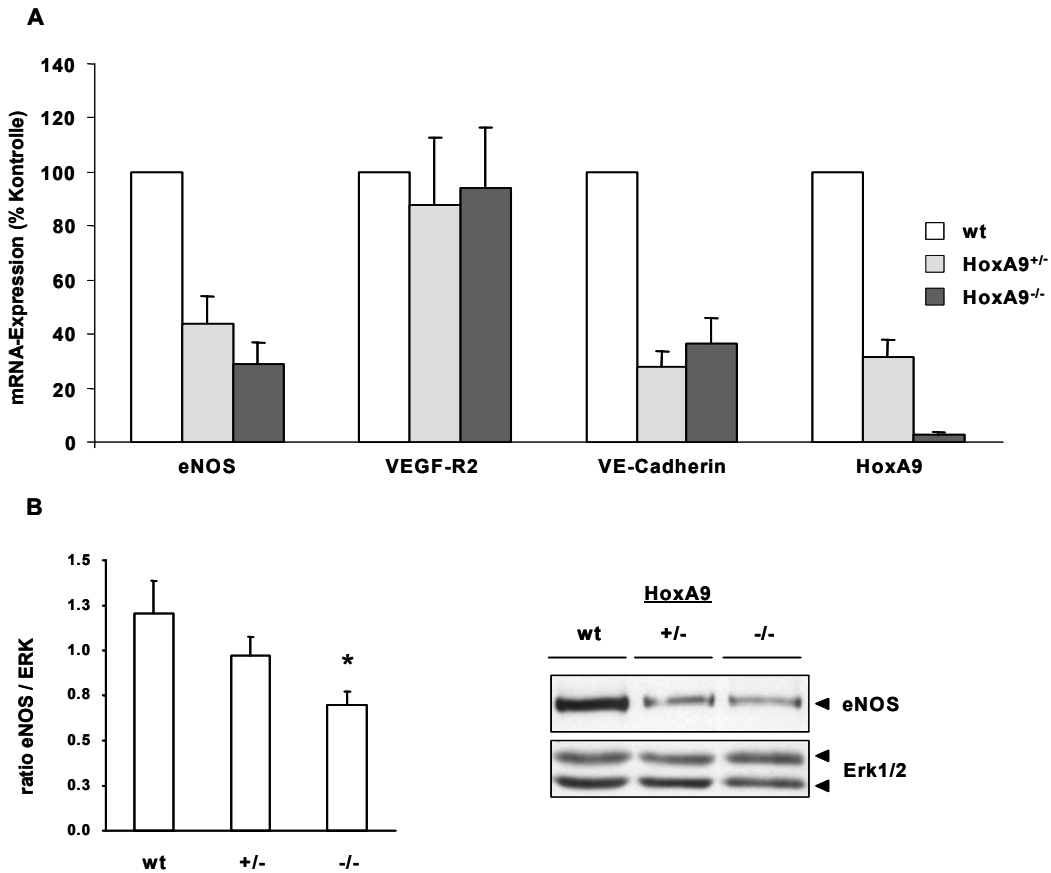


Abb. 3.33 HoxA9 reguliert die Expression von eNOS und VE-Cadherin

(A) Endothelzellen wurden in einem Outgrowth-Assay aus Aorten von Wildtyp- und HoxA9-defizienten Mäusen isoliert, kultiviert und die RNA isoliert. Die mRNA-Expression von eNOS, VEGF-R2 und VE-Cadherin wurden in einer quantitativen Analyse im Light-Cycler untersucht (B) (Links) Die Herzen von HoxA9^{+/-} und HoxA9^{-/-}-Mäusen wurden entnommen, lysiert und im Westernblot analysiert. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Carmen Urbich und Dipl.-Biol. Andrea Knau vorgenommen. (Rechts) Repräsentativer Westernblot der eNOS-Expression im Herzen HoxA9-defizienter Mäuse.

Im Anschluss an die nachgewiesene Regulation der Proteinexpression der endothelialen Markergene eNOS, VEGF-R2 und VE-Cadherin durch HoxA9, wurde die transkriptionelle Kontrolle und Bindung der verschiedenen Promotoren durch das HoxA9-Protein untersucht. Die Transaktivierung wurde erneut in einem Luciferase-Reporter-Gen-Assay, mit den jeweiligen Promotoren (VEGF-R2: -4

Ergebnisse

kb/+296 bp; eNOS: 1,6 kb - Fragment; VE-Cadherin: -2928 / +104 bp) und die Bindung an den Promotor mit einer Chromatin-Immunpräzipitation untersucht.

HoxA9 war in der Lage alle drei der hier untersuchten Promotoren signifikant zu transaktivieren (Abb. 3.34).

Eine Reihe von Mutationen, bei denen drei verschiedene TAAT-Sequenzen in TGCT-Sequenzen mutiert wurden, führte zu keiner Veränderung der Luciferase-Aktivität (nicht gezeigt).

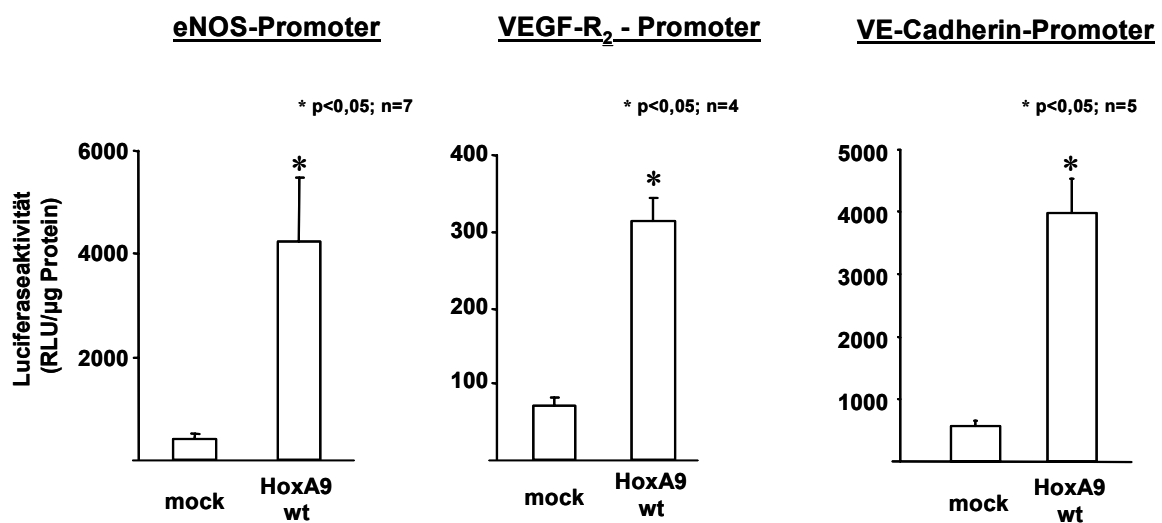


Abb. 3.34 HoxA9 transaktiviert die Promotoren der Gene eNOS, VEGF-R2 und VE-Cadherin

HUVEC wurden in einem Luciferase-Reportergen-Assay auf die Transaktivierung der Promotoren von eNOS, VEGF-R2 und VE-Cadherin hin untersucht.

Über die Transaktivierung durch HoxA9 hinaus konnte für die Promotoren von eNOS- und VEGF-R2 eine Bindung von HoxA9 nachgewiesen werden. Dies galt sowohl für das endogene wie für das überexprimierte Protein. Im Gegensatz dazu zeigte HoxA9 keine Bindung an den Promotor von VE-Cadherin (Abb.3.35).

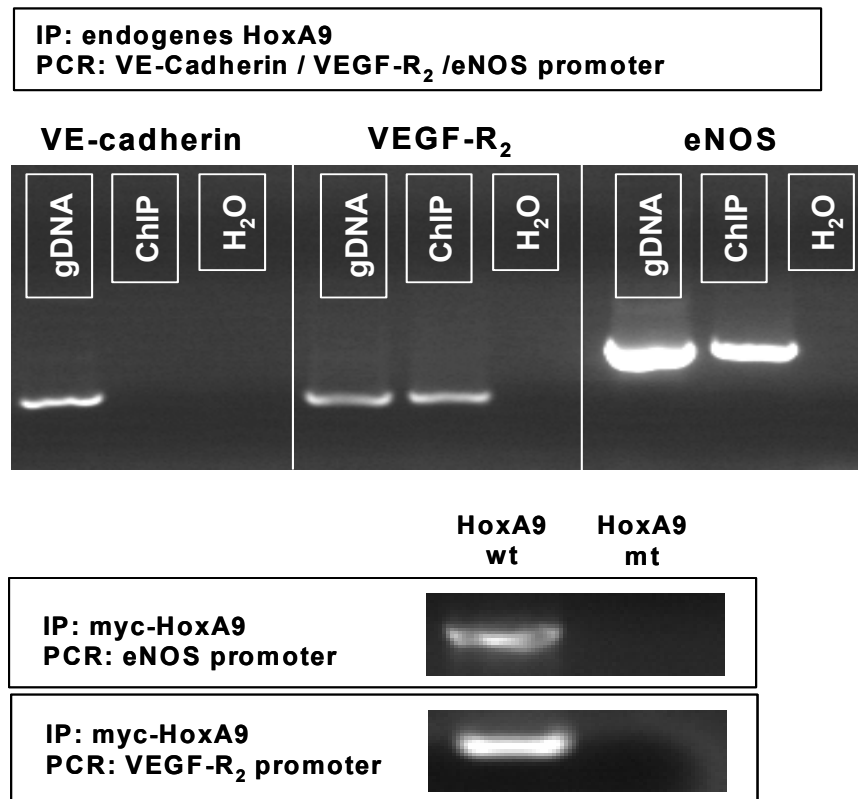


Abb. 3.35 HoxA9 bindet die Promotoren der Gene eNOS und VEGF-R2, jedoch nicht den VE-Cadherin-Promotor

Endogenes oder überexprimiertes HoxA9 wurde mit Antikörper gegen HoxA9 oder c-myc präzipitiert, die mit dem Protein verbundene DNA aufgereinigt und in einer PCR analysiert. **(A)** Repräsentatives Bild der verschiedenen PCRs gegen die Promotoren von eNOS, VEGF-R2 und VE-Cadherin einer Chromatin-Immunopräzipitation gegen endogenes HoxA9. **(B)** Repräsentatives Bild der ChIP gegen überexprimiertes HoxA9.

3.6 Die Bedeutung von HoxA9 für die Schubspannungs-induzierte Expression von eNOS, VEGF-R2 und VE-Cadherin

Einer der wichtigsten endogenen atheroprotektiven Faktoren im kardiovaskulären System ist die laminare Schubspannung des fließenden Blutes. Laminare Schubspannung ist zudem absolut erforderlich für ein intaktes funktionierendes Endothel. Zur Überprüfung, ob die transkriptionelle Kontrolle von endothelialen Genen, wie eNOS, VEGF-R2 oder VE-Cadherin, in einem direkten Zusammenhang mit dem Einfluss der laminaren Schubspannung auf die

Ergebnisse

Expression dieser Gene steht. Dazu wurden HUVEC einer laminaren Schubspannung ausgesetzt und anschließend die HoxA9-Proteinexpression im Westernblot analysiert. Die HoxA9-Expression war, gegenüber der statischen Kontrolle, mit zunehmender Zeitdauer signifikant erhöht. Im gleichen Zeitrahmen erhöhte sich, etwas zeitversetzt, auch die eNOS-Expression signifikant (Abb. 3.37 A+B). Daraus leitete sich die Hypothese ab, dass die Schubspannungs - regulierte Genexpression endothelialer Gene von HoxA9 abhängig ist. Deshalb wurden aus Schubspannungs-stimulierten HUVEC die Gesamt-RNA isoliert und mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert. Die Untersuchungen ergaben, dass HoxA9 essentiell für eine Expression der endothelialen Gene eNOS, VEGF-R2 und VE-Cadherin ist und zwar unabhängig von der An- oder Abwesenheit einer laminaren Schubspannung. CD31 und vWF, zwei weitere Endothel-typische Gene, wurden weder durch HoxA9 noch durch laminare Schubspannung beeinflusst, was die spezifische Rolle von HoxA9 für die drei anderen beschriebenen endothelialen Gene aufzeigt (Abb. 3.37C+D).

Versuche mit laminarer Schubspannung bei denen die Migration von Endothelzellen untersucht worden ist, zeigten ebenfalls eine fehlende Antwort der HoxA9-siRNA transfizierten Zellen auf die laminare Schubspannung (Abb.3.36).

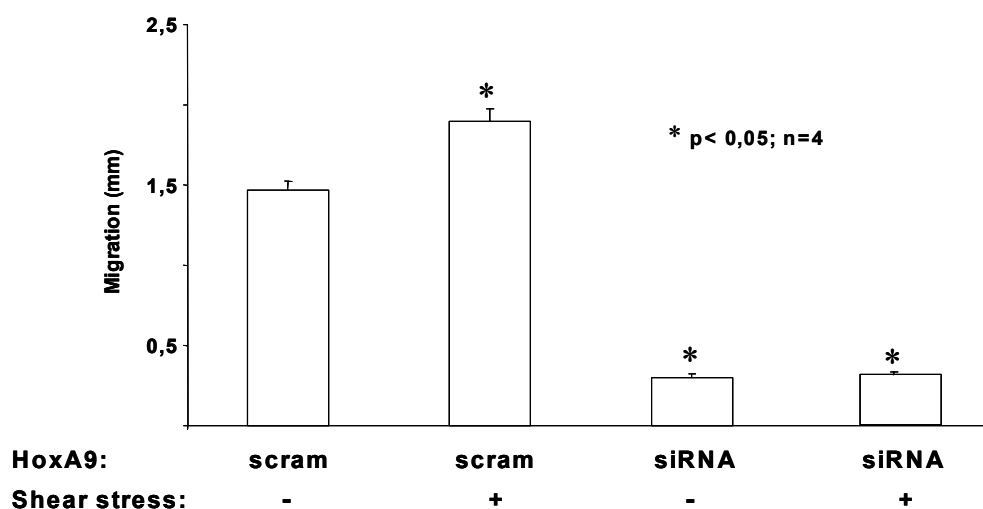


Abb. 3.36 HoxA9 ist essentiell für die Schubspannungs-induzierte Migration von Endothelzellen

HUVEC wurden mit 15 dyne/cm² laminarer Schubspannung stimuliert und die Migration nach 24 h analysiert.

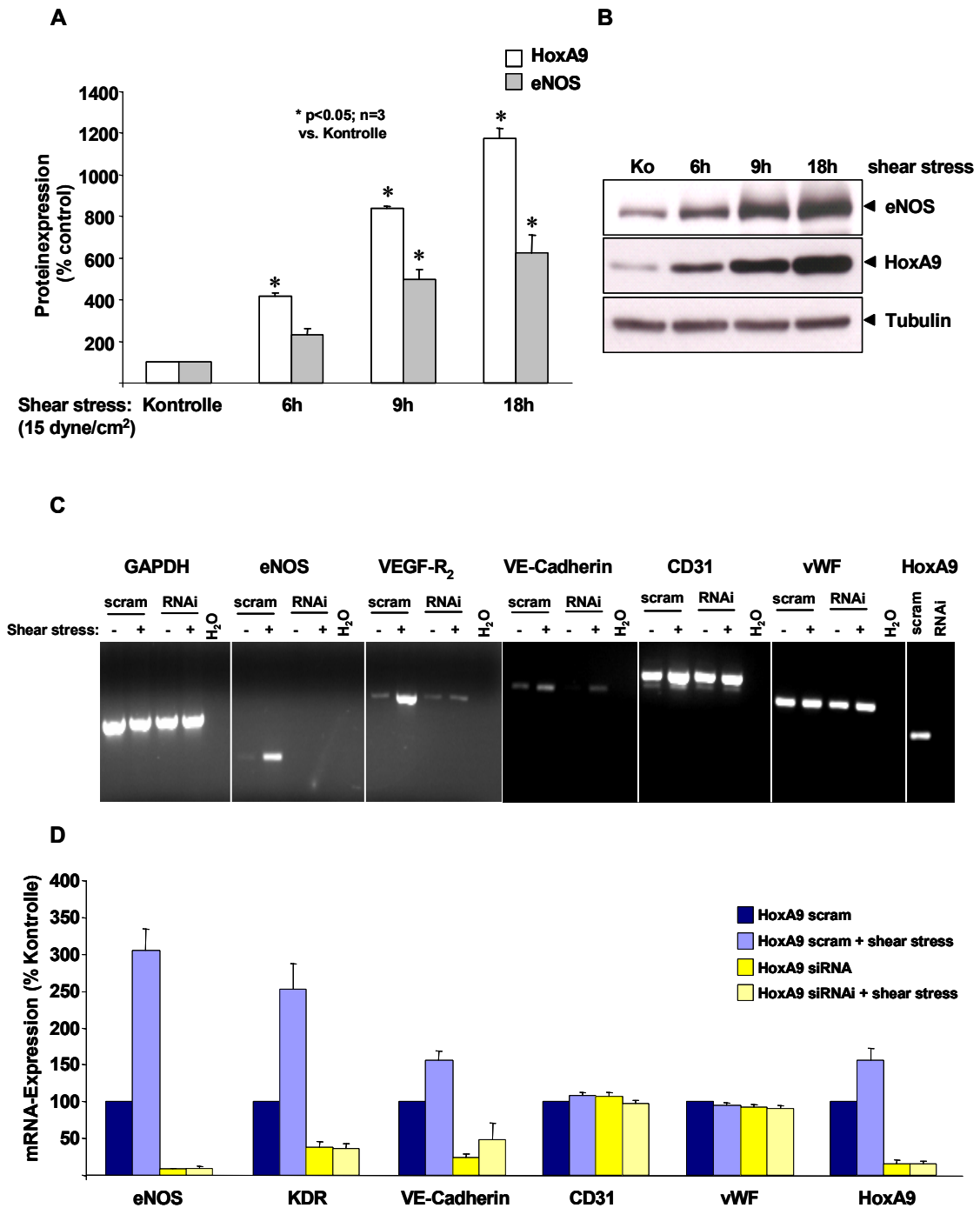


Abb. 3.36 HoxA9 ist essentiell für die Schubspannungs-induzierte Expression der endothelialen Gene eNOS, VEGFR-R2 und VE-Cadherin

HUVEC wurden mit 15 dyne/ cm² laminarer Schubspannung stimuliert und anschließend die Expression verschiedener endothelialer Gene analysiert. **(A)** Semiquantitative Analyse der HoxA9- und eNOS-Expression nach Stimulation mit laminarer Schubspannung **(B)** Repräsentativer Westernblot der HoxA9 und eNOS-Expression nach Stimulation mit laminarer Schubspannung **(C)** Repräsentatives Agarosegel einer RT-PCR gegen HoxA9 und verschiedene endotheliale Gene **(D)** Semiquantitative Analyse der mRNA-Expression nach Stimulation mit laminarer Schubspannung.

4. Diskussion

Homeobox-Transkriptionsfaktoren sind an der Entwicklung und Erhaltung des kardiovaskulären Systems während der Embryonalentwicklung, aber auch im adulten Organismus beteiligt. Die in dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungen zeigen eine essentielle Rolle von HoxA9 für die postnatale Neovaskularisierung, die Funktion von Endothelzellen und endothelialen Progenitorzellen sowie die transkriptionelle Kontrolle typischer endothelialer Gene.

4.1 Funktionen von HoxA9

Ein zentraler Befund dieser Arbeit sind die Auswirkungen und Funktionen einer HoxA9-Defizienz. So zeigen HoxA9-defiziente Mäuse *in vivo* eine dramatisch verschlechterte Neovaskularisierung nach Hinterlaufischämie. Dieses Ergebnis zeigt die Bedeutung von HoxA9 für die Regulation der postnatalen Angiogenese und Vaskulogenese. Verschiedene Faktoren können für eine gestörte Angiogenese oder Vaskulogenese verantwortlich sein.

Die Analysen der möglichen Ursachen einer gestörten Angiogenese ergaben, dass die Gefäßstrukturbildung maturer Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* gestört sowie die Migration von maturaen Endothelzellen in HoxA9^{-/-}-Mäusen und nach HoxA9-RNAi-Behandlung deutlich verschlechtert war. Im Gegensatz dazu konnte kein Einfluss von HoxA9 auf die Apoptose oder Proliferation nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten Untersuchungen auch eine wesentliche Bedeutung von HoxA9 in der Schubspannungs-regulierten Genexpression. So führte die Simulation des Blutflusses zu einer gleichsinnigen Hochregulation von HoxA9 und der endothelialen NO-Synthase. Die Hochregulation der eNOS und weiterer endothelialer Gene sowie die Schubspannungs-vermittelte Stimulation der Migration konnte durch Behandlung mit HoxA9-siRNA signifikant reduziert werden. Diese fehlende Antwort der Zellen auf die Behandlung mit laminarer Schubspannung bestätigt die essentielle Bedeutung von HoxA9 für das Endothel.

Bezüglich der Regulation der Vaskulogenese zeigten die Untersuchungen, dass die Differenzierung zu Vorläuferzellen durch HoxA9 reguliert ist und dass diese Vorläuferzellen in Bezug auf ihre klonale Expansionsfähigkeit und Integration in Gefäßstrukturen maturer Endothelzellen funktionell stark eingeschränkt waren. Zusätzlich zeigten erste Untersuchungen der embryonalen Vaskularisierung in vivo Einschränkungen der Allantoisbildung von HoxA9-defizienten Mäusen (Abb. 4.1).

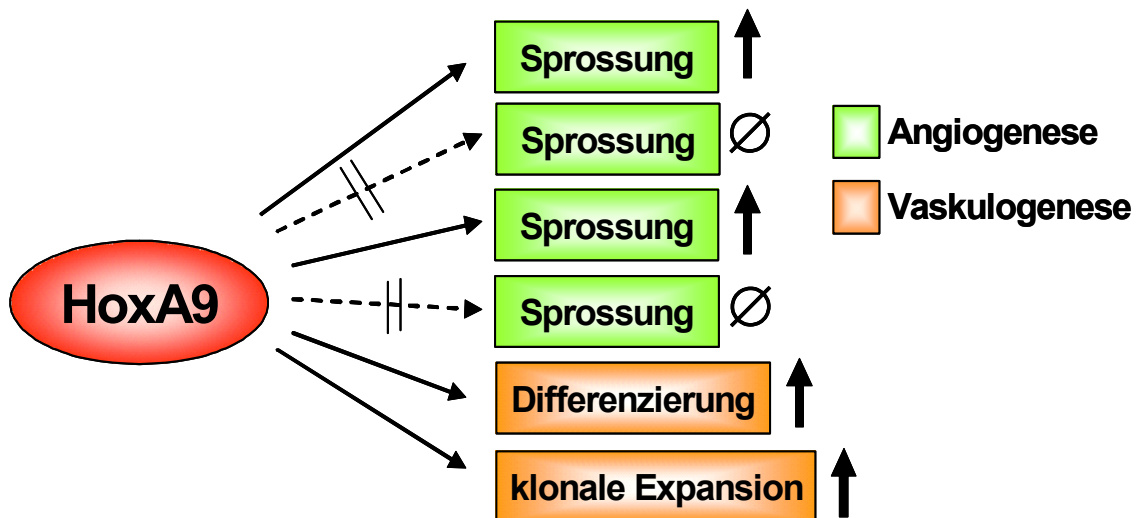


Abb. 4.1 Einfluss von HoxA9 auf verschiedene Funktionen von Vorläufer- und Endothelzellen

4.2 Zielgene von HoxA9

Ein zweiter zentraler Befund dieser Arbeit ist die Regulation verschiedener endothelialer Gene durch HoxA9. So konnte hier gezeigt werden, dass die Expression des **EphB4-Rezeptors** von HoxA9 abhängig ist. Durch den Nachweis der Bindung und Transaktivierung des EphB4-Rezeptors durch HoxA9, konnte eine direkte transkriptionelle Kontrolle bewiesen werden (Tab. 4.1). Zusätzlich war es möglich eine für die Bindung und Aktivierung des EphB4-Promotors durch HoxA9 entscheidende Bindungssequenz zu identifizieren.

Gene die hauptsächlich oder ausschließlich von einem bestimmten Zelltyp exprimiert werden und die Funktion dieser Zellen in entscheidender Weise regulieren, werden als Markergene bezeichnet. Die **endotheliale Stickstoff-**

monoxidsynthase (eNOS), der **VEGF-Rezeptor 2** („vascular endothelial growth factor“) und **VE-Cadherin** („vascular endothelial“ - Cadherin) sind drei Gene, die als solche Markergene für Endothelzellen gelten. Alle drei endothelialen Markergene zeigten in den unterschiedlichsten in vivo- und in vitro- Studien im embryonalen oder adulten Organismus eine wichtige Bedeutung für die Funktion von Endothelzellen und sind auch für die postnatale Angiogenese von Bedeutung. Alle drei Gene konnten im Rahmen dieser Arbeit als Zielgene von HoxA9 identifiziert werden. Die Regulation betraf die mRNA-Synthese aller drei Gene, was auf eine transkriptionelle Kontrolle schließen lässt. Für den VEGF-Rezeptor 2 und die eNOS konnte im Rahmen einer ChIP und eines Reporteragen-Assays auch eine direkte Bindung und Transaktivierung der Promotoren durch HoxA9 nachgewiesen werden. Die Identifizierung einer essentiellen Bindungssequenz im eNOS-Promotor ist nicht gelungen. Die Ursache dafür kann verschiedene Gründe haben. So ist nicht bekannt, ob vielleicht mehrere Bindungsstellen gleichzeitig oder sequentiell für eine Regulation des eNOS-Promotors verantwortlich sind. Weiterhin sind nicht alle bekannten potentiellen Sequenzen untersucht wurden, da im untersuchten Bereich des eNOS-Promotors nur drei Sequenzen mutiert worden sind, jedoch mehr als 20 mögliche HoxA9-Bindungsstellen vorhanden sind. Ein weiterer Punkt ist sicherlich, die Möglichkeit einer alternativen Sequenz, die ebenfalls für HoxA9 eine Bindungsstelle darstellen könnte, jedoch noch nicht bekannt ist. Gerade die letzte Möglichkeit sollte in zukünftigen Analysen in Endothelzellen beachtet werden, da die bisherigen Sequenzen fast ausschließlich in hämatopoetischen Zellen untersucht worden sind und in verschiedenen Zelltypen häufig andere Kofaktoren zum Einsatz kommen, die möglicherweise die Bindung des untersuchten Proteins verändern.

Die Regulation des VE-Cadherin-Promotor scheint, im Gegensatz zur Regulation der eNOS oder des VEGF-R2, jedoch unabhängig von einer direkten Bindung des Promotors durch HoxA9, also sekundär, zu erfolgen.

An diesem Punkt muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die für den Nachweis der Bindung und Transaktivierung verwendeten Methoden eine Reihe von Limitationen haben. So bedeutet die Detektion eines Promotors in einer ChIP zwar den Nachweis einer direkten Bindung, jedoch ist der Umkehrschluss nicht

möglich, da sich immer nur ein kurzes Teilstück des Promotors detektieren lässt (ca. 500 bp). Das heißt die Bindung kann jederzeit auch außerhalb des detektierten Bereiches liegen und die ChIP ein falsch-negatives Ergebnis liefern. Weiterhin sind auch viele verschiedene Promotoren bekannt bei denen sich regulatorische Elemente in einem Intron oder auch Exon des jeweiligen Gens befinden und nicht im eigentlichen Promotor. Ein solches Gen mit Elementen im Intron ist beispielsweise die NO-Synthase. Auch beim Luciferase-Assay gibt es, aufgrund des artifiziellen Systems, große Einschränkungen. So bedeutet die Tatsache, dass nur ein Teilstück eines Promotors verwendet wird, dass erheblich in die Regulation des zu untersuchenden Gens eingegriffen wird. Durch Verkürzen des Promotors, können verschiedene Elemente wie Enhancer und Silencer oder Bindungsstellen für Aktivatoren oder Repressoren und ähnliches abgeschnitten sein. Auch die schon oben erwähnten regulatorischen Elemente innerhalb eines Gens werden selten erfasst. Zusätzlich bedeutet die Überexpression eines Proteins, in diesem Fall HoxA9, immer einen massiven und artifiziellen Eingriff in die Regulation der gesamten Zelle. Das heißt die Aktivierung oder Nicht-Aktivierung im Luciferase-Assay ist immer nur als ein Hinweis von vielen für eine Regulation eines bestimmten Promotors durch ein anderes Protein anzusehen.

Für die endotheliale NO-Synthase und VE-Cadherin konnte eine Regulation auch *in vivo* nachgewiesen werden. Endothelzellen von HoxA9-defizienten Endothelzellen zeigten eine deutlich verringerte mRNA-Expression von eNOS und VE-Cadherin im Vergleich zum Wildtyp. Im Falle der eNOS konnte auch der Nachweis einer erniedrigten Protein-Expression geführt werden. Etwas anders gestaltet sich das Bild beim VEGF-R2. Dort zeigte die mRNA-Expression des VEGF-R2 in Endothelzellen *in vivo* keinen Unterschied zwischen Wildtyp und HoxA9-Knockout. Ein Erklärungsmodell für diese Diskrepanz von *in-vivo*- zu *in-vitro*-Modell besteht darin, dass bei einem Knockout von HoxA9 langfristig andere redundante Signalwege zur Verfügung stehen könnten, die die Regulation des VEGF-R2 übernehmen. Dass solche gleichwertigen Kontrollmechanismen existieren müssen, belegt die Tatsache, dass HoxA9-defiziente Mäuse, im Gegensatz zu VEGF-R2 - defizienten Mäusen, keinen letalen Phänotyp aufweisen. Bei einem kurzfristigen Verlust von HoxA9, müssen solche redundanten Mechanismen

akut nicht unbedingt zur Verfügung stehen. Dies könnte den Unterschied zwischen den in vitro- und in vivo-Untersuchungen erklären.

Für ein weiteres Zielgen von HoxA9, das **Integrin α_v** , konnte im Gegensatz zu den genannten Genen weder eine Bindung, noch eine Transaktivierung des Integrin α_v -Promotors nachgewiesen werden. Da jedoch die Proteinexpression des Integrin α_v von HoxA9-Expression abhängig ist, erfolgt die Regulation des Integrin α_v indirekt oder posttranskriptionell. Der genaue Mechanismus konnte in dieser Arbeit allerdings nicht geklärt werden. Das **Integrin β_3** wird dagegen teilweise auf transkriptioneller Ebene reguliert, was die Transaktivierung des Integrin-Promotors durch HoxA9 im Luciferase-Assay beweist. Allerdings konnte keine direkte Bindung von HoxA9 an den Integrin β_3 -Promotor nachgewiesen werden. Daraus folgt, dass HoxA9 vermutlich in Signaltransduktionswege eingreift, die dann sekundär die Aktivität des Integrin-Promotors regulieren (Tab.4.1). Wie schon weiter oben beschrieben, reguliert HoxA9, zum Beispiel die NO-Synthase und die Expression des VEGF-Rezeptors 2. Für diese Gene ist aus der Literatur bekannt, dass sie auch in der Lage sind in die Regulation von Integrinen einzugreifen (siehe Übersichtsarbeit von Breier, 2000; Rupp and Little, 2001; Yancopoulos et al, 2000). Dies stellt eine mögliche Erklärung für die sekundäre Kontrolle des Integrin $\alpha_v\beta_3$ durch HoxA9 dar.

Tab. 4.1 Zusammenfassung der Zielgene von HoxA9

	mRNA-Expression	Protein-Expression	Luciferase Assay	ChIP	Regulationsart primär/sekundär
EphB4	n.u.*	+ in vitro	+	+	transkriptionell primär
Integrin α_v	n.u.*	+ in vitro	-	-	posttranskriptionell n.u.*
Integrin β_3	n.u.*	+ in vitro	+	-	transkriptionell sekundär
eNOS	+ in vivo+in vitro	+ in vivo+in vitro	+	+	transkriptionell primär
VEGF-R2	+	+	+	+	transkriptionell

Diskussion

	in vitro	in vitro			primär
VE-Cadherin	+	+	+	-	transkriptionell sekundär
	in vivo+in vitro	in vitro			

* n.u. → nicht untersucht; + → Regulation durch HoxA9; - → keine Regulation durch HoxA9

Zusammenfassend beeinflusst HoxA9 die Expression verschiedenster Gene, die alle eine Bedeutung für die Funktion von Endothelzellen und die Gefäßbildung haben. Für die Analyse der einzelnen Zielgene von HoxA9 zu den von HoxA9-betroffenen Funktionen ist es notwendig sich die einzelnen Gene genauer zu betrachten.

4.3 Funktion der Zielgene von HoxA9

Die Rezeptor-Tyrosin-Kinase EphB4 spielt ebenso wie der Ligand EphrinB2 bei der embryonalen Bildung eines strukturierten Blutgefäßsystems eine entscheidende Rolle. Knockout-Mäuse von EphB4 oder EphrinB2 sterben an denselben strukturellen Störungen des Aufbaus einer hierarchischen Struktur des vaskulären Systems (Gerety et al., 1999). Einen Hinweis darauf, dass Eph-Rezeptoren bei der postnatalen Angiogenese wichtig sind, konnte durch Studien erbracht werden, die zeigen, dass EphA2 und EphA3 essentiell für die VEGF-induzierte bzw. die Tumorangio-genese spielen (Chen et al., 1998; Brantley et al., 2002). Weitere Arbeiten zeigen, dass Eph-Rezeptoren aktiv die Zellmigration regulieren (Palmer et al., 2002; Steinle et al., 2002) und potentielle Zielgene von Hox-Transkriptionsfaktoren sind (Myers et al., 2000; Chen et al., 1998; Chen and Ruley, 1998; Studer et al., 1998). Eindeutig belegt werden konnte in dieser Arbeit die essentielle Bedeutung von EphB4 für die endotheliale Migration. So konnte die Überexpression von HoxA9 die gestörte Migration nach EphB4-Verlust nicht wiederherstellen. Daraus folgt, dass EphB4 entscheidend für den durch HoxA9-Defizienz verursachten Verlust der Fähigkeit zur Migration ist. Diese Tatsache wird unterstützt durch Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, bei denen Zellen, bei denen in vitro normalerweise keine EphB4-Expression nachweisbar war und

spontan zu migrieren in der Lage waren, ohne diese Expression nicht mehr migrierten (nicht publizierte Daten, A. Palmer, Martinsried). Die EphB4-getriggerte Stimulation wird zudem über den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) - Signalweg vermittelt (Steinle et al., 2002). Die PI3K wiederum aktiviert, neben anderen Proteinen, die Proteinkinase Akt, was u.a. zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der eNOS führt (Li et al., 1998; Dimmeler et al., 1999). Der PI3K-Signalweg kann weiterhin über eine Phosphorylierung von Raf in die Regulation des ERK1/2-Signalweges eingreifen (Munoz-Chapuli et al., 2004). Eph-Rezeptoren können über die Regulation von Rac auch auf einem zweiten Weg Einfluss auf den ERK1/2-Pathway nehmen. Auch für diesen Signalweg gilt wiederum, dass er in viele Prozesse, wie Migration, Proliferation und Überleben eingreift. Für verschiedene Eph-Rezeptoren ist weiterhin bekannt, dass sie über Nck und über die PI3K direkt Einfluss auf Integrine nehmen können (Stein et al., 1998; Holland et al., 1998). Alle diese zuletzt beschriebenen Signalwege sind für die Homöostase des Endothels und somit für dessen volle Funktionsfähigkeit von großer Bedeutung und könnten einen Teil der Erklärung für die essentielle Bedeutung der HoxA9-vermittelten EphB4-Expression für die Migration sein. Für die embryonale Entwicklung der HoxA9-defizienten Allantois ist zu betonen, dass diese eine wenig entwickelte hierarchische Struktur und eine verminderte Anzahl an Verzweigungen aufweisen. Diese Morphologie (Abb. 3.19) ist in der Beschreibung der Gefäßstruktur im EphB4-Knockout sehr ähnlich (Gerety et al., 1999) und lässt so einen Einfluss der HoxA9 kontrollierten Expression von EphB4 auf Gefäßbildung vermuten. Die Regulierung von Angiogenese und Vaskulogenese durch den EphB4-Rezeptor im embryonalen Stadium wird durch Untersuchungen bestätigt, bei denen der Rezeptor die ES-Zelldifferenzierung von primitiven Hämangioblasten, Kardiomyozyten und Blutgefäßen *in vitro* kontrolliert (Whang et al., 2004).

Ein weiteres Zielgen von HoxA9 ist das Integrin $\alpha_v\beta_3$. Integrine sind Zelloberflächenrezeptoren die den Kontakt einer Zelle zur extrazellulären Matrix und in einigen Fällen zu benachbarten Zellen herstellen (Hynes et al., 1992; Giancotti et al., 2001; van der Flier et al., 2001). Für verschiedene Integrine und ihrer Liganden konnte eine Rolle in der Angiogenese nachgewiesen werden. So wurde initial für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ eine erhöhte Expression während der Tumorangio-genese

beobachtet werden (Brooks et al., 1994). Außerdem führte die Hemmung dieses Integrins in verschiedenen Modellen zu einer Inhibierung der Angiogenese (Brooks et al., 1994b; Brooks et al., 1995; Friedlander et al., 1995; Friedlander et al., 1996). Verschiedene Arbeiten zeigen, dass Integrine auch durch Hox-Proteine reguliert werden können. So wird zum Beispiel das Integrin $\alpha_v\beta_3$ durch HoxD3 reguliert (Boudreau et al., 1997; Zhong et al., 2003). Auch beim Integrin $\alpha_v\beta_3$ gibt es verschiedene Wechselwirkungen mit anderen Komponenten des HoxA9-regulierten Netzwerkes. So führt die Behandlung von Endothelzellen mit anti- α_v – und anti- β_3 - Antikörpern zu einer reduzierten Phosphorylierung des VEGF-R2 bzw. der Aktivität der PI3K (Soldi et al., 1999), was wiederum die schon oben erwähnte Phosphorylierung der eNOS inhibiert und in der Folge zu einer verminderten Migration führt. Zusätzlich wird durch die Regulierung der Proteinkinase A (PKA) und der G-Proteine Rac und Ras der ERK1/2-Signalweg beeinflusst, der wiederum in Migration, Proliferation und Überleben von Endothelzellen eingreift (Ruegg und Mariotti, 2003). Betrachtet man verschiedene Liganden des Integrin $\alpha_v\beta_3$, wie der von Willebrand-Faktor (vWF), MMP2 oder Del1, die alle während der Angiogenese entweder wie das Integrin eine stark erhöhte Expression haben oder sogar, wie Del1, de novo exprimiert werden, so zeigt sich auch für diese Proteine eine starke angiogene Funktion (siehe Übersichtsarbeit von Ruegg und Mariotti, 2003). Weiterhin ist die Interaktion mit dem VEGF-R2 und anderen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (z.B. PDGF-R und Insulinrezeptor) entscheidend für die Feinregulation der Angiogenese, insbesondere der Maturierung hin zu einem intakten Endothel und einer korrekten Gefäßbildung (siehe Übersichtsarbeit von Eliceiri und Cheresh, 2001). Diese Funktionen und Interaktionen des Integrins $\alpha_v\beta_3$ zeigen eine Beteiligung des Integrins bei der Migration und der terminalen Differenzierung und Polarisierung des Endothels. Dass Integrine auch in andere Bereiche der Angiogenese und Vaskulogenese eingreifen, zeigen Untersuchungen am Integrin β_2 , welches für das so genannte Homing von EPC in ischämisches Gewebe notwendig ist (Chavakis et al., 2005).

Der VEGF-Rezeptor 2 und VE-Cadherin sind Zelloberflächenmoleküle die schon embryonal eine entscheidende Rolle für die Angiogenese und Vaskulogenese

spielen. So sterben Knockout-Mäuse für den VEGF-R2 oder VE-Cadherin embryonal an massiven vaskulären Defekten (Carmeliet et al., 1999; Shalaby et al., 1995). Der Verlust des Liganden für den VEGF-R2, das VEGF, führt sogar schon bei Verlust nur eines Allels zum Tode (Ferrara et al., 1996). Auch hier sterben die Mäuse embryonal an einer abnormalen Entwicklung der Blutgefäße (Carmeliet et al., 1996). Neben diesen besonders deutlichen Nachweisen für die Bedeutung des VEGF-R2 und von VE-Cadherin gibt es eine Vielzahl von Arbeiten die den Einfluss dieser beiden Gene auf Angiogenese und Vaskulogenese zeigen konnten (siehe Übersichtsarbeit von Carmeliet, 2000; Carmeliet und Jain, 2000; Carmeliet und Collen, 2000; Yancopoulos, 2000; Carmeliet, 2003). VEGF induziert über die Bindung an den VEGF-R2 die Proliferation und Migration von Endothelzellen, fördert die Bildung funktioneller Gefäße, erhöht deren Permeabilität und stellt das Hauptsignal für eine angiogene Antwort dar (siehe Übersichtsarbeit von Klagsbrun und D'Amore, 1996; Ferrara und Davis-Smyth, 1997). Zusätzlich dazu beeinflusst VEGF zusammen mit bFGF schon frühzeitig in der Embryonalentwicklung die Differenzierung und Migration des Hämangioblasten, einem gemeinsamen Vorgänger hämatopoetischer und endothelialer Zellen (Ferrara, 1999; Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996; Shalaby et al., 1997). Auch für den VEGF-R2 gibt es Interaktionen zwischen den einzelnen Bestandteilen des HoxA9-abhängigen Netzwerkes. So konnten Interaktionen zwischen dem VEGF-R2 und den Integrinen α_v und β_3 , der eNOS und VE-Cadherin nachgewiesen werden (Eliceiri und Cheresh, 2001; Sessa, 2004; Gerber et al., 1998). Zusätzlich dazu kann der VEGF-R2 die Phospholipase C- γ aktivieren und regt damit Calmodulin sowie die Proteinkinase C an. Gleichzeitig greift der VEGF-R2 auch die weiter oben beschriebenen Signalwege der PI3-Kinase oder ERK1/2 ein. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Regulation des VEGF-R2 durch HoxA9 in die Differenzierung endothelialer Zellen, die Migration, die Gefäßstrukturbildung, die Sprossung, die Expansion von Vorläuferzellen eingreifen könnte und damit das potenteste Zielgen von HoxA9 in der Kontrolle sowohl der embryonalen als auch der postnatalen Angiogenese und Vaskulogenese darstellt. Allerdings muss hier noch einmal betont werden, dass in vivo bisher keine Regulation des VEGF-R2 nachgewiesen werden konnte.

Der Verlust von VE-Cadherin bei HoxA9-Defizienz und die damit einhergehende Hemmung des endothelialen Zell-Zell-Kontakts könnte eine weitere Ursache für die HoxA9-vermittelte und verschlechterte Gefäßstrukturbildung sein. Zusätzlich konnte die Bedeutung von VE-Cadherin für die Migration gezeigt werden (Dejana, 1996). Auch im Falle von VE-Cadherin ist eine Aktivierung des PI3K- bzw. des ERK1/2-Signalweges beschrieben worden (Munoz-Chapuli et al., 2004). Insgesamt lässt sich also ein mögliche Rolle von VE-Cadherin für die HoxA9-vermittelte Migration, die endotheliale Differenzierung und die Gefäßneubildung maturer Endothelzellen vermuten.

Von der endothelialen NO-Synthase stammendes Stickstoffmonoxid (NO) ist ein entscheidender Regulator der kardiovaskulären Homöostase. Stickstoffmonoxid greift dabei in vielfältige Prozesse, wie Apoptose, Proliferation und Migration ein (reviewed in Sessa, 2004; Berk et al., 1995). Der Verlust der endothelialen NO-Synthase führt postnatal zu massiven Störungen der Neovaskularisierung sowie der Stammzellmobilisierung im Knochenmark (Lee et al., 1999; Fukumura et al., 2001; Aicher et al., 2003). Die Wechselwirkungen mit den anderen Zielgenen von HoxA9 sind bisher schon eingehend beschrieben worden. Die HoxA9-abhängige Regulation der endothelialen NO-Synthase könnte somit für eine verminderte Mobilisierung embryonaler Stammzellen, einhergehend mit einer reduzierten Anzahl an zirkulierenden Vorläuferzellen, verantwortlich sein, was die inhibierte Vaskulogenese erklären könnte. Gleichzeitig dürften auch die Regulation der Migration, die Bildung neuer Blutgefäße nach Ischämie, die Expansion endothelialer Vorläuferzellen sowie das Homing durch die Regulation der eNOS durch HoxA9 betroffen sein.

Prinzipiell lassen sich noch eine Vielzahl weiterer Verknüpfungen innerhalb dieses von HoxA9 direkt oder indirekt regulierten Netzwerkes feststellen, in deren Mitte vor allem die PI3-Kinase- und die ERK1/2-Signalwege stehen, die für die Vaskulogenese und Angiogenese eine wesentliche Rolle spielen. Ein Überblick darüber, ohne Anspruch auf Vollständigkeit wird in Abb. 4.2 und 4.3 dargestellt.

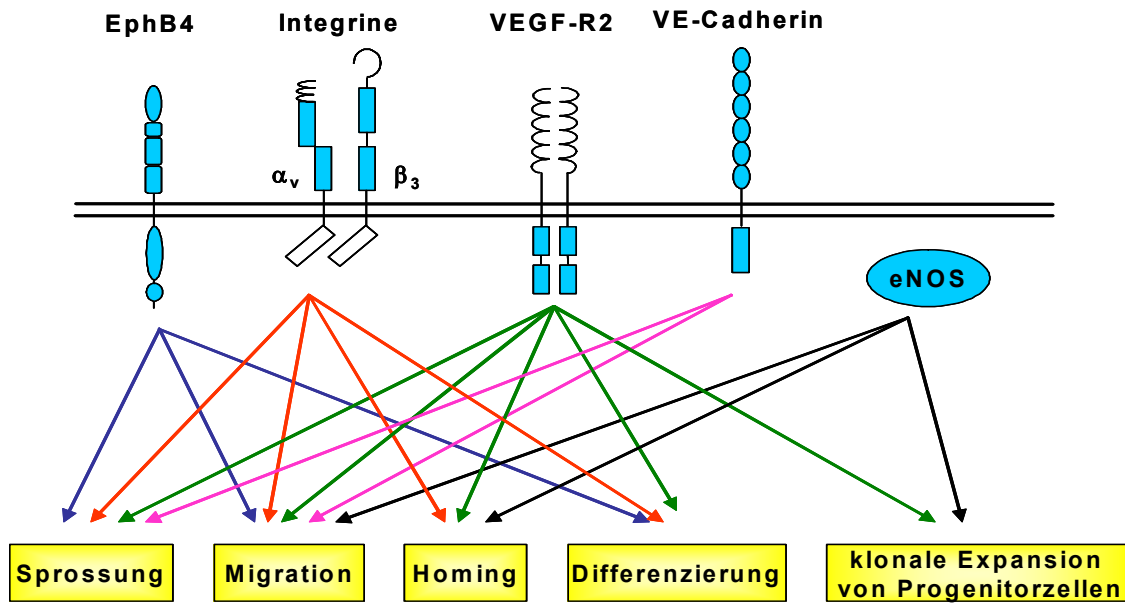


Abb. 4.2 Überblick über die von den einzelnen Zielgenen regulierten und direkt von HoxA9 betroffenen Funktionen

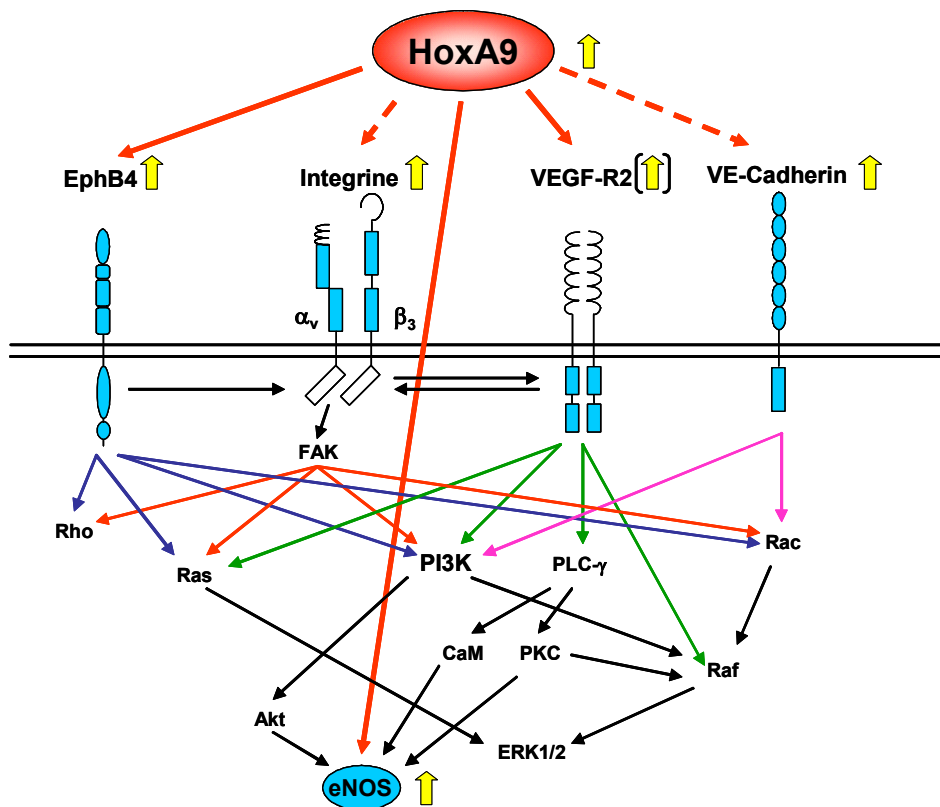


Abb. 4.3 Überblick in die direkt und indirekt von HoxA9 kontrollierten Signalwege in Endothelzellen sowie deren Interaktionen

4.4 Bedeutung von HoxA9 in vivo

Die essentielle Bedeutung von HoxA9 für die Angiogenese und Vaskulogenese basiert vermutlich auf einer Fülle von Faktoren, die zum Teil über eine primäre Regulation von Zielgenen und zum anderen Teil über HoxA9-abhängige sekundäre Mechanismen verläuft. Warum weisen HoxA9-defiziente Mäuse jedoch so einen starken Defekt in der postnatalen Neovaskularisierung auf, während die embryonale Entwicklung der Gefäße nur bedingt beeinträchtigt ist? Eine Erklärung hierfür kann in der redundanten Funktion vieler Homeobox-Proteine während der Embryogenese liegen. In MLL-defizienten embryonalen Zellen (EB) ist die Differenzierung und Funktion der Zellen aufgrund des Ausfalls mehrerer, von MLL-regulierter, Homeobox-Gene gestört (Ernst et al., 2004). Dieser Funktionsverlust konnte durch Expression verschiedener Hox-Proteine, wie HoxA9, HoxB4 oder HoxA10 wieder hergestellt werden. Überraschender Weise reichte für diese Kompensation die Überexpression eines einzelnen Hox-Gens (Ernst et al., 2004), jedoch nicht die Expression von anderen Zielgenen von MLL wie Pitx2 oder BCL-2 aus. Das bedeutet eine überlappende, redundante Funktion von Homeobox-Proteinen der Klasse I in embryonalen Zellen. Diese redundanten Funktionen bestätigen sich auch an *Kugelig*-Mutanten, einem Cdx4-defizienten Zebrafisch mit Defekten in der frühen Hämatopoese, bei der die Überexpression von HoxA9, HoxB7 oder HoxB8 wieder zum normalen Wildtyp führt (Davidson et al., 2003). In der späteren Entwicklung der Differenzierung oder auch im postnatalen Stadium eines Organismus, besitzen viele Homeobox-Proteine dann jedoch eine eigene, nicht redundante Funktion. Bestätigt wird dieses Modell an Arbeiten mit HoxB4, bei denen der Knockout einen sehr milden Phänotyp bei der Stammzellproliferation aufweist, jedoch Experimente mit adulten Tieren einen sehr viel ausgeprägteren Phänotyp aufweisen (Thorsteinsdottir et al., 2002; Brun et al., 2004). Auch HoxA9 führt im pränatalen Stadium zu phänotypischen Defekten, die zwar nicht die Stärke des adulten Phänotyps aufzeigen, aber doch deutlich genug sind, um erwähnt zu werden. So bringt die Kreuzung von heterozygoten HoxA9-Mäusen zwar alle drei möglichen Genotypen hervor, jedoch nicht in der zu erwartenden, normalen Mendel'schen Verteilung, sondern mit einer deutlich verminderten Anzahl an

homozygoten Knockout-Tieren, die zudem nicht alle eine normale Fertilität aufwiesen. Zusätzlich konnten erste Versuche an HoxA9-defizienten Allantois eine gehemmte Gefäßbildung *in vitro* nachweisen. Beide Beobachtungen zusammen genommen sprechen für einen Effekt auch in der embryonalen Angiogenese und Vaskulogenese. Warum der Defekt nicht alle Embryonen betrifft und die geborenen HoxA9^{-/-}-Mäuse eine unterschiedliche Fertilität aufweisen, konnte im Laufe dieser Arbeit nicht geklärt werden. Zusätzlich sollte in künftigen Studien noch geklärt werden, worauf die verminderte Anzahl an HoxA9^{-/-}-Mäusen zurückzuführen ist und in welchem Stadium der pränatalen Entwicklung der Defekt einsetzt. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu einer in der Literatur beschriebenen normalen Verteilung der Genotypen, die alle eine normale Vitalität und Fertilität aufwiesen (Chen und Capecchi, 1997). Diese Diskrepanz und die noch nicht geklärten Defekte bei HoxA9-defizienten Mäusen müssen in weiterführenden Experimenten noch untersucht werden.

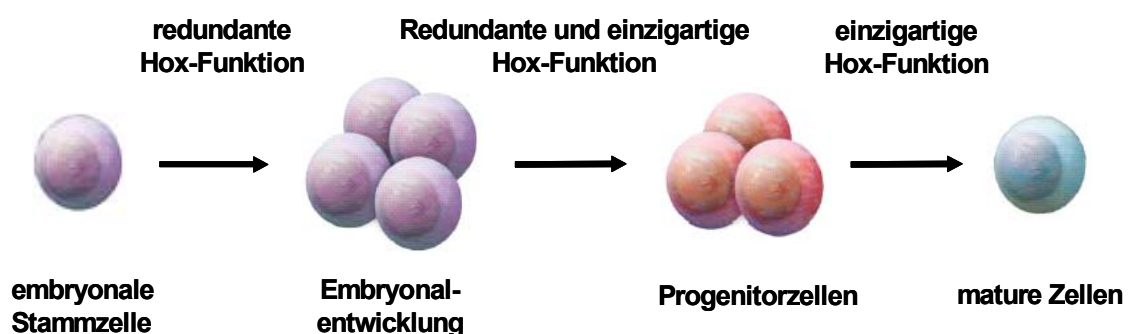


Abb. 4.4 Modell einer Verteilung von redundanten und einmaligen Funktionen von Homeobox-Proteinen (modifiziert nach Ernst et al., 2004)

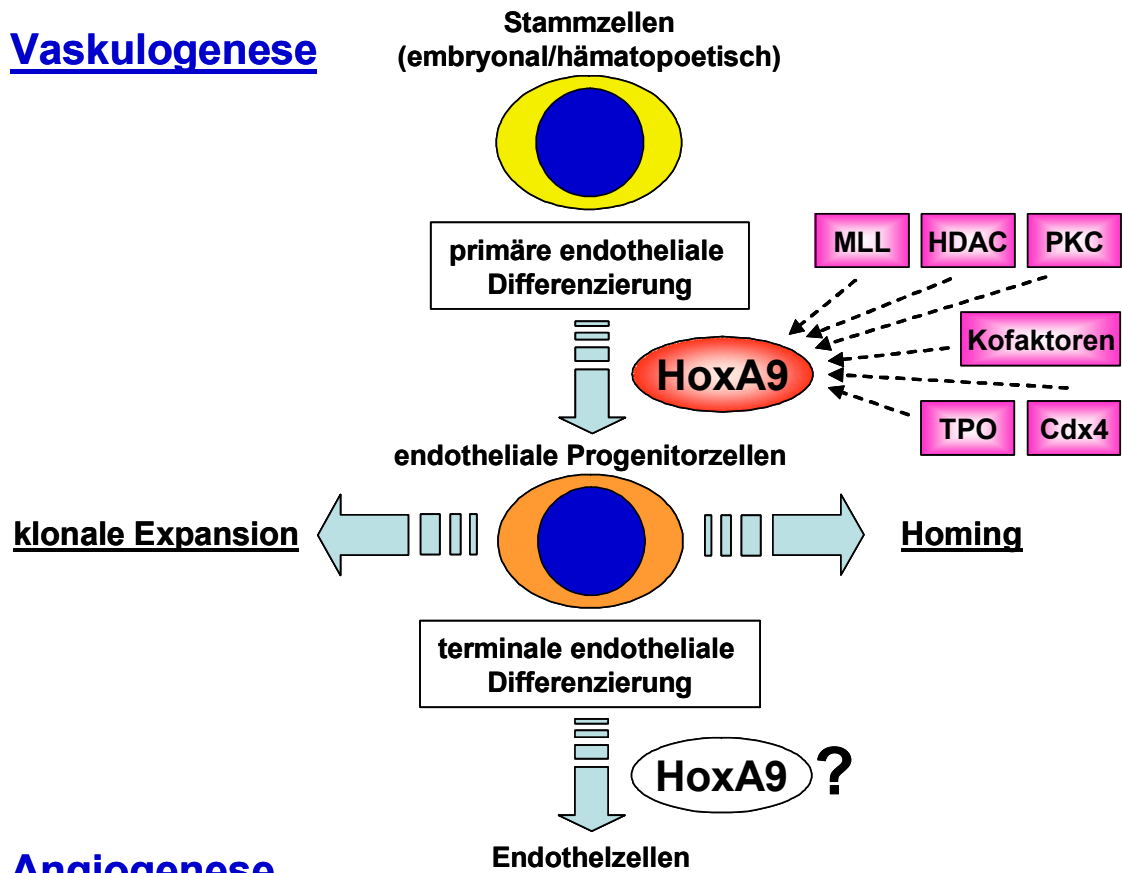
4.5 Regulation von HoxA9

Da die vorliegende Arbeit eine zentrale Bedeutung von HoxA9 für die Neovaskularisierung zeigt, stellt sich die Frage wie HoxA9 reguliert wird. Hier konnte gezeigt werden, dass HoxA9 Schubspannungs-abhängig hochreguliert wird.

Zusätzlich konnte eine Kontrolle der Expression der HoxA9-mRNA sowie des HoxA9-Proteins durch die Histondeacetylase 1 (HDAC1) der Klasse 1 nachgewiesen werden. Andere Faktoren wie VEGF, Resveratol, Retinol, TNF α („tumor necrosis factor α “), Ssh („sonic hedgehog“) oder Atorvastatin hatten jedoch keinen Einfluss auf die Transkription von HoxA9 (in Kooperation mit Lothar Rössig). Wichtig für die Funktion und Regulation von Homeoboxproteinen ist allerdings auch die Komplexbildung mit anderen Proteinen. Verschiedene Studien mit HoxA9 weisen Unterschiede bei der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen in Abhängigkeit einer Co-Expression von Meis1 auf (Zeisig et al., 2004; Calvo et al., 2001; Fujino et al., 2001). Zusätzlich zeigen andere Gruppen, dass HoxA9 zusammen mit anderen Homeobox-Proteinen wie Meis und Pbx/EXD Di- und Trimere bildet, die für die Spezifität und Verstärkung der HoxA9-DNA-Bindung verantwortlich sind (Shen et al., 1999; Mann und Chan, 1996; LaRonde et al., 2003). Dazu kommt eine weitere Regulationsebene, die wiederum die Interaktion von Pbx mit anderen Homeobox-Proteinen regelt (Berthelsen et al., 1998). Die Tatsache, dass die im EphB4-Promotor flankierenden Elemente der gefundenen HoxA9-Bindungsstelle sich deutlich von den bisher beschriebenen Bindungssequenzen von HoxA9 unterscheidet (Shen et al., 1999), spricht für einen oder mehrere bis jetzt nicht bekannte Kofaktoren von HoxA9 in Endothelzellen. Natürlich kann man einen Einfluss weiterer Regulationsebenen wie die beschriebene Regulation des HoxA9-Exports durch Trombopoetin (Kirito et al., 2004) oder die HoxA9-Aktivitätsregulierung durch Phosphorylierung durch die PKC nicht ausschließen. Solche Regulationen machen eine Erklärung der individuellen Unterschiede des Phänotyps innerhalb des homozygoten HoxA9-Genotyps schwierig.

Eine graphische Zusammenfassung ist in Abbildung 4.5 gezeigt.

Vaskulogenese



Angiogenese

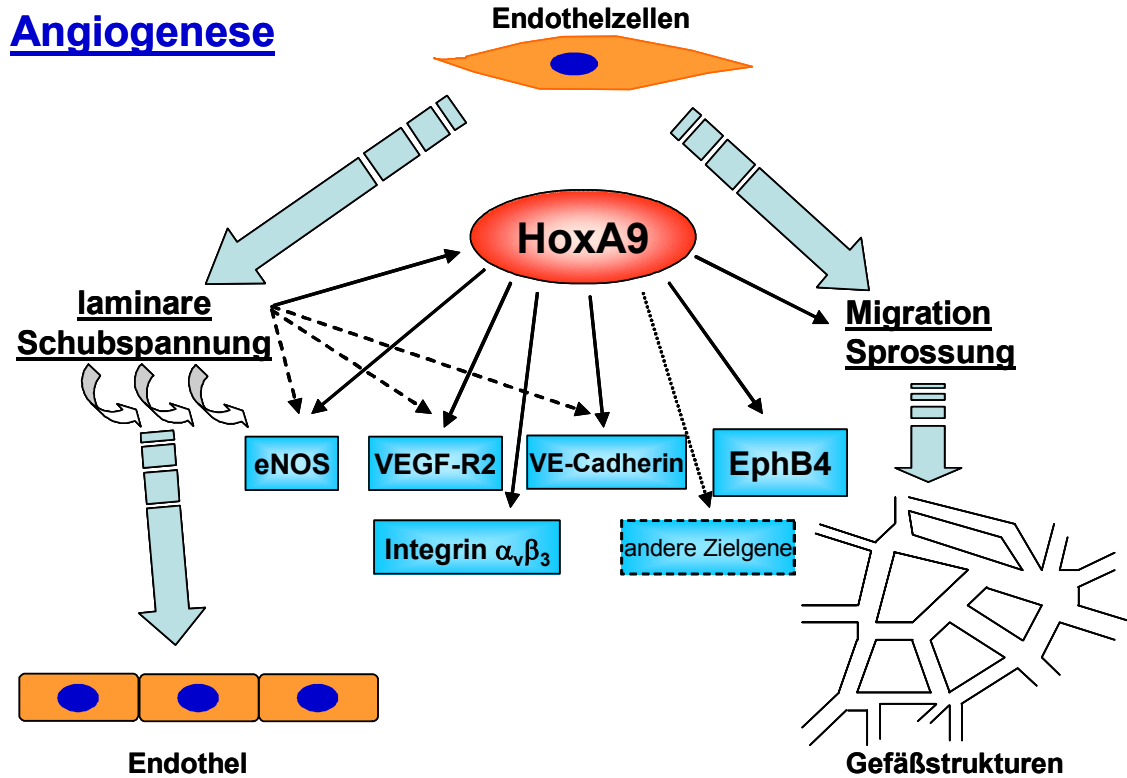


Abb. 4.5 Einfluss von HoxA9 auf Angiogenese und Vaskulogenese

5. Zusammenfassung

Die postnatale Neovaskularisierung ist eine wichtige Voraussetzung um Gewebe vor kritischer Ischämie zu schützen. Eine der Grundlagen dieses Prozesses bilden die Angiogenese, bei der neue Kapillaren durch Proliferation und Migration von Endothelzellen aus bereits vorhandenen Blutgefäßen entstehen. Ein zweiter Eckpfeiler ist die Vaskulogenese, die unter anderem durch zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (EPC) vermittelt wird. Homeobox-Gene der Klasse 1 (Hox) sind Transkriptionsfaktoren, die während der Embryonalentwicklung an der Organogenese und der Entwicklung des kardiovaskulären Systems beteiligt sind. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass Homeobox-Proteine auch im adulten Organismus bei der transkriptionellen Regulation von Genen der Angio- und Vaskulogenese eine wichtige Rolle spielen.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zeigen eine essentielle Rolle von HoxA9 für die postnatale Neovaskularisierung sowie für die funktionelle Integrität von Endothelzellen und endothelialen Progenitorzellen. HoxA9-defiziente Mäuse hatten einen signifikant verringerten Blutfluss nach einer Hinterlauf-Ischämie. Für die reduzierte Neovaskularisierung des ischämischen Gewebes, genügte der Verlust eines einzigen HoxA9-Wildtypallels. Außerdem zeigen HoxA9-defiziente Endothelzellen *in vitro* eine stark gehemmte Migration sowie eine verringerte Gefäßstrukturbildung. Zusätzlich war auch deren Interaktion mit EPC im Matrigel verschlechtert. Eine Bestätigung dieser Beobachtung zeigten Untersuchungen an endothelialen Vorläuferzellen, die ebenfalls einen Verlust angiogener Funktionen bei verminderter HoxA9-Expression aufwiesen. Neben der postnatalen Neovaskularisierung konnten erste Untersuchungen embryonaler Allantois zeigen, dass HoxA9 vermutlich auch in der embryonalen Gefäßbildung beteiligt ist. Diese Theorie wird durch eine nicht-Mendel'sche Verteilung der postnatalen Genotypen nach Kreuzung heterozygoter HoxA9-Mäuse unterstützt.

Als molekulare Ursachen der Hemmung angiogener Funktionen bei Endothelzellen, konnte die Regulation verschiedener Gene nachgewiesen werden. So ist HoxA9 für die Expression der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase

(eNOS), des VEGF-Rezeptors 2 (VEGF-R2), der Adhäsionsmoleküle VE-Cadherin und Integrin $\alpha_v\beta_3$ sowie des EphB4-Rezeptors von essentieller Bedeutung. Diese von HoxA9 regulierten Gene spielen für die Angio- und Vaskulogenese alle eine entscheidende Rolle. Der EphB4-Rezeptor, die eNOS und der VEGF-R2 werden durch eine direkte Bindung von HoxA9 an den jeweiligen Promotor auf transkriptioneller Ebene reguliert. Bei den Genen Integrin $\alpha_v\beta_3$ und VE-Cadherin erfolgt die Regulation durch HoxA9 indirekt über andere Gene oder posttranskriptionell. Zusätzlich zum Nachweis der Kontrolle der Genexpression, konnte für den EphB4-Rezeptor nachgewiesen werden, dass dieser von großer Bedeutung für die HoxA9-regulierte Migration ist. Außerdem besitzt der EphB4-Promotor eine für die Regulation der EphB4-Expression durch HoxA9 wichtige Bindungsstelle.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass HoxA9 Schubspannungsabhängig reguliert wird und dabei auch in die Regulation der Schubspannungsinduzierten Migration und die Schubspannungsabhängige Expression der untersuchten Zielgene von HoxA9 eingreift.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Daten, dass HoxA9 endotheliale Gene vielfältig reguliert, eine entscheidende Rolle bei der Modulation verschiedener endothelialer Funktionen spielt und essentiell für die postnatale Neovaskularisierung ist.

6. Abkürzungsverzeichnis

Nukleotide

dNTP	Desoxynukleotid – Triphosphat
ATP	Adenosin – Triphosphat
CTP	Cytidin – Triphosphat
GTP	Guanosin – Triphosphat
TTP	Thymidin – Triphosphat
A	Adenosin
C	Cytidin
G	Guanidin
T	Tymidin

Sonstige Abkürzungen

°	Grad
%	Prozent
7-AAD	7-Amino-Actinomycin
A	Ampere
AA	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ad	auf
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
BrdU	Bromdeoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
C-	Carboxy-
ca.	circa

Abkürzungsverzeichnis

Ca ²⁺	Kalziumion
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
dest.	destilliert
d. h.	das heißt
Dil-Ac-LDL	1,1'- dioctadecyl – 3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s Medium
DTT	Dithiothreitol
EBM	Basales Endothelzellmedium
ECGS	Endothelzellenwachstumszusatz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	embryonale Stammzelle
et al.	und andere
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FACS	Fluoreszenz - aktivierter Zellsorter
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Flourescein – isothiocyanate
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten / Makrophagen – Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde(n)
HBSS	Hank`s balanced salt solution (Kollagenasepuffer)
HCl	Salzsäure
hEGF	humaner Endothelzellenwachstumsfaktor
H ₂ O	Wasser
l	Standardfehler
kg	Kilogramm
kb	Kilobasen
KCL	Kalziumchlorid
kDa	Kilodalton

Abkürzungsverzeichnis

KDR	VEGF – Rezeptor (<i>kinase insert domain containing receptor</i>)
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge
l	Liter
m	Meter oder Milli
M	Molar
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
max.	maximal
MgCl_2	Magnesiumchlorid
min	Minute
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
mt	Mutante
N-	Amino
n	Nano oder Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NLS	Kernlokalisierungssequenz
nm	Nanometer
P	Signifikanz
p	Piko
PBS	Phosphat – gepufferte Saline
PCR	Polymerase – Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
S-	Synthese-
SDS	Natriumdodecylsulfat

Abkürzungsverzeichnis

sec	Sekunde
sonst.	Sonstige
τ	laminare Schubspannung oder Shear stress
Taq	Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA – Puffer
TBS	Tris – gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylamin
U	Enzymeinheit
u. a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen / Volumen
W	Watt
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht / Volumen
z. B.	zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

1. Abate-Shen (2002) Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer* 2(10): 777-85
2. Acampora, D'Esposito, Faiella, Pannese, Migliaccio, Morelli, Stornaiuolo, Nigro, Simeone, Boncinelli (1989) The human HOX gene family. *Nucleic Acids Res* 17(24): 10385-402
3. Adams, Wilkinson, Weiss, Diella, Gale, Deutsch, Risau, Klein (1999) Roles of EphrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 13(3): 295-306
4. Aicher, Heeschen, Mildner-Rihm, Urbich, Ihling, Technau-Ihling, Zeiher, Dimmeler (2003) Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9(11): 1370-76
5. Akam (1989) Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell* 57(3): 347-9
6. Alonso Varona, Castro, Calle, Palomares, Bilbao, Flagiello, Poupon, Malfoy (1996) HOX genes and cell adhesion molecules in cancers. *Int J Dev Biol* 40(suppl 1): 309S–310S
7. Armstrong, Staunton, Silverman, Pieters, den Boer, Minden, Sallan, Lander, Golub, Korsmeyer (2002) MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 30(1): 41-7

8. Antonchuk, Sauvageau, Humphries (2002) HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell*. 109(1): 39-45
9. Apiou, Flagiello, Cillo, Malfoy, Poupon, Dutrillaux (1996) Fine mapping of human HOX gene clusters. *Cytogenet Cell Genet* 73(1-2): 114-5
10. Asahara, Murohara, Sullivan, Silver, van der Zee, Li, Witzenbichler, Schatteman, Isner (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275(5302): 964-7
11. Ausprunk, Folkman (1977) Migration and proliferation of endothelial cells in reformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 14(1): 53-65
12. Belotti, Clause, Flagiello, Alami, Daukandt, Deroanne, Malfoy, Boncinelli, Faiella, Castronovo (1998) Expression and modulation of homeobox genes from cluster B in endothelial cells. *Lab Invest* 78: 1291–1299
13. Berk, Corson, Peterson, Tseng (1995) Protein kinases as mediators of fluid shear stress stimulated signal transduction in endothelial cells: a hypothesis for calcium-dependent and calcium-independent events activated by flow. *J Biomech* 28(12):1439-50
14. Berthelsen, Zappavigna, Ferretti, Mavilio, Blasi (1998) The novel homeoprotein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *EMBO* 17 (5) 1434-45
15. Borrow, Shearman, Stanton, Becher, Collins, Williams, Dube, Katz, Kwong, Morris, Ohyashiki, Toyama, Rowley, Housman (1996) The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the

- genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat Genet* 12(2): 159-67
16. Bostrom, Tintut, Kao, Stanford, Demer (2000) HOXB7 overexpression promotes differentiation of C3H10T1/2 cells to smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 78: 210-221
 17. Boudreau, Andrews, Srebrow, Ravanpay, Cheresh (1997) Induction of the angiogenic phenotype by Hox D3. *J Cell Biol* 139: 257–264
 18. Boudreau, Varner (2004) The homeobox transcription factor Hox D3 promotes integrin alpha5beta1 expression and function during angiogenesis. *J Biol Chem* 279(6): 4862-8
 19. Brantley, Cheng, Thompson, Lin, Brekken, Thorpe, Muraoka, Cerretti, Pozzi, Jackson, Lin, Chen (2002) Soluble EphA receptors inhibit tumor angiogenesis and progression in vivo. *Oncogene* 21: 7011–7026
 20. Breier (2000) Angiogenesis in embryonic development. *Placenta* 21: S11-15
 21. Breier, Damert, Plate, Risau (1997) Angiogenesis in embryos and ischemic diseases. *Thromb Haemost* 78 (1): 678-83
 22. Brooks, Clark, Cheresh (1994a) Requirement of vascular integrin $\alpha_v \beta_3$ for angiogenesis. *Science* 264: 569-571
 23. Brooks, Montgomery, Rosenfeld, Reisfeld, Hu, Klier, Cheresh (1994b) Integrin $\alpha_v \beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79: 1157-1164

24. Brooks, Stromblad, Klemke, Visscher, Sarkar, Cheresch (1995) Antiintegrin $\alpha_v \beta_3$ blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 96: 1815-1822
25. Brown, Rodaway, Schilling, Jowett, Ingham, Patient, Sharrocks (2000) Insights into early vasculogenesis revealed by expression of the ETS-domain transcription factor Fli-1 in wild-type and mutant zebrafish embryos. *Mech Dev* 90(2): 237-52
26. Brun, Björnsson, Magnusson, Larsson, Leveen, Ehinger, Nilsson, Karlsson (2004) Hoxb4-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood* 103 (11): 4126-33
27. Burri (1992) Intussusceptive microvascular growth, a new mechanism of capillary network formation. *EXS* 62: 32-39
28. Butcher (1991) Leukocytes-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity. *Cell* 67: 1033-36
29. Calvo, Knoepfler, Sykes, Pasillas, Kamps (2001) Meis1a suppresses differentiation by G-CSF and promotes proliferation by SCF: potential mechanisms of cooperativity with Hoxa9 in myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(23): 13120-25
30. Care, Silvani, Meccia, Mattia, Stoppacciaro, Parmiani, Peschle, Colombo (1996) HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cell Biol* 16: 4842- 4851
31. Care, Felicetti, Meccia, Bottero, Parenza, Stoppacciaro, Peschle, Colombo (2001) HOXB7: a key factor for tumor-associated angiogenic switch. *Cancer Res* 61(17): 6532-39

32. Carmeliet, Ferreira, Breier, Pollefeyt, Kieckens, Gertsenstein, Fahrig, Vandenhoeck, Harpal, Eberhardt, Declercq, Pawling, Moons, Collen, Risau, Nagy (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380(6573): 435-9
33. Carmeliet, Lampugnani, Moons, Breviario, Compennolle, Bono, Balconi, Spagnuolo, Oostuyse, Dewerchin, Zanetti, Angellilo, Mattot, Nuyens, Lutgens, Clotman, de Ruiter, Gittenberger-de Groot, Poelmann, Lupu, Herbert, Collen, Dejana (1999) Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98(2): 147-57
34. Carmeliet, Jain (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801): 249-57
35. Carmeliet (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6(4): 389-95
36. Carmeliet, Collen (2000) Molecular basis of angiogenesis: Role of VEGF and VE-Cadherin. *Ann N Y Acad Sci* 902: 249-62
37. Carmeliet (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9(6): 653-60
38. Chariot, van Lint, Chapelier, Gielen, Merville, Bours (1999) CBP and histone deacetylase inhibition enhance the transactivation potential of the HOXB7 homeodomain-containing protein. *Oncogene* 18(27): 4007-14
39. Chavakis E, Aicher, Heeschen, Sasaki, Kaiser, El Makhfi, Urbich, Peters, Scharffetter-Kochanek, Zeiher, Chavakis T, Dimmeler (2005) Role of

- beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med* 201 (1): 63-72
40. Chen, Ruley (1998) An enhancer element in the EphA2 (Eck) gene sufficient for rhombomere-specific expression is activated by Hox A1 and Hox B1 homeobox proteins. *J Biol Chem* 273: 24670-75
41. Chen, Capecchi (1997) Targeted mutations in *hoxa-9* and *hoxb-9* reveal synergistic interactions. *Dev Biol* 181(2): 186-96
42. Cho, Kozasa, Bondjers, Betsholtz, Kehrl (2003) Pericyte-specific expression of *Rgs5*: implications for PDGF and EDG receptor signaling during vascular maturation. *FASEB J* 17(3): 440-42
43. Choi, Kennedy, Kazarov, Papadimitriou, Keller (1998) A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125(4): 725-32
44. Chuong, Crossin, Edelman (1987) Sequential expression and differential function of multiple adhesion molecules during the formation of cerebellar cortical layers. *J Cell Biol* 104(2): 331-42
45. Cillo, Barba, Freschi, Bucciarelli, Magli, Boncinelli (1992) HOX gene expression in normal and neoplastic human kidney. *Int J Cancer* 51(6): 892-97
46. Cillo, Cantile, Mortarini, Barba, Parmiani, Anichini (1996) Differential patterns of HOX gene expression are associated with specific integrin and ICAM profiles in clonal populations isolated from a single human melanoma metastasis. *Int J Cancer* 66: 692-697

47. Cillo, Faiella, Cantile, Boncinelli (1999) Homeobox genes and cancer. *Exp Cell Res* 248: 1-9
48. Cillo, Cantile, Faiella, Boncinelli (2001) Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol* 188(2): 161-9
49. Cines, Pollak, Buck, Loscalzo, Zimmermann, McEver, Pober, Wick, Konkle, Schwartz, Barnathan, McCrae, Hug, Schmidt, Stern (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorder. *Blood* 91: 3527-61
50. Cotran, Mayadas-Norton (1998) Endothelial adhesion molecules in health and disease. *Pathol Biol* 46: 164-70
51. Dart, Chin-Dustin (1999) Lipids and the endothelium. *Cardiovasc Res* 43: 308-22
52. Davidson, Ernst, Wang, Dekens, Kingsley, Palis, Korsmeyer, Daley, Zon (2003) Cdx4 mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple hox genes. *Nature* 425(6955): 300-6.
53. Davis, Wu, Yan, Prasad, McCoull (2002) 2H-Azirine 3-phosphonates: a new class of chiral iminodienophiles. Asymmetric synthesis of quaternary piperidine phosphonates. *Org Lett* 4(4): 655-58
54. Dejana (1996) Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest* 98: 1949-53
55. Dimmeler, Flemming, Fisslthaler, Hermann, Busse, Zeiher (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by AKT-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-5

56. Downs, Temkin, Gifford, McHugh (2001) Study of the murine allantois by allantoic explants. *Dev Biol* 233(2): 347-64
57. Dube, Akbarali, Sato, Libermann, Oettgen (1999) Role of the Ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific Tie2 gene. *Circ Res* 84(10): 1177-85
58. Dube, Thai, Gaspar, Rudders, Libermann, Iruela-Arispe, Oettgen (2001) Elf-1 is a transcriptional regulator of the Tie2 gene during vascular development. *Circ Res.* 88(2): 237-44.
59. Duboule, Dolle (1989) The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J* 8(5): 1497-505.
60. Dvorak (2000) VPF/VEGF and the angiogenic response. *Semin Perinatol.* 24(1): 75-78
61. Eliceiri, Cheresh (2001) Adhesion events in angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 13: 563-68
62. Ernst, Mabon, Davidson, Zon, Korsmeyer (2004) An MLL-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Curr Biol* 14(22): 2063-69
63. Fassler, Meyer (1995) Consequences of lack of $\beta 1$ integrin gene expression in mice. *Genes Dev* 9: 1896–1908
64. Fischbach, Rozenfeld, Shen, Fong, Chrobak, Ginzinger, Kogan, Radhakrishnan, Le Beau, Largman, Lawrence (2005) HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic

- precursor in vitro and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia in vivo. *Blood* 105(4): 1456-66
65. Ferrando, Armstrong, Neuberg, Sallan, Silverman, Korsmeyer, Look (2003) Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* 102(1):2 62-8
66. Ferrara (1999) Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 56: 794-814
67. Ferrara, Carver-Moore, Chen, Dowd, Lu, O'Shea, Powell-Braxton, Hillan, Moore (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380 (6573): 439-42
68. Ferrara (1999) Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 237: 1-30
69. Ferrara, Davis-Smyth (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev* 18: 4-25
70. Folkman (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-86
71. Folkman (2001) *Angiogenesis* S: 412-428 Martinus Nijhoff Publishers, Boston
72. Forstermann, Kleinert (1995) Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352(4): 351-64

73. Friedlander, Brooks, Shaffer, Kincaid, Varner, Cheresh (1995) Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 270(5241): 1500-02
74. Friedlander, Theesfeld, Sugita, Fruttiger, Thomas , Chang, Cheresh (1996) Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9764-69
75. Fromental-Ramain, Warot, Lakkaraju, Favier, Haack, Birling, Dierich, Dolle, Chambon (1996) Specific and redundant functions of the paralogous Hoxa-9 and Hoxd-9 genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development* 122(2): 461-72
76. Fuller, McAdara, Yaron, Sakaguchi, Fraser, Gasson (1999) Characterization of HOX gene expression during myelopoiesis: role of HOX A5 in lineage commitment and maturation. *Blood* 93(10): 3391-400
77. Fujino, Yamazaki, Largaespada, Jenkins, Copeland, Hirokawa, Nakamura (2001) Inhibition of myeloid differentiation by Hoxa9, Hoxb8, and Meis homeobox genes. *Exp Hematol* 29(7): 856-63
78. Fukumura, Gohongi, Kadambi, Izumi, Ang, Yun, Buerk, Huang, Jain (2001) Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5): 2604-9
79. Furchgott, Zawadski (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-76
80. Garcia-Fernandez, Holland (1996) Amphioxus Hox genes: insights into evolution and development. *Int J Dev Biol* 40(suppl 1): 71S–72S

81. Gehring, Hiromi (1986) Homeotic genes and the homeobox. *Annu Rev Genet* 20: 147-73
82. Gehring, Qian, Billeter, Furukubo-Tokunaga, Schier, Resendez-Perez, Affolter, Otting, Wuthrich (1994) Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78(2): 211-23
83. George, Georges-Labouesse, Patel-King, Rayburn, Hynes (1993) Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119: 1079–109
84. Gerber, McMurtrey, Kowalski, Yan, Keyt, Dixit, Ferrara (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation *J Biol Chem* 273 (46): 30336-43
85. Gerety, Wang, Chen, Anderson (1999) Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* 4(3): 403-14
86. Giancotti, Ruoslahti (1999) Integrin signaling. *Science* 285: 1028–1032
87. Gohongi, Fukumura, Boucher, Yun, Soff, Compton, Todoroki, Jain (1999) Tumor-host interactions in the gallbladder suppress distal angiogenesis and tumor growth: involvement of transforming growth factor beta1. *Nat Med* 5(10): 1203-8
88. Goemer, Holst, Wood, Jones, Edelman (1994) Regulation in vitro of an L-CAM enhancer by homeobox genes HoxD9 and HNF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17): 7985-89

89. Gorski, LePage, Walsh (1994) Cloning and sequence analysis of homeobox transcription factor cDNAs with an inosine-containing probe. *Biotechniques* 16: 856-865
90. Hartwell, Wagner (1999) New discoveries with mice mutant in endothelial and platelet selectins *Thromb Haemost* 82: 850-57
91. Hellstrom, Gerhardt, Kalen, Li, Eriksson, Wolburg, Betsholtz (2001) Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 153(3): 543-53
92. Henderson, Wang, Taylor, Aitkenhead, Hughes (2001) The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation. *J Biol Chem* 276(9): 6169-76
93. Hisa, Spence, Rachel, Fujita, Nakamura, Ward, Devor-Henneman, Saiki, Kutsuna, Tessarollo, Jenkins, Copeland (2004) Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *EMBO J* 23(2): 450-59
94. Hoffmann, Handeler, Aicher, Rössig, Vasa, Zeiher, Dimmeler (2001) Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli - important role of nitric oxide. *Circ Res* 89: 709-715
95. Holland, Peles, Pawson, Schlessinger (1998) Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinases and receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Curr Opin Neurobiol* 8 (1): 117-27
96. Hynes (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25

97. Ijin, Dube, Kontusaari, Korhonen, Lahtinen, Oettgen, Alitalo (1999) Role of ets factors in the activity and endothelial cell specificity of the mouse Tie gene promoter. *FASEB J* 13(2): 377-86
98. Jain (1987) Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis* 6 (4): 559-93
99. Izon, Rozenfeld, Fong, Komuves, Largman, Lawrence (1998) Loss of function of the homeobox gene Hoxa-9 perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. *Blood* 92(2): 383-93
100. Jain (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9(6):685-93
101. Jakeman, Winer, Bennett, Altar, Ferrara (1992) Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 89(1): 244-53
102. Jones, Prediger, Bittner, De Robertis, Edelman (1992) Cell adhesion molecules as targets for Hox genes: neural cell adhesion molecule promoter activity is modulated by cotransfection with Hox-2.5 and -2.4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(6): 2086-90
103. Kalka, Masuda, Takahashi, Kalka-Moll, Silver, Kearney, Li, Isner, Asahara (2000) Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3422-27
104. Kappel, Schlaeger, Flamme, Orkin, Risau, Breier (2000) Role of SCL/Tal-1, GATA, and ets transcription factor binding sites for the

- regulation of flk-1 expression during murine vascular development. *Blood* 96(9): 3078-85
105. Kennedy, Firpo, Choi, Wall, Robertson, Kabrun, Keller (1997) A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 386(6624): 488-93
106. Kim, Chang, Shin, Cho, Park, Park (1998) Genomic structure and sequence analysis of human HOXA-9. *DNA Cell Biol* 17(5): 407-14
107. Kim, Harris, Varner (2000) Regulation of integrin α v β 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin α 5 β 1 and protein kinase A. *J Biol Chem* 275: 33920-28
108. Kirito, Fox, Kaushansky (2004) Thrombopoietin induces HOXA9 nuclear transport in immature hematopoietic cells: potential mechanism by which the hormone favorably affects hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol* 24(15): 6751-62
109. Klagsbrun, D'Amore (1996) Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Facotr Rev* 7: 259-70
110. Klinke, Silbernagel (2001) *Lehrbuch der Physiologie*, Thieme Verlag, Stuttgart
111. Kluk, Hla (2002) Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* 1582(1-3): 72-80
112. Kroon, Kros, Thorsteinsdottir, Baban, Buchberg, Sauvageau (1998) Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J* 17(13): 3714-25

113. Kumar, Malkowski, Yin, Tanghetti, Yaremko, Nechuta, Varner, Liu, Smith, Neustadt, Presta, Armstrong (2001) Inhibition of angiogenesis and tumor growth by SCH221153, a dual $\alpha(v)\beta3$ and $\alpha(v)\beta5$ integrin receptor antagonist. *Cancer Res* 61(5): 2232-38
114. Kyba, Perlingeiro, Daley (2002) HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* 109(1): 29-37
115. Lampugnani, Resnati, Raiteri, Pigott, Pisacane, Houen, Ruco, Dejana (1992) A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *Cell Biol* 118(6): 1511-22.
116. LaRonde-LeBlanc, Wolberger (2003) Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes Dev* 17(16): 2060-72
117. Lawrence, Morata (1994) Homeobox genes: Their function in *Drosophila* segmentation and pattern formation. *Cell* 78: 181-189
118. Lawrence, Helgason, Sauvageau, Fong, Izon, Humphries, Largman (1997) Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood* 89(6): 1922-30
119. Lee, Salyapongse, Bragdon, Shears, Watkins, Edington, Billiar (1999) Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol* 277(4 Pt 2): H1600-08
120. Levine, Rubin, Tjian (1984) Human DNA sequences homologous to a protein coding region conserved between homeotic genes of *Drosophila*. *Cell* 38(3):667-73

121. Lewis (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276 (5688): 565-70
122. Li, Oehrlein, Wallerath, Ihrig-Biedert, Wohlfart, Ulshofer, Jessen, Herget, Fostermann, Kleinert (1998) Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* 53: 630-37
123. Liebich (1999) Funktionelle Histologie der Haussäugetiere F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
124. Lin, Weisdorf, Solovey, Hebbel (2000) Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood *J Clin Invest* 105(1): 71-77
125. Lorentz, Duluc, Arcangelis, Simon-Assmann, Kedinger, Freund (1997) Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* 139: 1553-65
126. Luo, Yang, Takihara, Knoetgen, Kessel (2004) The cell-cycle regulator geminin inhibits Hox function through direct and polycomb-mediated interactions. *Nature* 427(6976): 749-53
127. Mann, Chan (1996) Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet* 12(7):258-62
128. McGinnis, Krumlauf (1992) Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68: 283-302
129. Miano, Firulli, Olson, Hara, Giachelli, Schwartz (1996) Restricted expression of homeobox genes distinguishes fetal from adult human smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 900–905.

130. Muller, Gaunt, Lawrence (1995) Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development* 121: 2847-52
131. Mulvany (1992) Determinants of vascular structure. *J Cardiovasc Pharmacol* 19 Suppl 5: S 1-6
132. Munoz-Chapuli, Quesada, Medina (2004) Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 61: 2224-43
133. Murohara, Asahara, Silver, Bauters, Masuda, Kalka, Kearney, Chen, Symes, Fishman, Huang, Isner (1998a) Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101(11): 2567-78
134. Murohara, Horowitz, Silver, Tsurumi, Chen, Sullivan, Isner (1998b) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97(1): 99-107
135. Myers, Charboneau, Boudreau (2000) Homeobox B3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis. *J Cell Biol* 148: 343-51
136. Oettgen (2001) Transcriptional regulation of vascular development. *Circ Res* 89: 380-88
137. Palmer, Zimmer, Erdmann, Eulenburg, Porthin, Heumann, Deutsch, Klein (2002) EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell* 9(4): 725-37
138. Patan, Haenni, Burri (1996) Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM): 1. Pillar formation by folding of the capillary wall. *Microvasc. Res.* 51: 80-98

139. Patel, Gorski, LePage, Lincecum, Walsh (1992) Molecular cloning of a homeobox transcription factor from adult aortic smooth muscle. *J Biol Chem* 267: 26085-90
140. Patel, Sharangpani, Bandyopadhyay, DiCorleto (1999) Endothelial cells express a novel, tumor necrosis factor-alpha-regulated variant of HOXA9. *J Biol Chem* 274(3): 1415-22
141. Pepper (1997) Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 8(1): 21-43
142. Peverali, D'Esposito, Acampora, Bunone, Negri, Faiella, Stornaiuolo, Pannese, Migliaccio, Simeone et al. (1990) Expression of HOX homeogenes in human neuroblastoma cell culture lines. *Differentiation* 45(1): 61-69
143. Peters, De Vries, Williams (1993) Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(19): 8915-19
144. Plendl, Sinowatz, Auerbach (1992) Die Heterogenität des vaskulären Endothels. *Anat Histol Embryol* 21: 256-262
145. Poole, Coffin (1988) Developmental angiogenesis: quail embryonic vasculature *Scanning Microsc* 2: 443-48
146. Pugh, Ratcliffe (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 6: 677-84
147. Risau (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674

148. Risau, Sariola, Zerwes, Sasse, Ekblom, Kemler, Doetschman (1988) Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 102: 471-78
149. Rossig, Urbich, Bruhl, Dernbach, Heeschen, Chavakis, Sasaki, Aicher, Diehl, Seeger, Potente, Aicher, Zanetta, Dejana, Zeiher, Dimmeler (2005) Histone deacetylase activity is essential for the expression of HoxA9 and for endothelial commitment of progenitor cells. *J Ex Med*
150. Ruegg, Mariotti (2003) Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 60: 1135-57
151. Rupp, Little (2001) Integrins in vascular development. *Circ Res* 89: 566-72
152. Schlaeger, Bartunkova, Lawitts, Teichmann, Risau, Deutsch, Sato (1997) Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7): 3058-63
153. Schreiber, Wang, Jochum, Fetka, Elliott, Wagner (2000) Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1. *Development* 127(22): 4937-48
154. Scott, Tamkun, Hartzell (1989) The structure and function of the homeodomain. *Biochim Biophys Acta* 989(1): 25-48
155. Sessa (2004) eNOS at a glance *J Cell Sci* 117: 2427-29

156. Shalaby, Rossant, Yamaguchi, Gertsenstein, Wu, Breitman, Schuh (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376(6535): 62-6
157. Shalaby, Ho, Stanford, Fischer, Schuh, Schwartz, Bernstein, Rossant (1997) A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89 (6): 981-90
158. Sham, Hunt, Nonchev, Papalopulu, Graham, Boncinelli, Krumlauf (1992) *EMBO J* 11: 1825-36
159. Shen, Krishnan, Lawrence, Largman (1996) The HOX Homeodomain Proteins Block CBP Histone Acetyltransferase Activity *Mol Cell Biol* 16: 1734-45
160. Shen, Rozenfeld, Kwong, Komves, Lawrence, Largman (1999) HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Mol Cell Biol* 19(4): 3051-61
161. Shi, Yang, Chen, Chang, Cao (1999) Smad1 interacts with homeobox DNA-binding proteins in bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* 274(19): 13711-17
162. Shi, Bai, Li, Cao (2001) Hoxa-9 represses transforming growth factor-beta-induced osteopontin gene transcription. *J Biol Chem* 276(1): 850-5
163. Shivdasani, Mayer, Orkin (1995) Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373(6513): 432-4

164. Simeone, Acampora, Arcioni, Andrews, Boncinelli, Mavilio (1990) Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature* 346(6286):763-6
165. Simeone, Acampora, Nigro, Faiella, D'Esposito, Stornaiuolo, Mavilio, Boncinelli (1991) Differential regulation by retinoic acid of the homeobox genes of the four HOX loci in human embryonal carcinoma cells. *Mech Dev* 33(3): 215-27
166. Soldi, Mitola, Strasly, Defilippi, Tarone, Bussolino (1999) Role of α v β 3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J* 18(4): 882-92
167. Stein, Huynh-Do, Lane, Cerretti, Daniel (1998) Nck recruitment to EphB1/ELK, couplet ligand activation to c-Jun kinase. *J Biol Chem* 273 (3): 1303-08
168. Steinle, Meininger, Fourough, Wu G., Wu MH., Granger (2002) EphB4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway *J Biol Chem* 277(15): 43830-43850
169. Stephens, Sutherland, Klimanskaya, Andrieux, Meneses, Pedersen, Damsky (1995) Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev* 9(15): 1883-95
170. Studer, Gavalas, Marshall, Ariza-McNaughton, Rijli, Chambon, Krumlauf. (1998) Genetic interactions between Hox A1 and Hox B1 reveal new roles in regulation of early hindbrain patterning. *Development* 125(6): 1025-36

171. Thorsteinsdottir, Mamo, Kroon, Jerome, Bijl, Lawrence, Humphries, Sauvageau (2002) Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* 99(1): 121-29
172. Tiberio, Barba, Magli, Arvelo, Le Chevalier, Poupon, Cillo (1994) HOX gene expression in human small-cell lung cancers xenografted into nude mice. *Int J Cancer* 58(4): 608-15
173. Uemura, Ogawa, Hirashima, Fujiwara, Koyama, Takagi, Honda, Wiegand, Yancopoulos, Nishikawa (2002) Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J Clin Invest* 110(11): 1619-28
174. Van der Flier, Sonnenberg (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305: 285-298
175. Van Groningen, Wenink, Testers (1991) Myocardial capillaries: increase in number by splitting of existing vessels. *Anat Embryol* 184: 65-70
176. Vasa, Fichtlscherer, Aicher, Adler, Urbich, Martin, Zeiher, Dimmeler (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89(1): E1-7
177. Vijapurkar, Fischbach, Shen, Brandts, Stokoe, Lawrence, Largman (2004) Protein kinase C-mediated phosphorylation of the leukemia-associated HOXA9 protein impairs its DNA binding ability and induces myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* 24(9): 3827-37
178. Visvader, Fujiwara, Orkin (1998) Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev* 12(4): 473-9

179. Wakiya, Begue, Stehelin, Shibuya (1996) A cAMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene. *J Biol Chem* 271(48): 30823-8
180. Walter, Schachinger, Elsner, Mach, Auch-Schwelk, Zeiher (2000) Effect of statin therapy on restenosis after coronary stent implantation. *Am J Cardiol* 85(8): 962-68
181. Wang, Chen, Anderson (1998) Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93(5): 741-53
182. Wang, Cohen, Shao, Mole, Dombkowski, Scadden (2004) Ephrin receptor, EphB4, regulates ES cell differentiation of primitive mammalian hemangioblasts, blood, cardiomyocytes and blood vessels. *Blood* 103 (1): 100-09
183. Wermuth, Buchberg (2005) Meis1-mediated apoptosis is caspase dependent and can be suppressed by coexpression of HoxA9 in murine and human cell lines. *Blood* 105(3):1222-30
184. Wu, Moser, Bautch, Patterson (2003) HoxB5 is an upstream transcriptional switch for differentiation of the vascular endothelium from precursor cells. *Mol Cell Biol* 23(16): 5680-91
185. Yancopoulos, Davis, Gale, Rudge, Wiegand, Holash (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407(6801): 242-48
186. Yang, Rayburn, Hynes (1993) Embryonic mesodermal defects in $\alpha 5$ integrin- deficient mice. *Development* 119: 1093-1105

187. Yang, Castilla, Xu, Li, Gotay, Weinstein, Liu, Deng (1999) Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5. *Development* 126(8): 1571-80
188. Yeoh, Ross, Shurtleff, Williams, Patel, Mahfouz, Behm, Raimondi, Relling, Patel, Cheng, Campana, Wilkins, Zhou, Li, Liu, Pui, Evans, Naeve, Wong, Downing (2002) Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 1(2): 133-43
189. Yu, Hess, Horning, Brown, Korsmeyer (1995) Altered Hox expression and segmental identity in *-mutant* mice. *Nature* 378(6556): 505-08
190. Zeisig, Milne, Garcia-Cuellar, Schreiner, Martin, Fuchs, Borkhardt, Chanda, Walker, Soden, Hess, Slany (2004) Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Mol Cell Biol* 24(2): 617-28
191. Zhong, Eliceiri, Stupack, Penta, Sakamoto, Quertermous, Coleman, Boudreau, Varner (2003) Neovascularization of ischemic tissues by gene delivery of the extracellular matrix protein Del-1. *J Clin Invest* 112(1): 30-41
192. Ziemin-van der Poel, McCabe, Gill, Espinosa, Patel, Harden, Rubinelli, Smith, LeBeau, Rowley et al. (1991) Identification of a gene, MLL that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23):10735-39